

**KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

KİMYA ANABİLİM DALI

**APİTERAPİK ARI ÜRÜNLERİNİN (BAL, POLEN, PROPOLİS VE ARI SÜTÜ)
BİYOAKTİF ÖZELLİKLERİ VE KARACİĞER HASARINI ÖNLEMEDEKİ
ROLLERİ**

DOKTORA TEZİ

Kimyager Özlem SARAL

**NİSAN 2013
TRABZON**

KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KİMYA ANABİLİM DALI

APİTERAPİK ARI ÜRÜNLERİNİN (BAL, POLEN, PROPOLİS VE ARI SÜTÜ)
BİYOAKTİF ÖZELLİKLERİ VE KARACİĞER HASARINI ÖNLEMEDEKİ
ROLLERİ

Kimyager Özlem SARAL

Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsünde
"DOKTOR (KİMYA)"
Unvanı Verilmesi İçin Kabul Edilen Tezdir.

Tezin Enstitüye Verildiği Tarih : 01.03.2013
Tezin Savunma Tarihi : 12.04.2013

Tez Danışmanı : Prof. Dr. Sevgi KOLAYLI
İkinci Danışman : Doç. Dr. Rezzan ALİYAZICIOĞLU

Trabzon 2013

Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü

Kimya Ana Bilim Dalında

Özlem SARAL Tarafından Hazırlanan

**APİTERAPİK ARI ÜRÜNLERİNİN (BAL, POLEN, PROPOLİS VE ARI SÜTÜ)
BİYOAKTİF ÖZELLİKLERİ VE KARACİĞER HASARINI ÖNLEMEDEKİ
ROLLERİ**

**başlıklı bu çalışma, Enstitü Yönetim Kurulunun 12 / 03 / 2013 gün ve 1497 sayılı
kararıyla oluşturulan jüri tarafından yapılan sınavda**

DOKTORA TEZİ

olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri

Başkan : Prof. Dr. E. Edip KEHA

Üye : Prof. Dr. Sevgi KOLAYLI

Üye : Prof. Dr. Murat KÜÇÜK

Üye : Prof. Dr. Şükrü BEYDEMİR

Üye : Doç. Dr. Sinan CANPOLAT

.....
.....
.....
.....
.....

Prof. Dr. Sadettin KORKMAZ

Enstitü Müdürü

ÖNSÖZ

“Apiterapik Arı Ürünlerinin (Bal, Polen, Propolis ve Arı Sütü) Biyoaktif Özellikleri ve Karaciğer Hasarını Önlemedeki Rollerini” adlı bu çalışma Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı’nda Doktora Tezi olarak hazırlanmıştır.

Çalışmamın planlanması ve yürütülmesinde her türlü maddi ve manevi desteğini esirgemeyen, sürekli yanımda olan danışman hocam sayın Prof. Dr. Sevgi KOLAYLI’ya teşekkür ederim. Tezimin deney hayvanları aşamasında bana her konuda yardımcı olan ikinci danışman hocam sayın Doç. Dr. Rezzan ALİYAZICIOĞLU’na da ayrıca teşekkür ederim.

Deneysel çalışmalarında yardımlarını esirgemeyen Doç. Dr. Sinan CANPOLAT, Yrd. Doç. Dr. Esin YULUĞ, Doç. Dr. Sibel SİLİCİ hocalarıma, çalışma arkadaşlarım Öğr. Gör. Oktay YILDIZ’a, Arş. Gör. Hüseyin ŞAHİN’e, Zehra CAN’a, Zeynep İSKEFİYELİ’ye, Muzaffer ALBAYRAK’a, Sevda CAVRAR’a, enzim çalışmalarında yardımcı olan Doç. Dr. Ahmet ALVER’e, Diler US’a, İmran İNCE’ye ve Cemil KAHRAMAN’a ve Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Merkezi personeline teşekkür ederim.

Çalışmam esnasında beni yönlendiren ve katkıda bulunan tez izleme jüri üyelerim Prof. Dr. Murat KÜÇÜK ve Prof. Dr. E. Edip KEHA hocalarıma da teşekkür ederim.

Çalışmamıza numune desteği veren Zonguldak Arı Yetiştiricileri Birliği’ne ve Macahel Arıcılık A.Ş.’ye teşekkür ederim.

Son olarak tüm eğitim hayatım boyunca bana her zaman güvenen, maddi ve manevi destekleri ile hep yanımda olan aileme, çalışmalarım ve tez yazım aşamasında benden desteğini esirgemeyen eşim Sinan SARAL’a sonsuz teşekkür ederim.

Özlem SARAL
Trabzon 2013

TEZ BEYANNAMESİ

Doktora Tezi olarak sunduğum ‘‘Apiterapik Arı rnlerinin (Bal, Polen, Propolis Ve Arı Sütü) Biyoaktif zellikleri Ve Karaciğer Hasarını nlemedeki Rollerini’’ başlıklı bu çalışmayı baştan sona kadar danışmanım Prof. Dr. Sevgi KOLAYLI’nın sorumluluğunda tamamladığımı, verileri/örnekleri kendim topladığımı, deneyleri/analizleri ilgili laboratuarlarda yaptığımı/yaptırıldığımı, 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. 01/03/2013

Özlem SARAL

İÇİNDEKİLER

| | <u>Sayfa No</u> |
|--|-----------------|
| ÖNSÖZ..... | III |
| TEZ BEYANNAMESİ | IV |
| İÇİNDEKİLER..... | V |
| ÖZET..... | VIII |
| SUMMARY | IX |
| ŞEKİLLER DİZİNİ..... | X |
| TABLolar DİZİNİ | XII |
| SEMBOLLER DİZİNİ..... | XIII |
| 1. GENEL BİLGİLER..... | 1 |
| 1.1. Giriş..... | 1 |
| 1.2. Apiterapi..... | 2 |
| 1.3. Arı Ürünleri | 3 |
| 1.3.1. Bal | 3 |
| 1.3.2. Polen..... | 5 |
| 1.3.3. Propolis..... | 7 |
| 1.3.4. Arı Sütü | 8 |
| 1.3.5. Arı Zehiri..... | 10 |
| 1.3.6. Bal Mumu..... | 10 |
| 1.4. Serbest Radikaller ve Oksidatif Stres..... | 11 |
| 1.5. Antioksidanlar | 13 |
| 1.5.1. Enzimatik Antioksidanlar..... | 13 |
| 1.5.2. Enzimatik Olmayan Antioksidanlar | 15 |
| 1.6. Bitkisel Kaynaklı Biyoaktif Bileşikler | 16 |
| 1.6.1. Fenolik Bileşikler | 16 |
| 1.6.1.1. Fenolik Asitler..... | 17 |
| 1.6.1.2. Flavonoidler | 18 |
| 1.6.1.2.1. Antosiyaninler | 18 |
| 1.7. Karaciğer | 19 |
| 1.8. Karbon Tetreklorür (CCl ₄) ve Metabolize Edilmesi | 20 |

| | | |
|----------|--|----|
| 2. | YAPILAN ÇALIŞMALAR | 21 |
| 2.1. | Kullanılan Cihazlar | 21 |
| 2.2. | Kullanılan Kimyasallar | 21 |
| 2.3. | Kullanılan Çözeltiler | 22 |
| 2.4. | Numunelerin Temini ve Saklanması | 23 |
| 2.5. | Deney Hayvanları..... | 23 |
| 2.6. | Numunelerde Yapılan Analizler..... | 24 |
| 2.6.1. | Ekstraktların Hazırlanması | 24 |
| 2.6.2. | Toplam Fenolik Madde Tayini..... | 25 |
| 2.6.3. | Toplam Flavonoid Tayini..... | 25 |
| 2.6.4. | Toplam Antosiyanin Tayini | 26 |
| 2.6.5. | Demir (III) İndirgeme / FRAP Yöntemi ile Antioksidan Kapasite Tayini | 27 |
| 2.6.6. | Bakır (II) İyonu İndirgeyici Antioksidan Kapasite Tayini (CUPRAC)..... | 28 |
| 2.6.7. | DPPH* Radikal Temizleme Aktivitesi..... | 29 |
| 2.7. | Toplam Protein Miktarı (%)..... | 29 |
| 2.8. | Deneyel Hayvan Çalışmaları | 30 |
| 2.8.1. | Deney Hayvanlarına Verilecek Ekstraktların Hazırlanması | 30 |
| 2.8.2. | Deney Grupları ve Uygulamalar | 30 |
| 2.8.3. | Deney Hayvanlarının Vücut Ağırlığı Ölçümü | 31 |
| 2.8.4. | Deney Hayvanlarından Örneklerin Alınması | 32 |
| 2.8.5. | Örneklerde Yapılan Ön İşlemler | 32 |
| 2.9. | Biyokimyasal İşlemler..... | 32 |
| 2.9.1. | Süperoksit Dismütaz (SOD) Aktivitesinin Ölçülmesi | 32 |
| 2.9.2. | Malondialdehid (MDA) Seviyesinin Belirlenmesi | 34 |
| 2.9.2.1. | Karaciğer Dokusunda MDA Seviyesinin Belirlenmesi | 34 |
| 2.9.2.2. | Eritrosit Paketlerinde MDA Seviyesinin Belirlenmesi | 34 |
| 2.9.2.3. | Plazmada MDA Seviyesinin Belirlenmesi | 35 |
| 2.9.3. | Katalaz (CAT) Aktivitesinin Ölçülmesi..... | 35 |
| 2.10. | Histopatolojik İnceleme | 36 |
| 2.11. | İstatistiksel Analiz | 36 |
| 3. | BULGULAR | 37 |
| 3.1. | Antioksidan Aktivite Ölçümleri | 37 |
| 3.1.1. | Toplam Fenolik Madde Miktarı | 37 |

| | | |
|----------|--|----|
| 3.1.2. | Toplam Flavonoid Miktarı | 38 |
| 3.1.3. | Toplam Antosiyanin Miktarı | 39 |
| 3.1.4. | Demir (III) İndirgeme / FRAP Yöntemi ile Antioksidan Kapasite Tayini | 40 |
| 3.1.5. | Bakır (II) İyonu İndirgeyici Antioksidan Kapasite Tayini (CUPRAC) | 41 |
| 3.1.6. | DPPH• Radikal Temizleme Aktivitesi..... | 41 |
| 3.1.7. | Toplam Protein Miktarı..... | 42 |
| 3.2. | Deney Hayvanları Uygulamaları..... | 43 |
| 3.2.1. | Deney Hayvanlarının Vücut Ağırlığı Ölçümü | 43 |
| 3.2.2. | Biyokimyasal Analiz Sonuçları..... | 43 |
| 3.2.2.1. | Plazmada Yapılan Ölçümlerin Sonuçları | 44 |
| 3.2.2.2. | Karaciğer Dokusunda Yapılan Ölçümlerin Sonuçları..... | 45 |
| 3.2.2.3. | Eritrosit Paketlerinde Yapılan Ölçümlerin Sonuçları..... | 47 |
| 3.2.3. | Histopatolojik İnceleme Sonuçları | 48 |
| 4. | TARTIŞMA | 53 |
| 5. | SONUÇLAR VE ÖNERİLER | 68 |
| 6. | KAYNAKLAR..... | 70 |

ÖZGEÇMİŞ

Doktora Tezi

ÖZET

APİTERAPİK ARI ÜRÜNLERİNİN (BAL, POLEN, PROPOLİS VE ARI SÜTÜ)
BİYOAKTİF ÖZELLİKLERİ VE KARACİĞER HASARINI ÖNLEMEDEKİ ROLLERİ

Özlem SARAL

Karadeniz Teknik Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Kimya Anabilim Dalı
Danışman: Prof. Dr. Sevgi KOLAYLI
2013, 91 Sayfa

Yapılan çalışmada Karadeniz Bölgesi'nin baskın florasından olan kestanenin bal, polen ve propolisi ile arı sütünün antioksidan özellikleri ve karaciğer hasarını önlemedeki rolleri araştırıldı. Antioksidan kapasitenin belirlenmesinde toplam fenolik madde, toplam flavonoid, toplam antosiyanin miktarları ile demir (II) indirgeme/antioksidan kapasite (FRAP), bakır (II) indirgeme/antioksidan kapasite (CUPRAC) ve DPPH radikal temizleme testleri kullanıldı. CCl₄ sıçanlarda karaciğer hasarı oluşturuıcı madde olarak kullanıldı. Çalışmada 49 adet Sprague Dawley cinsi dişi sıçan kullanıldı. CCl₄ ile birlikte değişik konsantrasyonlarda arı ürünleri sıçanlara oral yolla 7 gün boyunca verildi ve karaciğer hasarını önlemedeki rolleri incelendi. Karaciğer hasar oluşumu pratik olarak serum alanin transaminaz (ALT), aspartat transaminaz (AST) enzimleri ile takip edildi. Ayrıca malondialdehit (MDA), süperoksit dismutaz (SOD) ve katalaz (CAT) gibi enzimler ve karaciğer dokusu histopatolojik testlerindeki değişimler incelendi. Çalışmada kullanılan arı ürünlerinin antioksidan aktivitelerinin yapılarında bulunan toplam fenolik bileşiklerin miktarına bağlı olarak değişim gösterdiği ve bu ürünlerin antioksidan kapasitelerinin büyükten küçüğe propolis, polen, arı sütü ve bal şeklinde sıralandığı bulundu. Bu dört arı ürününün karaciğer hasarını önlemedeki rolleri incelendiğinde ise her birinin farklı antioksidan aktiviteye sahip olmalarına rağmen, CCl₄'ün oluşturduğu oksidatif hasarı önlemede benzer koruyucu role sahip oldukları bulundu. Sonuç olarak, bal, polen, propolis ve arı sütünün toksik ajanlara karşı karaciğeri hasardan korudukları bulundu.

Anahtar Kelimeler: Propolis, Arı sütü, Polen, Bal, Kestane, CCl₄, Karaciğer

PhD. Thesis

SUMMARY

BIOACTIVE PROPERTIES OF APITHERAPY BEE PRODUCTS (HONEY, POLLEN,
PROPOLIS AND ROYAL JELLY) AND THEIR ROLES IN PREVENTION LIVER
DAMAGE

Özlem SARAL

Karadeniz Technical University
The Graduate School of Natural and Applied Sciences
Chemistry Graduate Program
Supervisor: Prof. Dr. Sevgi KOLAYLI
2013, 91 Pages

In this study, chestnut honey, pollen, propolis from the dominant flora of the Black Sea Region with royal jelly were investigated for their antioxidant properties and the roles in prevention of liver damage. For determination of antioxidant capacity, total phenolic content, total flavonoid content, total anthocyanin, CUPRAC, FRAP and DPPH radical scavenging capacity tests were selected. CCl₄ was used to cause liver damage in rats. In this study, 49 female Sprague Dawley rats were used. Different concentrations of bee products were given orally for 7 days with CCl₄ to rats and their role in preventing liver injury were examined. The extend of liver damage formation were followed by measuring the activities of serum alanine transaminase (ALT), aspartate transaminase (AST) enzymes. In addition, besides histopathological examinations, malondialdehyde (MDA) and superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT) enzyme activity were also made. Antioxidant activities of the bee products used in our studies were shown to vary with their phenolic compound contents and could be ordered largest to smallest propolis, pollen, royal jelly, honey. When these four bee products were analyzed for their roles in prevention of liver damage, despiteto their different levels of antioxidant activities, almost similar protective roles in preventing the damage formed by CCl₄ were found. As a result, honey, pollen, propolis and royal jelly were found to protect the liver against toxic agents.

Key words: Propolis, Royal Jelly, Pollen, Honey, Chestnut, CCl₄, Liver

ŞEKİLLER DİZİNİ

| | <u>Sayfa No</u> |
|---|-----------------|
| Şekil 1. Petekli bal..... | 4 |
| Şekil 2. Kaktüs çiçeği ve polen üreten stamenlerinin yakından görünüşü..... | 5 |
| Şekil 3. Polene bulanmış bal arısı | 6 |
| Şekil 4. Çeşitli renklere polenler | 6 |
| Şekil 5. Propolis | 8 |
| Şekil 6. Arı sütünde larva..... | 9 |
| Şekil 7. Larva transferinden 2 gün sonra arı sütü hasadı | 9 |
| Şekil 8. Arı zehiri | 10 |
| Şekil 9. Doğal balmumu..... | 11 |
| Şekil 10. Hidroksisinnamik asit ve Hidroksibenzoik asit | 17 |
| Şekil 11. Fenolik asitlerin genel yapısı | 17 |
| Şekil 12. Flavonoidlerin genel yapısı..... | 18 |
| Şekil 13. Deneyde kullanılan Spraque Dawley tipi dişi sıçanlar | 24 |
| Şekil 14. Gallik asit standart çalışma grafiği..... | 37 |
| Şekil 15. Kuersetin standart çalışma grafiği..... | 38 |
| Şekil 16. Demir sülfat standart çalışma grafiği..... | 40 |
| Şekil 17. Troloks standart çalışma grafiği..... | 41 |
| Şekil 18. DPPH radikali temizleme aktivitesi tayinleri sonucu elde edilen SC ₅₀ değerleri ... | 42 |
| Şekil 19. Grupların AST ve ALT düzeyleri | 44 |
| Şekil 20. SOD standart çalışma grafiği | 44 |
| Şekil 21. Karaciğer dokuları için hazırlanan MDA standart çalışma grafiği..... | 46 |
| Şekil 22. Eritrosit paketleri için hazırlanan MDA standart çalışma grafiği | 47 |
| Şekil 23. Grup 1'e ait karaciğer dokusunda normal morfolojide hepatositler (↑)..... | 49 |
| Şekil 24. Grup 2'ye ait karaciğer dokusunda normal hepatositler (↑) ve yağlı değişiklik içeren hepatositler (▲)..... | 49 |
| Şekil 25. Grup 3'e ait karaciğer dokusunda normal hepatositler (↑) ve yaygın yağlı değişiklik gösteren hepatositler (▲) | 50 |
| Şekil 26. Grup 4'e ait karaciğer dokusunda normal hepatositler (↑) ve yağlı değişiklik gösteren hepatositler (▲)..... | 50 |

- Şekil 27. Grup 5'e ait karaciğer dokusunda normal hepatositler (↑) ve yağlı değişiklik gösteren hepatositler (▲) ve yer yer sinüzoidal aralıkta genişlemeler (★)..... 51
- Şekil 28. Grup 6'ya ait karaciğer dokusunda yaygın olarak normal hepatositler (↑) ve yağlı değişiklik gösteren hepatositler (▲) 51
- Şekil 29. Grup 7'ye ait karaciğer dokusunda yaygın olarak normal hepatositler (↑) ve yağlı değişiklik gösteren hepatositler (▲) 52

TABLolar DİZİNİ

| | <u>Sayfa No</u> |
|---|------------------------|
| Tablo 1. En sık karşılaşılan reaktif oksijen türleri ve bazı özellikleri..... | 12 |
| Tablo 2. Çalışmalarda kullanılan cihazlar..... | 21 |
| Tablo 3. Çözeltiler ve hazırlanışları | 22 |
| Tablo 4. Toplam fenolik madde tayininde yapılan işlemler..... | 25 |
| Tablo 5. Toplam flavonoid tayininde kullanılan miktarlar | 26 |
| Tablo 6. FRAP yönteminde yapılan pipetleme işlemleri | 28 |
| Tablo 7. CUPRAC tayininde kullanılan miktarlar | 28 |
| Tablo 8. Deney grupları ve yapılan uygulamalar | 30 |
| Tablo 9. SOD analizi için kullanılan miktarlar | 33 |
| Tablo 10. Katalaz aktivitesinde kullanılan miktarlar | 35 |
| Tablo 11. Bal, polen, propolis ve arı sütünün toplam fenolik madde miktarları | 38 |
| Tablo 12. Numunelerin toplam flavonoid miktarları | 39 |
| Tablo 13. Örneklerin toplam antosiyanin miktarları..... | 39 |
| Tablo 14. Numunelerin demir (III) indirgeme kuvvetleri | 40 |
| Tablo 15. Numunelerin bakır (II) indirgeme kuvvetleri | 41 |
| Tablo 16. Polen ve arı sütünün protein miktarı..... | 42 |
| Tablo 17. Deney hayvanlarının vücut ağırlığı değişimleri..... | 43 |
| Tablo 18. Plazmaya ait parametreler..... | 45 |
| Tablo 19. Karaciğer dokularına ait parametreler | 46 |
| Tablo 20. Eritrosit paketlerine ait parametreler | 47 |

SEMBOLLER DİZİNİ

- ALT: Alanin aminotransferaz
AOAC: Amerikan Resmi Analitik Kimyacılar Birliği
AST: Aspartat aminotranferaz
ATSDR: Toksik Maddeler ve Hastalık Kayıt Ajansı
BHT: Butillenmiş hidroksi toluen
CAT: Katalaz
CCl₄: Karbon tetraklorür
DHA: Dehidroaskorbik asidi
DPPH: 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil
GR: Glutasyon redüktaz
GSH: Redükte glutasyon
GSH-Px: Glutasyon peroksidaz
GST: Glutasyon-S-transferazlar
H₂O₂: Hidrojen peroksit
HO[•]: Hidroksil radikali
i.p: İntraperitoneal (karın içi boşluk)
SOD: Süperoksit dismutaz
SOR: Serbest Oksijen Radikalleri
MDA: Malondialdehit
MS: Multiple Sclerosis
O₂^{•-}: Süperoksit radikali
SPSS: Statistical Package for Social Sciences
TBA: Tiyobarbitürük asit
TCA: Trikloroasetik asit
TPTZ: 2,4,6-tri (2-pridil)-S-triazin
Troloks[®]: 6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karboksilik asit
TÜİK: Türkiye İstatistik Kurumu

1. GENEL BİLGİLER

1.1. Giriş

Bal arıları, bitkilerin ve çiçeklerin nektar ve polenlerini toplayarak arı ürünleri yaparlar. Arı ürünlerinin tedavi amacıyla kullanılması çok eski zamanlara dayanmakla birlikte, bu konuda araştırmaların yapılması ve apiterapi merkezlerinin kurulmasıyla günümüzde de önemini korumaktadır. Son yıllarda dünyada ve özellikle Çin’de “Apiterapi” adı verilen arı ürünleri ile tedavi yöntemleri hızlı bir gelişme göstermiştir.

Zengin bitki gen kaynağına sahip olan ülkemizin tüm bölgeleri, arıcılık faaliyetlerini yapmak için uygun ekolojik bir yapıya sahiptir. Bu bakımdan Türkiye, sahip olduğu 4,8 milyon kovan varlığı ve 83,842 ton bal üretimi ile dünyada 4. sırada yer almaktadır (TÜİK, 2006).

Halk arasında pek çok derde deva olduğuna inanılan bal (Krell, 1996; Molan 1997), propolis (Grange, 1990; Krell, 1996; Iwasaki, 1990) ve arı sütünün (Yatsunami ve Echigo, 1985; Meydanoğlu, 1985) özellikle antibakteriyel özelliğe sahip olduğu, arı zehrinin romatizmal hastalıkların tedavisinde (Schmidt, 1997; Genç, 1993), polenlerin (Schmidt, 1997) ise immünolojik hastalıkların tedavisinde yaygın olarak kullanıldığı bildirilmektedir (Şahinler, 2000).

Ülkemiz arıcılık potansiyeli ve bal üretimi bakımından dünyada ön sıralarda olmasına rağmen polen, propolis ve arı sütü üretimi ve tüketimi bakımından alt seviyelerdedir. Ayrıca bu ürünler üzerine çalışan araştırmacı sayısı ve niteliği oldukça yetersizdir.

Karaciğer; fizyolojik ve biyokimyasal rolü nedeniyle toksik madde ve ilaçlara sıkça maruz kalan bir organdır. Karaciğer tüm metabolik ve zehirsizleştirme reaksiyonlarının gerçekleştiği yegane organ olup, pek çok türden toksik maddelerden, viral ve bakteriyel enfeksiyonlardan zarar görmektedir. Karaciğerde hasar dahil, çeşitli patolojik tablolara yol açan 600’den fazla maddeden biri de karbon tetraklorür (CCl₄)’dür (Robbins vd., 2000; Güven vd., 2003). Örneğin, mantar toksini olan α -amanitin sadece karaciğer hasarına yol açmaktadır. Viral enfeksiyonlardan en çok zarar gören organ yine karaciğer olup hepatit ve siroz oluşumuna yol açmaktadırlar. Dünyada milyonlarca insan çeşitli karaciğer hasarlarından muzdarip olup bu hasarların tedavi edilmesinde direkt olarak kullanılan bir

ilaç bulunmamaktadır. Karaciğer hasarlarının tedavisinde daha çok bitkisel ilaçlar ön plana çıkmaktadır ve bu amaçla çoğu zaman silibinin adı verilen ve deve dikeninden elde edilen flavanoidce zengin bir ekstrakt kullanılmaktadır. CCl₄ deneysel olarak karaciğer hasarı oluşturulmasında yaygın kullanılan bir ksenobiyotiktir (Recknagel vd., 1989; Slater, 1982). Bu hasarın değişik şekilleri oksidatif stres ve bunu takiben ortaya çıkan serbest radikallerle oluştuğu bilinmektedir (Sherlock,1986; Foulis vd., 1988).

Birçok araştırmacı tarafından koyu renkli balların yüksek fenolik içeriğe ve bunun sonucu olarak da yüksek antioksidan kapasiteye sahip olduğu bildirilmektedir (Beretta vd., 2005; Frankel vd., 1998, Küçük vd., 2007). Bir çiçek balı olan kestane balının koyu renkli ballardan biri olduğu ve açık renkli ballara göre yüksek fenolik madde miktarına sahip olduğu yapılan araştırmalarda bildirilmektedir (Sarıkaya vd., 2009; Beratta vd., 2005; Küçük vd., 2007, Ulusoy, 2005). Karadeniz Bölgesi'nin baskın bitki florasından biri olan kestanenin balının, polenin ve propolisinin biyoaktif özelliklerinin yüksek olabileceği öngörülerek karaciğer hasarının tedavi edebilecek potansiyele sahip olduğu düşünülmüştür.

Bu nedenle planlanan çalışmanın amacı; *in vitro* ve *in vivo* olarak kestane balı, poleni, propolisi ve arı sütünün biyoaktif özelliklerinin belirlenmesi ve CCl₄ ile oluşturulan karaciğer hasarını önlemedeki rollerinin ortaya çıkarılmasıdır. Ayrıca, kullanılan arı ürünlerinin hangisinin karaciğer hasarını önlemede daha etkili olduğu belirlenmiş olacaktır. Çalışmanın sonuçlarının pozitif bulunması ile birlikte koruyucu tıp bakımından polen, propolis, bal ve arı sütü tüketiminin önemi ortaya çıkartılmış olacaktır. Arı ürünlerinin faydalı özelliklerinin literatüre kazandırılması, topluma çalışma sonuçlarının aktarılması ve böylece Türkiye'de arıcılık faaliyetlerinin artmasına katkı sağlayacaktır. Çalışma, başka gıda ve doğal ürün araştırmalarına altyapı ve referans çalışma oluşturacaktır.

1.2. Apiterapi

Apiterapi; bal, polen, arı sütü, propolis, arı zehri ve bal mumu gibi arı ürünlerinin tıbbi amaçlar için kullanılmasıdır (Stangaciu, 2006; Zumla ve Lulat, 1989). Apiterapinin kökeni insanlık tarihi kadar eski olup ilk kayıtlı metinler 6000 yıl öncesindeki antik Mısır'a kadar dayanmaktadır. Romalılar ve Yunanlılar da tıbbi amaçlar için arı ürünlerini kullanmışlardır (Molan, 2006; Moolenar vd., 2006; Lee vd., 2005). Apiterapi özellikle Çin, Kore, Rusya, Doğu Avrupa ve Güney Amerika'da hala yaygın olarak kullanılmaktadır (Christopher ve Kim, 1997).

Arı ürünleri bir besin maddesi olmasından başka pek çok biyolojik aktif özelliğe sahiptirler. Arı ürünlerinin biyolojik aktif özellikleri daha çok yapılarında yer alan ve fenolik karaktere sahip bileşiklerden ileri gelmektedir. Bu bileşikler bitkiler tarafından üretilen birer sekonder metabolit olup miktarları ve türleri toplandıkları bitki florasına, coğrafik özelliklere, arı ürünlerinin üretim şekline ve hasat zamanına bağlı olarak değişim göstermektedir (Tezcan vd., 2011).

Fenolik bileşikler birçok gıdanın antioksidan, antiinflamatuvar ve antibakteriyel kapasite gibi fonksiyonel özellikleri ile ilişkisinden sorumludur (Kerem vd., 2006; Huang vd., 2006; Haris vd., 2006). Bu gıdalara bal, polen, propolis ve arı sütünü örnek verebiliriz. Çünkü bu arı ürünleri, arıların çiçeklerden topladığı nektarda bulunan fenolik bileşenleri içermektedir (Marcucci vd., 2001; Fiorani vd., 2006). Hastalıkların bazıları oksidatif hasar sonucu olduğundan arı ürünlerinin iyileştirici özelliğinin antioksidan kapasitesinden ileri geldiği görülmektedir (Buratti vd., 2007).

1.3. Arı Ürünleri

1.3.1. Bal

Bal, bal arıları (*Apis mellifera*) tarafından çiçeklerin nektarlarından veya ağaç öz sularından toplanıp midelerinde değişime uğratıldıktan sonra kovanda depolanır (Crane, 1983, Molan, 1992; Özdemir vd., 2008). Bal, doğal bir ürün olması yanında insan vücudu için çok değerli bir gıda maddesidir. Bileşimi toplandığı bitki florasına bağlı olarak değişim göstermekle birlikte kuru ağırlığının yaklaşık %95'i şekerlerden oluşmuş olup geri kalanı fenolik maddeler, proteinler ve minerallerden oluşmaktadır (Bogdanov vd., 2004). Bal şekerlerinin %70'i monosakkaritlerden ve %10-15'i disakkaritlerden oluşmaktadır. Fruktoz ve glukoz temel monosakkaritlerden olup balın tatlılığından sorumlu olan şeker fruktozdur. Dolayısıyla bal iyi bir tatlandırıcıdır (Ouchemoukh vd., 2010; Crane, 1983; Molan, 1992; Özdemir vd., 2008). Bal, enerji verici bir besin maddesi olmasından başka bir önemli özelliği biyolojik olarak aktif bir molekül özelliğine sahip olmasıdır. Bal yapısında yaklaşık olarak %0,1–0,5 oranında fenolik bileşikler içerir ve bu bileşikler onun antioksidan, antiinflamatuvar, antiviral, antikarsinojen, antitumoral ve diğer biyolojik aktif özelliklerinden sorumludurlar (Mohammed ve Bash, 1997; Molan, 2001). Balın antibakteriyel özelliği fenolik bileşiklerden başka onun osmotik yapısından ve yapısında

bulunan glukoz oksidaz enzimi tarafından oluşturulan hidrojen peroksit (H_2O_2)'ten ileri gelmektedir (White vd., 1963; Molan, 1992; Molan, 2002).

Bal bileşimi, oldukça kompleks olup yapısında yaklaşık olarak 200 çeşit bileşik içermektedir (Samanalieva ve Senge, 2009; Gheldorf vd., 2002). Bileşimdeki bu karmaşadan dolayı hileli bal üretiminin oldukça kolay fakat hileli balların ayırt edilebilmesi oldukça zordur. Hileli bal üretimi ciddi bir etik problem olup ekonomik, sosyal ve tıbbi açıdan pek çok sorunlara yol açmaktadır. Kaliteli balların hileli ballardan ayırt edilmesinde balların biyolojik aktivitesinden sorumlu ajanlar olan fenolik bileşiklerin türleri ve miktarları son yıllarda öne çıkmaktadır. Tüm kaliteli balların toplam fenolik madde miktarları şeker şurubu ile hazırlanmış ballardan daha yüksek bulunmaktadır.



Şekil 1. Petekli bal

Balın rengi, açık sarıdan koyu amber rengine kadar değişiklik göstermektedir ve içerdiği polen, fenolik bileşikler, mineral madde ve hidrokümetil furfural (HMF) miktarına bağlı olarak değişim göstermektedir. Genel olarak koyu renkli balların açık renkli ballardan daha fazla mineral madde ve fenolik bileşik içeriğine sahip olup daha asidik yapıda olduğu ve buna bağlı olarak daha yüksek biyolojik aktivite gösterdiği bildirilmektedir (Gonzalez-Miret vd., 2005; Bertoncej vd., 2007; White 1984). Kestane, kekik, çam, püren balı gibi balların koyu renkli ballardan olduğu ve biyolojik olarak yüksek aktiviteye sahip olduğu bildirilmektedir (Beretta vd., 2005; Socha vd., 2009).

Bal, kronik deri ülserleri, mide-bağırsak hastalıkları ve göğüs hastalıklarında kullanılmaktadır (Toussoun vd., 1997). Klinik araştırmalarda ise gözde, katarakt hastalığına, konjiktivit ve çeşitli kornea rahatsızlıklarına karşı, direkt gözün içine uygulanarak kullanıldığı bildirilmektedir (Krell, 1996). Balın laboratuvar hayvanları

çalışmalarında hepatotoksik ajanlara karşı karaciğer koruyucu etki gösterdiği bildirilmiştir (Khadr vd., 2007).

1.3.2. Polen

Polen; çiçekli bitkilerde çiçeklerin erkek organlarınca üretilip dişi organın döllenmesini sağlayan basitçe çiçek tozu olarak da adlandırılan bitkilerin erkek cinsiyet hücreleridir (Doğaroğlu, 2008). Polen arıların büyüüp gelişmelerini tamamlamaları ve salgı bezlerinin gelişmesi için gerekli olan başlıca protein kaynağıdır. Polen olmadığı takdirde koloninin yavru yetiştirip hayatını devam ettirmesi imkansızdır (Schmidt, 1997).



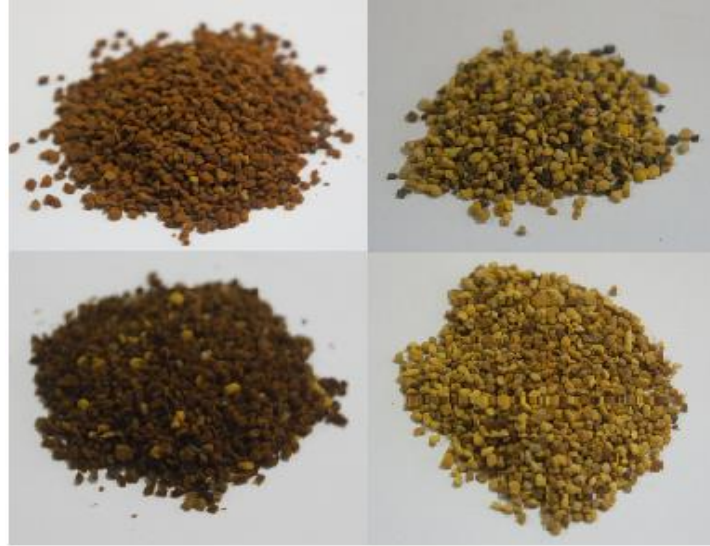
Şekil 2. Kaktüs çiçeği ve polen üreten stamenlerinin yakından görünüşü.

Apikültürel bir ürün olarak polen besinsel değerinden dolayı insanların diyetinde de öne çıkmaktadır. Polen zengin bir protein kaynağı olmasının yanı sıra karbohidrat, lipid, vitamin ve mineral de içermektedir (Sahinler, 2000; Campos vd., 2003). Besin öğelerinin yanında yüksek miktarda fenolik bileşenler de içermektedir (Bonvehi vd., 2001; Yamaguchi ve Tsui, 2002). Polenin antibakteriyel (Garcia vd., 2001; Proestos vd., 2005), antifungal (Garcia vd., 2001) ve antioksidan (Leja vd., 2007; Saric vd., 2009) özelliklere sahip olduğu bildirilmektedir. Sıçanlar üzerinde yapılan çalışmada polenin, karaciğer hastalıklarına karşı iyileştirici bir etkiye sahip olduğu bildirilmiştir (Habib vd., 1995; Yıldız, 2011).



Şekil 3. Polene bulanmış bal arısı

Yiyecek toplayan bir balarısı nadiren birden fazla çiçekten polen ve nektar toplar. Bu nedenle arıların arka bacaklarındaki bir polen peleti yalnızca bir veya bir kaç polen çeşidi içerir. Bunun bir sonucu olarak polen peletleri tipik bir renge sahiptir. En yaygın rastlanılan polen renkleri sarı, kırmızı, mor, yeşil, portakal rengi ve diğer çeşitli renklerdir. Arıların polenleri taşıması sayesinde doğadaki polinasyon adı verilen tozlaşma ve bitkilerin üremesi sağlanmaktadır. Polenler arıcılar tarafından kovanlara ilave edilen polen tuzakları ile toplanmaktadır. Bu polenler arıcılar tarafından kurutulmuş veya dondurularak muhafaza edilir.



Şekil 4. Çeşitli renklerde polenler

Polen alerjisi, iştahsızlık, baş ağrısı, bulantı, kusma, karın ağrısı, ishal, kaşıntı gibi reaksiyonlarla kendini gösterir ve bazen anafilaktik şok da görülebilir. Polen, polen alerjisi olan kişilerin tedavisinde büyük bir kaynak olarak (Schmidt, 1997), tıpta ayrıca prostat

hastalıklarının tedavisinde kullanılmaktadır (Ask-Upmark, 1967). Polen alerjisi daha çok havada uçan polenlerde görülürken, arılar tarafından toplanan polen alerjileri sık karşılaşılan bir durum değildir (Mizrahi, 1997; Campos vd., 1997).

1.3.3. Propolis

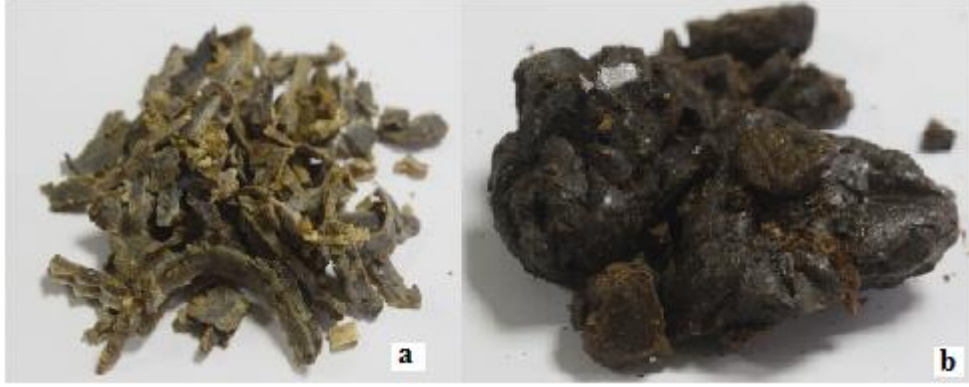
Propolis; bal arılarının bitki tomurcuk ve filizlerinden topladığı reçineleri bal mumu ve tükürük salgıları ile karıştırarak elde ettikleri bir üründür (Bankova vd., 2002; Hegazi, 1998). Arılar propolisi kovanın her türlü amaç için korunmasında kullanmaktadırlar. Bu bakımdan propolis mikroorganizmalara karşı koruyucu antibakteriyel etkili, kovanın duvarlarındaki çatlakları kapatıcı ve kovanın ısısını koruyucu izolasyon maddesi olarak kullanılmaktadır (Ghisalberti, 1979; Burdock, 1998; Chemid, 1996). Propolis genel olarak %50 reçine, %30 bal mumu, %10 uçucu yağ, %5 polen ve %5 diğer organik bileşiklerden oluşmaktadır (Gomez-Caravaca vd., 2006; Burdock, 1998). Flavonoidler ve fenolik asitler, propolisin ana tamamlayıcı bileşenleridir. Bu bileşikler doğal antioksidan etkiye sahiptir (Ivanovska vd., 1995; Basnet vd., 1997).

Propolisin kimyasal bileşimi ve fiziksel özellikleri de toplandığı bölgenin coğrafik yapısına, iklimine bağlı değişim gösterir. Genel olarak propolis koyu sarı, yeşil ve koyu kahverengiye doğru değişen renklere bulunabilir ve yaşı arttıkça rengi koyulaşmaktadır. Yaklaşık olarak 60–70°C arasında erime noktasına sahip olan propolis düşük sıcaklıklarda sert veya donmuş olarak bulunabilir, ayrıca 0°C’de kırılabilir özelliğe sahiptir (Woo ve Park, 1997; Burdock, 1998; Banskota vd., 2002; Ghisalberti, 1979).

Propolisin çözünürlüğü su ve organik çözücülerde düşük, alkollerde ise yüksek orandadır (Campos vd., 1997). Son yıllarda biyoaktif özelliklerinden daha iyi yararlanabilmek için kritik ekstraksiyon yöntemleri denenerek sulu çözeltileri elde edilebilmektedir (Nagai vd., 2003).

Propolis insanlığın ilkel çağlarından bu yana Mısırlılar, Araplar gibi birçok uygarlık arasında popülerlik kazanmış ve geleneksel tıpta kullanılır olmuştur (Abd El Hady ve Hegazi, 2002). Çünkü propolis antibakteriyel etki (Kujumgiev vd., 1999), antifungal ve antiinflamatuvar (Wang vd., 1993), antiviral (Amoros vd., 1994) anestetik ve antitümöral (Kimoto vd., 2001; Matsuno, 1995) gibi özelliklere sahiptir. Genel olarak tıpta kardiyovasküler ve dolaşım sistemi hastalıklarında, dermatolojide, doku yenilenmesi, ülser, ekzema, yara ve yanıklara karşı (Iwasaki, 1990) kanser tedavisinde, immün sistem ve

sindirim sistemi hastalıklarında tedavi edici olarak, karaciğer rahatsızlıklarına karşı ise koruyucu olarak kullanılmaktadır (Krell, 1996). Bazı propolis türlerinin biyolojik olarak daha aktif olduğu ve bu bakımdan başta kavak propolisi olmak üzere ökaliptus, kestane ve atkestanesi gibi ağaç türlerinden üretilen propolislerin en kaliteli propolis olduğu bildirilmektedir. Ayrıca propolisin toplandığı coğrafyanın bitki örtüsüne bağlı olduğu gibi toplanma tekniği de oldukça önemlidir. Örneğin, propolis tuzakları ile toplanan propolislerin çerçevelerden kazınarak alınan propolislerden daha kaliteli olduğu, büyük çatlaklardan toplanan propolislerin nispeten mum içeriğinin fazla olması nedeniyle daha az kalitesi olduğu bildirilmektedir (Kutluca vd., 2008).



Şekil 5. Propolis (a; Kazınarak alınmış propolis, b; Topak haline getirilmiş propolis)

Günümüzde propolisin biyoaktif özelliklerinden yararlanmak amacıyla propolisli kremler, diş macunları, öksürük şurupları, tabletleri ve gıda katkı maddeleri olarak ilaç ve gıda endüstrisinde de yaygın bir kullanımı vardır (Mohammadzadeh vd., 2007). Özellikle ağız ve diş sağlığının korumada şekerleme sanayinde de kullanılmaktadır.

1.3.4. Arı Sütü

Arı sütü; işçi arıların hipofarengal (boğaz) ve mandibular glandlarından (alt çene) salgılanır ve kraliçe arının beslenmesinde ve gelişmesinde önemli rol oynar (Tamura vd., 2009; Schmidt, 1996). Arı sütü kremi kıvamda homojen bir maddedir. Sarı, beyaz ve bej renklerde, fenolik bir kokuya ve ekşi bir tada sahiptir (Lercker vd., 1992). Viskozitesi su içeriğine ve tazeliğine göre değişebilmektedir, oda sıcaklığında ya da 5°C'de tutulduğunda daha viskoz olmaktadır (Takenaka vd., 1986).



Şekil 6. Arı sütünde larva

Arı sütü yaklaşık olarak %12-15 protein, %10-16 karbohidrat, %3-6 lipid ve geri kalan %60-70 oranda vitamin, tuz, serbest amino asitler ve nem gibi pek çok madde içermektedir (Tamura vd., 2009; Nagai ve Inoue, 2004). Arı sütünün antioksidan (Viuda-Morteks vd., 2008), antiinflamatuvar (Kohno vd., 2004), antitümör (Nakaya vd., 2007; Townsend vd., 1960) ve antibiyotik (Blum vd., 1959; Melliou ve Chinou, 2005) etkiye sahip olduğu deneysel çalışmalarda gösterilmiştir.



Şekil 7. Larva transferinden 2 gün sonra arı sütü hasadı

Yapılan analizler arı sütünün damar genişletici ve tansiyon düşürücü olduğu (Shinoda vd., 1978), büyüme hızını artırdığı (Kawamura, 1961), dezenfektan (Yatsunami ve Echigo, 1985) ve kolesterol düşürücü etkiye sahip olduğu (Nakajin vd., 1982) bilgisini vermektedir. Arı sütünün karaciğer karşı koruyucu etkisinin de olduğu sıçanlarda yapılan çalışmalarda ortaya konmuştur (Kanbur vd., 2009).

1.3.5. Arı Zehiri

Arı zehiri, “Arıların zehir torbasında oluşan ve içerisinde başlıca mellitin, apamin, MCD-peptidi, histamin, hyaluronidaz, fosfolipaz-A2 bulunan, keskin kokulu, acı tatta, sarımtırak renkte, sıvı, hava ile temasında çabuk kuruyup kristalize olan bir maddedir” şeklinde tanımlanmıştır (Anonim, 1989).



Şekil 8. Arı zehiri

Arı zehiri eski çağlardan beri ağrı azaltıcı ve ağrılı hastalıklara karşı tedavi edici olarak kullanılmaktadır (Billinham vd., 1973). Arı zehiri tedavisinin alternatif tıpta romatoid artirit, MS (Multiple Sclerosis), yanıklar, enfeksiyon ve zona gibi birçok hastalığın tedavisinde etkili olduğuna inanılmaktadır (Son vd., 2007).

1.3.6. Balmumu

Balmumu, 2-3 haftalık genç işçi arıların son 4 çift karın halkalarındaki mum salgı bezlerince salgılanan, karın halkaları arasından çıkarken hava ile teması sonucu katılaşarak pulcuk haline geçen, salgılandığı anda beyaz renkte olan ve daha sonra koyulaşan bir arı ürünüdür (Doğaroğlu, 2008). Arılar bu maddeyi yavru yetiştirmek, bal ve polen depolamak üzere gerekli depo gözlerini örmek için salgırlar (Genç, 1993; Schmidt, 1997).



Şekil 9. Doğal balmumu

Kimyasal yapısında, alkali esterler (%72), serbest yağ asitleri (%14), hidrokarbonlar (%11), serbest alkoller (%1) ve bilinmeyen maddeler (%2) bulunur (Doğaroğlu, 2008).

Balmumu, arıcılık sektöründe temel petek yapımında, marangozculukta ağaçtan yapılmış eşyaların parlatılmasında, parke verniği yapımında ve boya endüstrisinde çeşitli amaçlarla kullanılır. Küçük heykel ve biblo endüstrisinde, madeni kap ve şişe kapaklarının yapımında yine bal mumundan yararlanır. Ayrıca ışık kaynağı olan mum üretiminde, parfümeri endüstrisinde, kozmetikte dudak boyası yapımında kullanılır. Bunların yanında insan sağlığı açısından önemli çeşitli merhem türü ilaçların yapımında, yüz kremlerinin yapımında ve dişçilik alanında da bal mumunun kullanıldığı bildirilmektedir (Sönmez ve Atlan, 1992; Schmidt, 1997; Krell, 1996).

1.4. Serbest Radikaller ve Oksidatif Stres

Serbest radikaller, bir veya daha fazla ortaklanmamış elektron içeren atom, molekül veya iyonlardır (Kopani vd., 2006; Staroverov ve Davidson, 2000). Bugün serbest radikallerin normal metabolizmaya ait bir ürün olduğu bilinmektedir. Radikal metabolitler aslında aerobik organizmaların kaçınılmaz bileşikleri olup hücrelerde kontrollü kullanımları ile bir dizi enzimin sentezi ve birçok organizmanın antibakteriyal savunmasında gereklidirler (Halliwell ve Gutteridge, 1989). Radikallerin pek çok hücrede moleküler değişimlere ve gen mutasyonlarına yol açtığı artık iyi bilinmekte olup yaşlanma, hücre hasar ve doku yıkımında rol aldığı kabul edilmektedir (Storz ve Imlay, 1999). Serbest radikallerin başlıca sigara, alkol ve lipit metabolizması ürünleri, virüsler, güneş

ışınları, X ışınları ve kozmik ışınlar, sanayi atıkları, otomobil egzoz gazları, ozon, ağır metaller, kirli su ve havadan da oluşabildiği bilinmektedir (Sies, 1991).

Biyolojik serbest radikaller oldukça dayanıksız ve aynı zamanda reaktif moleküller olup, elektronları hücredeki diğer moleküllerle etkileşime girerek oksidatif stres (hasar) meydana getirirler. Oksidatif stres, organizmadaki pro-oksidan ve antioksidan dengenin bozulması olarak tanımlanmaktadır. Pro-oksidan sistem antioksidan sisteme baskın geldiğinde yani fazla miktarda oksidan bileşen üretildiğinde oksidatif stres ve dolaylı olarak serbest radikaller oluşmaktadır (Kopani vd., 2006).

Biyolojik sistemlerdeki en önemli serbest radikaller, oksijen içeren serbest radikaller olup bunlara serbest oksijen radikalleri (SOR) adı verilmektedir. SOR'lar oksijenin suya indirgenmesi sırasında ve farklı oksidatif stres mekanizmalarıyla oluşmaktadırlar. Oksijenin kendisi de bir radikal olup biradikal olarak adlandırılır ve yine singlet oksijen molekülü de radikalik bir ajandır. Oksijenin eksik indirgenmesi sonucu oluşan süperoksit, hidrojen peroksit, hidroksil radikalleri en iyi bilinen radikallerdir (Akkuş, 1995). Moleküler oksijenin bir elektron almasıyla süperoksit ($O_2^{\cdot-}$), iki elektron almasıyla hidrojen peroksit, üç elektron almasıyla hidroksil (OH^{\cdot}) radikali oluşmaktadır. Bu radikaller oksijenin toksik etkisinin gerçek nedenini oluştururlar (Mccord, 1985; Bast vd., 1991; Cheeseman ve Slater, 1993). Hidroksil radikali bilinen en zararlı radikal olup daha çok radyokatif ışımaya sonucu oluşur. Biyolojik sistemlerde sıklıkla oluşabilen reaktif oksijen türleri Tablo 1'de verilmektedir.

Tablo 1. En sık karşılaşılan reaktif oksijen türleri ve bazı özellikleri

| Adı | Simge | Etkisi |
|------------------------|-----------------|--|
| Hidrojen radikali | H^{\cdot} | Bilinen en basit radikal |
| Süperoksit radikali | $O_2^{\cdot-}$ | Oksijen metabolizmasının ilk ara ürünü |
| Hidroksil radikali | OH^{\cdot} | En toksik (reaktif) oksijen metaboliti radikali |
| Hidrojen peroksit | H_2O_2 | Reaktivitesi çok düşük, moleküler hasar yeteneği zayıf |
| Singlet oksijen | O_2 | Yarılanma ömrü kısa, güçlü oksidatif form |
| Perhidroksi radikali | HO_2^{\cdot} | Lipidlerde hızlı çözünerek lipid peroksidasyonunu artırmaktadır |
| Peroksil radikali | ROO^{\cdot} | Perhidroksile oranla daha zayıf etkili, lipidlere lokalize olma yeteneği |
| Triklorometil radikali | CCl_3^{\cdot} | CCl_4 metabolizması ürünü, karaciğerde üretilen bir radikal |
| Tiyil radikali | RS^{\cdot} | Sülfürlü ve çiftlenmemiş elektron içeren türlerin genel adı |
| Alkoksil radikali | RO | Organik peroksitlerin yıkımı ile üretilen oksijen metaboliti |
| Azot monoksit | NO | <i>L</i> – argininden <i>in vivo</i> üretilir |
| Azot dioksit | NO_2 | NO 'in oksijen ile reaksiyonundan üretilir |

1.5. Antioksidanlar

Oksidasyonu yavaşlatan veya durduran ya da oluşmasını engelleyen her türlü moleküle antioksidan adı verilmektedir. Antioksidanlar hücrelere zarar veren serbest radikallerle reaksiyona girip onları etkisiz hale getirerek, kanser dahil pek çok hastalığa ve erken yaşlanmaya neden olabilecek zincir reaksiyonları önleyen, yok eden veya etkilerini azaltan moleküllerdir (Young ve Woodside, 2001). Antioksidanlar endojen (organizma tarafından sentezlenen) ve eksojen (dışarıdan besinlerle alınan) kaynaklı olmak üzere başlıca iki ana gruba ayrılırlar (Halliwell, 1990; Halliwell vd., 1992). Endojen antioksidanlar; enzimatik yapıda olabilecekleri gibi nonenzimatik yapıda da olabilirler (Jerry vd., 2000).

Enzimatik antioksidanlar arasında; süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT), glutatyon peroksidaz (GPx), glutatyon redüktaz (GR), enzimatik olmayan antioksidanlar arasında redükte glutatyon (GSH), bilirubin, ferritin, albumin, seruloplazmin ve ürik asit sayılabilir (Young ve Woodside, 2001; Fang vd., 2002; Mantle ve Preedy, 1999). Eksojen antioksidan ise daha çok bitkiler tarafından sentezlenen çeşitli vitamin ve fenolik maddeler olup dışarıdan organizmaya alınıp etkinlik göstermektedirler (Kolaylı ve Keha, 1999).

Antioksidanların oksidatif hasardan koruma mekanizmaları şu şekilde özetlenebilir (Splettstoesser ve Werner, 2002):

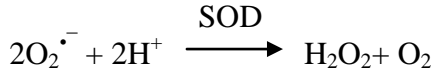
1. Enzim aktivitesi üzerinden veya doğrudan kimyasal reaksiyonlar yoluyla,
2. Oksijenden türeyen moleküllerin oluşumunu engellemek suretiyle,
3. Radikallerle doğrudan kimyasal yolla temasa geçerek,
4. Üretilmiş radikallerin temizlenmesi (detoksifikasyon) yoluyla,
5. Zayıf reaktif türlerin daha zararlı türlere dönüşümü için gereksinim duyulan metal iyonlarını bağlayarak,
6. Hedef molekülde oluşan hasarı onarma yoluyla,
7. Hasar çok büyük olduğunda, hasara uğramış molekülü uzaklaştırarak.

1.5.1. Enzimatik Antioksidanlar

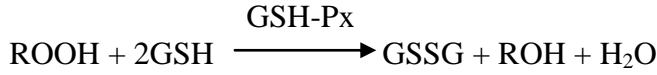
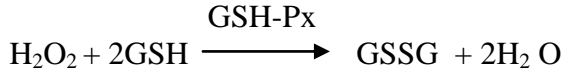
Katalaz (CAT) tariflenen ilk antioksidan enzimdir ve hidrojen peroksiti suya ve oksijene çevirir (Young ve Woodside, 2001). Katalaz hücre içerisinde daha çok peroksizomlarda (%80) lokalizedir (Halliwell, 1994).



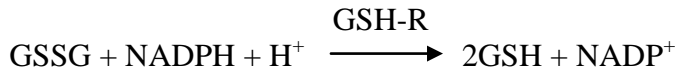
Enzimatik antioksidanlardan süperoksit dismutaz (SOD), organizmada substrat olarak serbest radikal kullanan tek enzim olup oksijenin hidrojen peroksite dönüşümünü katalizler (Bast ve Guido, 1991; Battistoni vd., 1998).



Glutasyon peroksidaz (GSH-Px), hücre içinde oluşan hidrojen peroksit ve lipid peroksitlerini indirger (Townsend vd., 2003). GSH-Px aşırı hidrojen peroksit varlığında glutasyonun (GSH) okside glutatyona (GSSH) oksidasyonunu katalizler ve oluşan H_2O_2 'i de suya dönüştürülür (Bray, 2000; Fang vd., 2002).

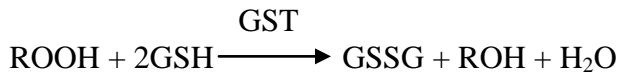


Glutasyon redüktaz (GSH-R), yükseltgenmiş glutasyonun (GSSG), indirgenmiş glutatyona (GSH) dönüşümünü sağlar.



Gerekli olan NADPH pentoz fosfat yolundan sağlanmaktadır (Halliwell ve Gutteridge, 2000; Griffith, 1999).

Glutasyon-S-transferazlar (GST), başta araşidonik asit ve lineloat hidroperoksitleri olmak üzere lipid peroksitlerine karşı, selenyum-bağımsız GSH-Px aktivitesi göstererek bir antioksidan savunma mekanizması oluştururlar (Sies, 1999; Fang vd., 2002).



1.5.2. Enzimatik Olmayan Antioksidanlar

Glutasyon (GSH); DNA sentezinde ve hasarlı DNA parçalarının onarılmasında, metabolik fonksiyonların yerine getirilmesinde, zehirli maddelerin inaktif hale dönüştürülmesinde (detoksifikasyon) ve serbest radikallerin olası hasarlarının önlenmesinde görev yapmaktadır (Chavan vd., 2005).

Askorbik asit (C vitamini); güçlü bir indirgeyici ajan ve antioksidandır. Süperoksit, peroksil ve hidroksil radikalleri ile reaksiyona girerek bir ara ürün olan semidehidroaskorbat yoluyla metaboliti dehidroaskorbik asidi (DHA) oluştururken reaksiyona girdiği radikali de etkisiz hale getirir. Membran içindeki ve ekstrasellüler dokulardaki lipid peroksidasyonunu önler. Askorbik asidin radikalik formu glutasyon sistemi tarafından askorbik aside yeniden dönüştürülür (Akkuş, 1995; Mendiratta, 1998).

E vitamini güçlü bir antioksidandır ve membran fosfolipitlerinde bulunan çoklu doymamış yağ asitlerini serbest radikal etkilerinden koruyucu bir savunma elemanıdır. Her bir E vitamini molekülü iki oksidasyon zincirini durdurabilir. Singlet oksijenin kuvvetli bir tutucusu olmasının yanında peroksi, hidroksil ve süperoksit radikali ile direkt olarak reaksiyona girebilir. Oluşan tokoferoksil radikali glukuronik asitle konjuge edilerek safra yoluyla atılır (Seven ve Candan, 1996; Bray, 2000).

A vitamininin metabolik ön maddesi olan β -karoten güçlü singlet O_2 temizleyicidir. Ayrıca hidroksil, peroksil ve alkoksil radikalleriyle doğrudan reaksiyon vererek lipid peroksidasyonunu önleyebilir (Kelly, 1998; Gruszecki ve Strzalka, 2005).

Ürik asit; fizyolojik koşullarda singlet oksijen, hipoklorit ve hidroksil radikali gibi reaktif bileşikleri baskılar. Fakat süperoksit radikali ile doğrudan reaksiyona girmez. Peroksit kaynaklı lipid peroksidasyonuna karşı korur. Bu da üratın antioksidan etkileri olduğunun bir göstergesidir (Becker, 1991).

Albümin yapısında bulunan çok sayıdaki sülfidril grubu aracılığıyla bakır iyonlarını bağlar ve bakır bağımlı lipid peroksidasyonu ile hidroksil oluşumunu inhibe eder (Bray, 2000; Zang vd., 2002).

Bilirubin; hem katabolizması sonucu oluşur. Lipid peroksidasyonunu inhibe ettiği ve hidroksil ve hidrojen peroksit radikallerinin temizleyicisi olduğu bilinmektedir (Bray, 2000; Zang vd., 2002).

1.6. Bitkisel Kaynaklı Biyoaktif Bileşikler

Bitkiler, yüzyıllardan beri tüm dünyada gıdaların tat ve aromasının artırılmasında (Shelef, 1983), gıdalardaki istenmeyen kokuların giderilmesinde (Giese, 1994) ve hepsinden önemlisi de tedavi amaçlı olarak kullanılmıştır. 20. yüzyılın başından itibaren tedavi amaçlı kullanılan bitkilerin çeşitli özellikleri laboratuvarlarda araştırılmaya başlanmıştır (Dığrak vd., 1998).

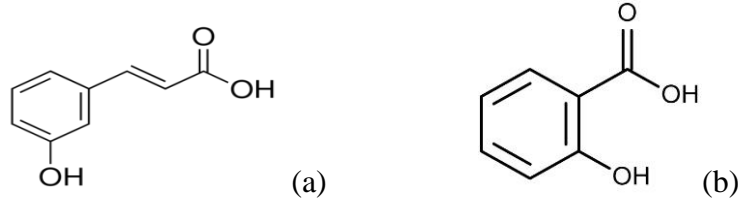
Bitkiler tarafından sentezlenen ve sekonder metabolitler olarak adlandırılan pek çok biyomolekül; bitkilerde sinyalizasyon (mesajcı), antioksidan, antimikrobiyal, insektisit, herbisitler gibi koruyucu rollere sahiptir. Bu nedenle (karbohidratlar, proteinler ve yağların sentezinden sonra) bunlar "ikincil bitki ürünleri" veya "fitokimyasallar" diye adlandırılırlar (Akyüz, 2007). Fitokimyasallar, özellikle sebze ve meyvelerdeki fenolikleri, flavonoidleri ve karotenoidleri kapsarlar.

1.6.1. Fenolik Bileşikler

Fenolik maddeler aromatik halkasında bir veya daha fazla hidroksil grubu içeren bileşiklerdir (Shahidi ve Nacz, 1995). Fenolik bileşikler, fenolik asitler ve flavonoidler olarak iki gruba ayrılırlar (Cemeroğlu, 2004). Fenolik bileşikler veya polifenoller bitkilerde en fazla bulunan sekonder metabolitlerden olup bugün itibariyle bitki aleminde 5.000'den daha fazla fenolik yapının olduğu belirtilmektedir (Bravo, 1998). Polifenoller, bitkilerde çeşitli meyve, sebze, kuruyemiş, tohum, çiçek, kök ve gövde kısımlarında doğal olarak sentezlenen maddelerdir (Wollgast ve Anklam, 2000). Fenolik bileşiklerin büyük çoğunluğunun potansiyel olarak antioksidan, antikarsinogenik, antimutajenik, antibakteriyel, antiviral ve antiinflatuar özelliğe sahip olduğu yapılan çalışmalarla ortaya konulmuştur (Almaraz vd., 2007; Evers vd., 2005; Harris vd., 2006; Middleton, 1998). Bitkiler sınırsız sayıda aromatik ve alifatik bileşik üretebilme yeteneğine sahip canlılar olup bitkiler ile yapılan tedavilere fitoterapi adı verilmektedir. Yapılan bilimsel araştırmalarda bitkilerin içerdikleri fenolik madde miktarları ile biyolojik aktif özellikleri arasında lineer bir ilişkinin olduğu bildirilmektedir. Fenolik maddeler bitkisel kaynaklı besinlerin lezzetinden, aromasından ve görünümünden sorumlu olduğu gibi onun biyolojik aktif özelliğinden de sorumludurlar.

1.6.1.1. Fenolik Asitler

Genelde, fenolik asitler bir karboksilik grubuna sahip olan fenollerdir. Fenolik asitler, hidroksisinnamik asit ve hidroksibenzoik asit türevleri olmak üzere başlıca iki alt sınıfa ayrılırlar (Şekil 10), içerdikleri hidroksi ve metoksi gruplarının yerleşimi ve sayılarına göre çeşitlenirler.



Şekil 10. (a); Hidroksisinnamik asit, (b); Hidroksibenzoik asit

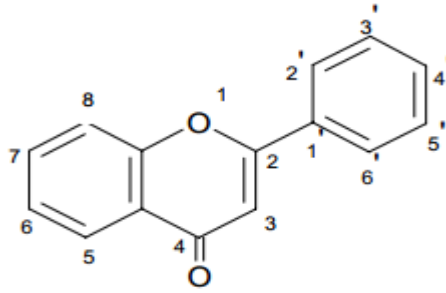
Bu iki fenolik bileşenden türeyen fenolik asitlerin temel yapı aynı kalsa da, aromatik halkasındaki hidroksil gruplarının sayısı ve pozisyonuna göre değişerek farklılık oluşturmaktadır (Robbins, 2003). Çok yaygın olarak bulunan fenolik asitler: kafeik asit, ferulik asit, *p*-kumarik asit ve *o*-kumarik asitlerdir. Fenolik asitler, gıdaların renkleri, duyu kaliteleri, beslenme ve antioksidan özellikleri ile ilişkilidir. Dolayısıyla, fenolik asitlerin antioksidan özellikleri ve potansiyel sağlık yararlarının ortaya çıkması ile bu bileşiklere ilgi artmaktadır (Robbins, 2003).

| Asit | R1 | R2 | R3 | Asit | R1 | R2 | R3 |
|---------------------------|-------------------|----|-------------------|-------------------|-------------------|----|-------------------|
| <i>p</i> -Hidroksibenzoik | H | OH | H | <i>p</i> -Kumarik | H | OH | H |
| Pirokate şük | H | OH | OH | Kafeik | H | OH | OH |
| Vanilik | CH ₃ O | OH | H | Ferulik | CH ₃ O | OH | H |
| Siringik | CH ₃ O | OH | CH ₃ O | Sinapik | CH ₃ O | OH | CH ₃ O |
| Gallik | OH | OH | OH | | | | |

Şekil 11. Fenolik asitlerin genel yapısı: a) Benzoik asit türevleri b) Sinamik asit türevleri (Shahidi ve Nacz, 1995)

1.6.1.2. Flavonoidler

Flavonoidlerin karbon iskeleti, iki fenil halkasının propan zinciri ile birleşmesinden oluşan ve 15 karbon atomu içeren, difenilpropan (C6-C3-C6) yapısındadır. Flavonoidlerin yapısındaki -OH grupları, reaktif özelliklerinden dolayı kolaylıkla glikozitlenir (Bilaloğlu, ve Harmandar, 1999; Saldamlı, 2007). Flavonoidler yapısal olarak beş gruba ayrılırlar; Antosiyanidinler, flavonlar ve flavonollar, flavanonlar, kateşinler ve löykoantosiyandinler ve proantosiyandinler.



Şekil 12. Flavonoidlerin genel yapısı (Shahidi ve Nacz, 1995).

1.6.1.2.1. Antosiyaninler

Antosiyaninler meyve ve sebzelerin pembe, kırmızı ve mor tondaki çeşitli renklerini veren suda çözünebilir nitelikteki renk pigmentleridir (Cemeroğlu, 2004). Antosiyaninler bir aglikon (antosiyanidin), şeker ve bazen fenolik ve minör organik asitlerden oluşur (MacDougall, 2002). Şeker kısmı genellikle ramnoz, galaktoz, ksiloz ve arabinozdan meydana gelir. Ayrıca *p*-kumarik, kafeik ve ferrulik asit gibi asitlerle de açillenmiş olabilir (Shahidi ve Nacz, 1995; Francis, 1985; Kurılıç vd., 2005). Açillenmiş antosiyaninlerin, açillenmemiş olanlara göre daha stabil olduğu saptanmıştır (Cemeroğlu, 2004).

Antosiyanin ekstraktlarının sağlık açısından yararlı bileşikler olduğu ve farmakolojik özellikleri nedeniyle çeşitli hastalıklarda tedavi etme amacıyla kullanıldığı bilinmektedir. Antosiyaninlerin arterioskleroz ve kanser riskini azaltma, kan dolaşımı bozukluklarında ve bazı göz hastalıklarında tedavi edici niteliği bulunduğu ortaya konulmuştur (Kurılıç vd., 2005; Kırca, 2004).

1.7. Karaciğer

Karaciğer; gastrointestinal sistem ve portal dolaşım ile periferik organlar ve sistemik dolaşım arasında yer alan, hem hepatik arter, hem de portal ven ile kanlanan çeşitli fonksiyonlara sahip vücudun deriden sonra en büyük organı ve en büyük bezidir. Karaciğer, fizyolojik ve biyokimyasal olarak oral ve parenteral yolla alınan tüm ilaç, toksik maddeler ve mikrobik ajanlarla karşılaşan ve onların zararlı etkilerine maruz kalan bir organdır. Karaciğer sürekli olarak vücuda alınan zararlı molekülleri detoksifiye eder veya onların oluşturduğu hasara rejenerasyon yeteneğiyle karşılık verir (Akşit ve ark., 1998; Zimmerman ve Maddrey, 1987; Crawford, 2002). Ayrıca karaciğer kan şekerinin düzenlenmesinden mineral maddelerin depolanmasına, safra asitlerinin ve kolesterolün üretiminden, kan pıhtılaşma faktörlerinin düzenlenmesine kadar vücuda ait tüm biyosentez ve regülasyon özellikleri yürüten yegane organdır. Karaciğer hücreleri olarak adlandırılan hepatositler vücudun en fazla fonksiyon gören hücreleridir (Diler ve Tietz, 2005).

Karaciğer fonksiyonları genellikle ksenobiyotikler (vücudun maruz kaldığı tüm yabancı maddeler; alkol, ilaç ve diğer kimyasallar gibi) veya enfeksiyonlar tarafından bozular. Ksenobiyotiklere sürekli veya aşırı maruz kalma durumunda tedavi edilmemiş olgularda malign (kötü huylu) lezyonlar veya siroz meydana gelir. Bugünlerde birçok insan alkol, kimyasallar ve enfeksiyonlar tarafından indüklenen karaciğer hasarına maruz kalmaktadır. Bu yüzden akut ve kronik karaciğer hastalıkları dünyada ciddi sağlık sorunları olmaya devam etmektedir. Silimarin, *Phyllanthus amarus* ve glisirizin gibi bazı doğal bileşikler karaciğer hastalıklarına karşı koruyucu rol oynadığı bildirilmektedir (Shaker vd., 2010; Pramyothin vd., 2007; Wan vd., 2009).

Kronik karaciğer hastalıkları, hepatosellüler hasar ile karakterize olup, genellikle karaciğer fibrozisi ve sirozu ile sonuçlanmaktadır (Armbrust vd., 1997). Siroz; karaciğerin anatomik yapısının fibrozis ve nodülleşme sonucu bozulmasıdır. Siroz, ilerleyici ve kronik bir karaciğer hastalığıdır (Sherlack ve Dooley, 1987). Sıklıkla alkolden kaynaklanır. Ancak CCl₄ zehirlenmesi, enfeksiyöz hepatit gibi virus hastalıkları ve safra kanallarının enfeksiyonu gibi durumları takiben de siroz görülebilir (Güzel, 1996). İlerleyici bir hastalık olan siroz genellikle ileri evrelere ulaşmadan bulgu vermez. Sirozda klinik bulgular karaciğerdeki hasarın derecesi ve portal hipertansiyonla ilişkilidir (Kadayıfçı, 1998).

1.8. Karbon Tetraklorür (CCl₄) ve Metabolize Edilmesi

Karbon tetraklorür (CCl₄) saydam, yanıcı olmayan ve kolayca buharlaşabilen renksiz bir sıvıdır (Kus vd., 2005). Ayrıca CCl₄, kuru temizleme amaçlı, çözücü ve eskiden dondurucu olarak kullanılan bir hidrokarbon bileşiğidir (Farrell, 1998). CCl₄ vücuda solunum, sindirim ve deri yoluyla alınabilir (Şişmanoğlu, 1995). Deneysel olarak yapılan çalışmalarda CCl₄'ün karaciğerde, mitotik aktiviteyi artırdığı, hepatositlerde dejenerasyon, hepatik yağ dejenerasyonu, mononükleer hücre infiltrasyonu, fibrozis, siroza ve kansere neden olduğu gösterilmiştir (Manibusan vd., 2007; Farrell, 1998).

Sıçanların ve insanların karaciğer gibi temel organları ve metabolizma sitemleri benzerlikler gösterdiğinden dolayı (Kogure vd., 1999) önce sıçanlar üzerinde deneysel çalışmalar yapmak ve olumlu sonuç alınması halinde bir takım testlerden sonra insan organizmasında çalışmak öteden beri kabul edilen yoldur. Bu amaçla, CCl₄ ile sıçanların karaciğerleri hasara uğratarak arı ürünleri ile tedavi modeli uygulanmıştır.

CCl₄, karaciğerde sitokrom P450 tarafından triklorometil (CCl₃•) radikale dönüştürülür. Triklorometil serbest radikali oluştuktan sonra lipidler ve proteinler ile kovalent bağlar oluşturarak triklorometil peroksite (CCl₃O₂•) veya hidrojen atomlarını kaybetmiş olan kloroform formuna dönüşür (Naziroğlu vd., 1999; Slater, 1982; Recknagel vd., 1989). Daha sonra lipit hidroperoksit ve malondialdehit gibi yapılar ile kısa zincirli karbohidratlar oluşur (Recknagel vd., 1989; Slater, 1982, Ogeturk vd., 2008). Oluşan bu serbest radikaller hücre membranlarındaki fosfolipidlerde bulunan yağ asitlerinin peroksidasyonuna yol açarak hücre harabiyeti meydana getirirler. Vücuttan atılımı başta solunum yoluyla ve çok az miktarlarda dışkı ve idrar yoluyla (ATSDR, 2005).

2. YAPILAN ÇALIŞMALAR

2.1. Kullanılan Cihazlar

Çalışmalarımızda kullanılan cihazlar ve satın alındıkları firmaları gösteren bilgiler Tablo 2’de verilmiştir.

Tablo 2. Çalışmalarda kullanılan cihazlar

| Cihaz | Marka/Model |
|-------------------------|---|
| UV-VIS spektrofotometre | Spectro UV-VIS Double PC-8 auto cell, Labomed Inc, Culver City, USA |
| Dondurucu | Joun sa Deep Freezer VXE490, Czech Republic |
| Homojenizatör | Ika-Werke, Ultra Turrax [®] T25 Basic, Germany |
| pH Metre | Hanna pH 213, Romania |
| Santrifüj | Hettich, 1406 Type, Universal 320R, Germany |
| Vorteks karıştırıcı | Heidolph, Reaxtop Vorteks Karıştırıcı |
| Su banyosu | Nüve, ST 402 |
| Magnetik karıştırıcı | Heidolph MR 3001, Germany |
| Etüv | Binder ED 53, Germany |
| Kjeldahl düzeneği | Gerhardt, Turbotherm, Germany |
| Rotary evaporatör | IKA, RV 05 basic, China |
| Sıçan terazisi | Kern-Sohn-GmbH, PCB-800-1, Germany |
| Mikro plate okuyucu | Tunable, Versa Max, Microplate reader, USA |
| Otoanalizör | Roche, Cobas 6000, Made in Germany |
| Otomatik mikrotom | Leica RM 2255 |
| Mikroskop | Olympus BX-51; Olympus Optical Co, Ltd, Tokyo, Japan |

2.2. Kullanılan Kimyasallar

Kullanılan kimyasallar analitik saflıkta olup, metanol, etanol, neokuproine, fosfotungustik asit, tiyobarbitürik asit (TBA), trikloroasetik asit (TCA), 1,1,3,3-tetrametoksipropan ve NaOH Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Germany) ve Merck (Darmstadt, Germany) firmalarından temin edilmiştir.

Butillenmiş hidroksi toluen (BHT) Applichem (Darmstadt, Germany) ve Trolox[®] (6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametil kroman-2-karboksilik asit) Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Germany) firmasından, 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), Folin-Ciocalteu’s

phenol reaktifi ve 2,4,6-tri (2-pridil)-S-triazin (TPTZ) Fluka Chemie GmbH (Buchs, Switzerland) dan, sodyum asetat, ferrik klorür, glisial asetik asit, HCl, KCl, sodyum karbonat, H₂SO₄ ve karbon tetraklorür Merck (Darmstadt, Germany) firmasından temin edilmiştir. Zeytinyağı için Komili, sızma zeytinyağı kullanılmıştır.

2.3. Kullanılan Çözeltiler

Çalışmalarda kullanılan çözeltiler ve hazırlanışları Tablo 3’de verilmiştir.

Tablo 3. Çözeltiler ve hazırlanışları

| Çözeltiler | Hazırlanışı |
|--|---|
| 0,2 N Folin-Ciocalteu | 2 N Folin reaktifinden 1:10 oranında distile suyla seyreltilerek kullanılır. |
| Trolox [®] | 12,65 mg Trolox [®] 50 mL’ye etanolle tamamlanır. |
| FRAP | 300 mM pH 3.6 asetat tamponu: 10 mM TPTZ: 20 mM FeCl ₃ (10:1:1) |
| TPTZ | 234,249 mg TPTZ stok maddeden tartılıp, 75 mL 40 mM’lık HCl içinde çözülür. |
| Asetat Tamponu | 2,325 g NaCH ₃ COO.3H ₂ O üzerine 12 mL glasiyel asetik asit ilave edilir. 750 mL’ye distile suyla tamamlanır. |
| HCl (40 mM) | %37’lik HCl’den 340 µL alınır, son hacmi 100 mL’ye distile suyla seyreltilir. |
| FeCl ₃ | 324,4 mg FeCl ₃ distile suyla 100 mL’ye tamamlanır. |
| 0,084 N H ₂ SO ₄ | % 98’lik H ₂ SO ₄ ten 570 µL alınır. İçinde bir miktar distile su bulunan 250 mL’lik balon jøjeye pipetlenir ve hacim 250 mL’ye tamamlanır. |
| %10’luk Fosfotungustik asit | H ₃ (W ₃ O ₁₀) ₄ .H ₂ O’dan 0,5 g tartılıp bir miktar distile suda çözülür, 4,5 mL’ye distile suyla tamamlanır. |
| 0,8 mM CuCl ₂ | 0,00866 g CuCl ₂ tartılır 80 mL distile suda çözülür. Tartım litre bazında hazırlanıp, seyreltilir. |
| Tiyobarbütirik asit (TBA) reaktifi-Plazma için | 0,335 g TBA tartılır. Bir miktar distile suda ısıtarak manyetik karıştırıcı ile çözüldükten sonra hacim 50 mL’ye tamamlanır. Sonra 50 mL asetik asit ile karıştırılır (Günlük hazırlanır.). |
| Tiyobarbütirik asit (TBA) reaktifi-Eritrosit paketi için | 500 µL 1N NaOH çözeltisine 0,1 g TBA eklenir, 4 mL’ye distile suyla tamamlanır. Isıtılır ve soğutulur. Son hacim distile suyla 10 mL’ye tamamlanır. |
| 100 nmol/ml’lik 1,1,3,3Tetrametoksipropan (TMP) standardı. | 164,7 µL TMP alınır, 0,1 N HCl ile çözerek hacmi 100 mL’ye seyreltilir, 50°C’da 1 saat inkübe edilir. Bu uzun süre saklanabilir. Bundan distile suyla seyreltilme yoluyla istenilen konsantrasyonlar elde edilir. |
| PBS çözeltisi | 0,14M NaCl (58,44g/mol), 2,7mM KCl (74,56g/mol), 8,1mM Na ₂ HPO ₄ .7H ₂ O (358,14g/mol) tüm malzemeler karıştırılır ve pH=7,4’e ayarlanır. Son hacim 250 mL’ye tamamlanır. |

Tablo 3'ün devamı

| | |
|--|--|
| Sodyum azidli PBS (0,4 M) | 0,026 g sodyum azid (Na-N_3) 1 mL distile suda çözülür ve 100 mL'ye PBS ile tamamlanır. |
| Trikloroasetikasit (TCA) | Trikloroasetikasit (TCA) 14 g TCA bir miktar distile suda çözülüp, 50 mL'ye distile suyla tamamlanır. |
| Ksantin (0,3mM) | 0,00913 g ksantin bir miktar distile suda çözülüp, 200 mL'ye distile suyla tamamlanır. |
| EDTA (0,6mM) | 0,023 g EDTA bir miktar distile suda çözülüp, 100 mL'ye distile suyla tamamlanır. |
| NBT (150 μM) | 0,0123 g NBT bir miktar distile suda çözülüp, 100 mL'ye distile suyla tamamlanır. |
| Na_2CO_3 (400 mM) | 2,12 g Na_2CO_3 bir miktar distile suda çözülüp, 50 mL'ye distile suyla tamamlanır. |
| 2 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ | 2,65 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ bir miktar distile suda çözülüp, 10 mL'ye distile suyla tamamlanır. |
| Bovin Serum Albumin (BSA), (1g/L) | 0,030 g BSA bir miktar distile suda çözülüp, 30 mL'ye distile suyla tamamlanır. |
| Fosfat tamponu (pH=7,0 ; 50 mM)-Katalaz için | 6,81 g KH_2PO_4 distile suda çözülerek son hacmi 1 L'ye tamamlanır. 8,9 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ distile suda çözülerek son hacmi 1 L'ye tamamlanır. Bu çözeltiler sırasıyla 1:1,5 oranında karıştırılır ve pH=7,0 'ye ayarlanır. |
| Hidrojen Peroksit | 240 μL %30'luk H_2O_2 'den alınarak son hacim fosfat tamponu ile 50 mL'ye tamamlanır (Günlük hazırlanır). |

2.4. Numunelerin Temini ve Saklanması

Kestane balı, kestane poleni ve kestane propolisi örnekleri ZAYBİR'den (Zonguldak Arı Yetiştiricileri Birliği) temin edilmiştir. Arı sütü ise Macahel Arıcılık A.Ş. 'den (Artvin) temin edilmiştir. Numunelerin tümü 2010 sezonuna aittir.

Bal, polen ve propolis numuneleri analiz edilene kadar +4 °C'de, arı sütü -20 °C'de saklanmıştır.

2.5. Deney Hayvanları

Çalışmanın planlanması aşamasında Karadeniz Teknik Üniversitesi, Hayvan Denepleri Yerel Etik Kuruluna başvuruldu. Alınan etik kurul kararı doğrultusunda çalışma planlandı (2010/6 protokol nolu ve 05/03/2010 tarihli etik kurul onayı).

Deneyel hayvan çalışmaları, Karadeniz Teknik Üniversitesi, Cerrahi Araştırmalar Merkezi'nde gerçekleştirildi. Deneylerde bu merkezden temin edilmiş, ağırlıkları 250–350 g arasında olan 49 adet Sprague Dawley tipi dişi sıçan kullanıldı. Sıçanlar, deneye başlamadan önce kafes ortalaması eşit olacak şekilde seçilen yedi adet sıçandan oluşan, tel kapaklı plastik

kafeslere alındı. Sıçanlar 22 ± 2 °C'da, 12 saat karanlık ve 12 saat aydınlık ortamda ve standart kafeslerde barındırıldı. Sıçanlar standart sıçan yemi ve çeşme suyuyla beslendi. Deney süresince yem ve su alımı serbest bırakıldı.



Şekil 13. Deneyde kullanılan Sprague Dawley tipi dişi sıçanlar

2.6. Numunelerde Yapılan Analizler

2.6.1. Ekstraktların Hazırlanması

Yaklaşık 5 g polen tartıldı. Üzerine 25 mL metanol eklendi. 1 gün boyunca çalkalayıcıda çalkalandı. Daha sonra adi süzgeç kağıdı kullanılarak süzüldü ve belli hacimlere metanol ile tamamlandı.

Propolisten yaklaşık 5 g tartıldı ve üzerine 25 mL metanol eklendi. 1 gün boyunca çalkalayıcıda çalkalandı. Daha sonra adi süzgeç kağıdı kullanılarak süzüldü ve belli hacimlere metanol ile tamamlandı.

Bal ekstraktı hazırlamak için 25 g bal tartıldı. Üzerine 50 mL metanol eklendi. 1 gün boyunca çalkalayıcıda çalkalandı. Daha sonra adi süzgeç kağıdı kullanılarak süzüldü ve belli hacimlere metanol ile tamamlandı.

Arı sütü için de yaklaşık 5 g arı sütü tartıldı ve üzerine 25 mL metanol eklendi. 1 gün boyunca çalkalayıcıda çalkalandı. Daha sonra alkolün etkisiyle çöken proteinler santrifüj edilerek ortamdan uzaklaştırıldı ve elde edilen metanolik süpernetanttan toplam fenolik madde ve antioksidan aktivite tayinleri yapıldı.

2.6.2. Toplam Fenolik Madde Tayini

Yöntem, suda ve organik çözücülerde çözülmüş olan fenolik bileşiklerin folin reaktifleri ile alkali ortamda renkli kompleks oluşturması esasına dayanır. Oluşan mor–menekşe renkli kompleks 765 nm’de maksimum absorbands oluşturur (Slinkart ve Singleton, 1977).

Çalışmada, standart grafiğin hazırlanmasında, fenolik bir madde olan gallik asit standardı kullanıldı. Gallik asitin farklı konsantrasyonları (0,5; 0,25; 0,125; 0,0625 ve 0,03125 mg/mL) hazırlanıp, absorbandsları okundu. Konsantrasyona karşılık bulunan absorbands değerleri ile grafik çizildi. Çizilen grafiğe göre bal, polen ve propolis numunelerinin toplam fenolik madde miktarı bulundu. Metodun yapılışı Tablo 4’te verilmiştir.

Tablo 4. Toplam fenolik madde tayininde yapılan işlemler

| | Kör | Standart | Numune |
|---|--------|----------|--------|
| Distile su | 700 µL | 680 µL | 680 µL |
| Standart | - | 20 µL | - |
| Numune | - | - | 20 µL |
| 0,5 N Folin Reaktifi | 0,4 mL | 0,4 mL | 0,4 mL |
| Tüpler karıştırılır ve 3 dakika sonra | | | |
| % 10’ luk Na ₂ CO ₃ | 0,4 mL | 0,4 mL | 0,4 mL |
| 2 saat inkübe edildikten sonra 760 nm’de absorbands okunur. | | | |

2.6.3. Toplam Flavonoid Tayini

Toplam flavonoid miktarı alüminyum klorür yöntemi ile spektrofotometrik olarak belirlendi (Chang vd., 2002). Yöntemin esası; alüminyum klorür C-4 keto grubu ve flavon ve flavonolların C-3 veya C-5 hidroksil grubundan herhangi biriyle kararlı kompleksler ve flavonoidlerin A ve B halkasındaki ortodihidroksil grupları ile kararsız kompleksler oluşturur (Chang vd., 2002). Standart olarak kuersetin kullanıldı (1-0,03125 mg/ml). Konsantrasyona karşılık bulunan absorbands değerleri ile standart grafiği çizildi. Çizilen grafiğe göre bal, polen propolis ve arı sütü numunelerinin toplam flavonoid miktarı bulundu.

Tablo 5. Toplam flavonoid tayininde kullanılan miktarlar

| | Kör | Renk körü | Standart | Numune |
|---|--------|-----------|----------|--------|
| Numune (değişen konsantrasyonlarda) | - | 0,5 mL | - | 0,5 mL |
| Standart | - | - | 0,5 mL | - |
| Metanol | 4,8 mL | 4,5 mL | 4,3 mL | 4,3 mL |
| % 10 Al(NO) 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 dakika oda sıcaklığında inkübe edildikten sonra 415 nm’de absorbans okunur.

2.6.4. Toplam Antosiyanin Tayini

Toplam antosiyanin tayini pH-differansiyel metoduyla yapıldı (Giusti ve Wrolstad, 2001; Fuleki ve Francis, 1968). Metodun ilkesi, monomerik antosiyaninlerin pH 1,0’de renkli oksonium formunun; pH 4,5’da ise renksiz hemiketal formunun egemen olmasına bağlıdır. Buna göre ortam pH’sı 1,0 ve 4,5 olduğu zaman ölçülen absorbans değerlerinin farkı, doğrudan antosiyanin konsantrasyonu ile orantılı bulunmaktadır.

Fuleki ve Francis, (1968)’de tarif edilen yöntem modifiye edilerek tayin yapıldı. 2,5 g numune alınıp, HCl ile asitlendirilmiş (pH 4,0) etil alkol ile ekstraksiyon yapıldı. 25 mL’ye seyreltilmiş örnekler manyetik karıştırıcı ile 30 dakika karıştırıldı. Karışım 2 saat -18 °C’da tutuldu, tekrar 10 dakika karıştırıldı. Karışım 10 dakika süre ile 3000 rpm’de santrifüj edildi. Berrak kısımdan 5’er mL iki ayrı erlene alındı. I. Tüpe pH 1’deki KCl çözeltisinden, diğerine ise pH 4,5’deki CH₃COONa çözeltisinden 20’şer mL eklendi ve yaklaşık 30 dakika beklendi. Bu esnada seyreltilmiş berrak numunenin 250–600 nm arasında spektrumu saptandı ve numunelerin 520–530 nm dalga boyu aralığında maksimum absorbans (λ vis-max) gösterdiği belirlendi.

pH 1,0 ve pH 4,5’da, tampon çözeltilerindeki örnek çözeltilerin bu bekleme sonucunda 520 ve 700 nm dalga boylarında, suya karşı belirlenen absorbans değerleri ölçüldü ve toplam monomerik antosiyanin içeriği hesaplandı. Hesaplama antosiyanin miktarları ifade edilirken o gıdadaki baskın antosiyanin hangisi ise onun cinsinden ifade edilmektedir. Elde edilen maksimum absorbans değerini veren dalga boyunun Siyanidin-3-glukozitin maksimum absorbans verdiği dalga boyuna denk geldiği için sonuçlar Siyanidin-3-glukozit (Cyn-3-glu)

cinsinden hesaplanarak ifade edildi. Yapılan çalışmada bal, polen ve propolis örnekleri kullanıldı.

$$S_f : (25/2.5).(25/5) : 50$$

$$A : (A_{\lambda 520} - A_{\lambda 700})_{pH 1,0} - (A_{\lambda 520} - A_{\lambda 700})_{pH 4,5}$$

$$\text{Monomerik Antosiyaninler, mg/kg} : \frac{(A).(MW).(S_f).1000}{(\epsilon).l}$$

A : Düzeltilmiş absorbans farkı

MW : Baz alınacak antosiyaninin molekül ağırlığı (Siyanidin-3-glukozit için: 449,2)
(Giusti ve Wrolstad, 2001)

S_f : Seyreltme faktörü

ε : Molar absorbtivite katsayısı (Siyanidin-3-glukozit için: 26.900) (Giusti ve Wrolstad, 2001)

2.6.5. Demir (III) İndirgeme / FRAP Yöntemi ile Antioksidan Kapasite Tayini

Metodun prensibi ferrik 2,4,6-tripiryidyl-s-triazin kompleksinin (Fe³⁺-TPTZ) antioksidanların varlığında renkli (mavi) ferrous formuna (Fe²⁺-TPTZ) indirgenmesi esasına dayanır (Benzie ve Strain, 1999). Bu renkli kompleks 593 nm'de maksimum absorbans verir.

Kalibrasyon için FeSO₄'ün değişen konsantrasyonları (100–1000 µM) kullanıldı. Çalışmada kullanılan FRAP reaktifi taze hazırlandı. Tayinde kullanılacak pipetlemeler Tablo 6'da verilmiştir.

Tablo 6. FRAP yönteminde yapılan pipetleme işlemleri

| | Kör | Numune | Renk körü | Standart |
|---------------|--------|--------|-----------|----------|
| FRAP reaktifi | 3 mL | 3 mL | - | 3 mL |
| Numune | - | 100 µL | 100 µL | |
| Standart | - | - | - | 100 µL |
| Saf su | 100 µL | - | - | - |

4 dakika sonra 593 nm de absorbans okunur.

Sonuçlar (numunelerin FRAP değerleri) aynı şartlarda test edilmiş standart FeSO₄ eşdeğeri antioksidan güç olarak ifade edildi.

2.6.6. Bakır (II) İyonu İndirgeyici Antioksidan Kapasite Tayini (CUPRAC)

Metod, bakır(II)-neokuproin kompleksinin ortama antioksidan çözeltisi ilave edilmesi sonucunda bakır(I)-neokuproine indirgenmesi esasına dayanır ve sonuçlar içinde antioksidan bulunmayan referansa karşı 450 nm’de absorbans değerlerinin ölçülmesiyle elde edilir (Apak vd., 2004).

Analizde standart olarak Troloks[®] (1-0,03125 mM) kullanılmıştır. Elde edilen test sonuçları Troloks[®] eşdeğeri antioksidan kapasite (TEAC) cinsinden verilmiştir. Bu çalışmada da yine bal, polen ve propolis örnekleri kullanıldı.

Tablo 7. CUPRAC tayininde kullanılan miktarlar

| | Numune | Standart | Kör |
|--|--------|----------|--------|
| 10 mM CuCl ₂ | 1 mL | 1 mL | 1 mL |
| 7,5 mM Neokuproin | 1 mL | 1 mL | 1 mL |
| NH ₄ CH ₃ COO tamp.(1 M, pH 7,0) | 1 mL | 1 mL | 1 mL |
| Numune | 0,2 mL | - | - |
| Standart | - | 0,2 mL | - |
| Saf su | 0,9 mL | 0,9 mL | 1,1 mL |

1 saatlik inkübasyondan sonra 450 nm’de absorbans okunur.

2.6.7. DPPH' Radikal Temizleme Aktivitesi

DPPH' radikali (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) ticari olarak satın alınabilen bir radikal olup Yu vd., (2002) tarafından geliştirilen metod modifiye edilerek kullanıldı. Çalışmamızda 4 mg/100 ml olacak şekilde DPPH' radikalının metanolik çözeltisi hazırlandı. Numuneler (bal, polen, propolis ve arı sütü) ve standart (Troloks®) değişik konsantrasyonlarda hazırlandı. 750 µL değişen konsantrasyonlardaki ekstraktlar ve 750 µL metanolik DPPH çözeltisine eklendi ve 1 saatlik inkübasyondan sonra 517 nm'de absorbans ölçüldü. Absorbanslar konsantrasyona karşı grafiğe geçirildi ve %50 DPPH miktarını scavenge (temizleyen) eden madde miktarı (SC₅₀) belirlendi. SC₅₀ değeri ne kadar düşük ise DPPH temizleme değeri o kadar yüksektir.

2.7. Toplam Protein Miktarı (%)

Polen ve arı sütü örneklerinin toplam protein miktarları yarı otomatik Kjeldahl yakma ünitesi kullanılarak Kjeldahl metoduna göre bulundu (AOAC, 2000). Metodun esası organik maddelerde bulunan proteinlerin yapısını teşkil eden amino asitlerin amonyağa dönüştürülerek, oluşan amonyağın bir asitle titrasyonu esasına dayanır. Titrasyonla tespit edilen amonyaktan formül yardımı ile azot miktarı bulunur.

Metoda göre 1 g numune Kjeldahl tüpüne konuldu. Üzerine 0,5 g CuSO₄.5H₂O ardından 15 g K₂SO₄ ve 0,1 g kadar SeO₂ (veya selenyum siyahı) koyup karıştırıldı. Karışım üzerine dikkatlice 25 mL derişik sülfürik asit (d=1,84 g/cm³) eklenip, döndürülerek karıştırıldı ve ısıtıcı üzerine oturtuldu. Numune renksiz veya açık mavi-yeşil ya da sarı renkli berrak bir çözelti elde edilinceye kadar ısıtıldı. Berraklaşmadan sonra en az 30 dakika daha kaynatıldı. Yaş yakması tamamlanmış balon içeriği soğutularak 300 mL saf su yavaş yavaş ve sürekli karıştırarak eklendi ve soğuması için bir süre bekletildi.

Destilasyonda %4 lük indikatörlü borik asitten her örnek için 25 mL kullanıldı. Her örnek yaklaşık 30 dakika destile edildi. Destilasyon ünitesinde kullanılan NaOH %10'luktur. Destilasyondan sonra 0,1 N HCl ile destilat titre edilerek harcanan miktar kaydedildi ve aşağıdaki formüle göre hesaplama yapıldı.

$$\% \text{ Protein} = N \times f \times (V_1 - V_0) \times 0,014 \times \text{ÇF} \times 100 / m$$

N: Titrasyonda kullanılan HCl çözeltisinin normalitesi

V_1 : Titrasyonda kullanılan HCl çözeltisinin hacmi, mL

V_0 : Tanık deneydeki titrasyonda kullanılan HCl çözeltisinin hacmi, mL

f: Titrasyonda kullanılan HCl çözeltisinin faktörü

ÇF : Azottan proteine çevirme faktörü

m: analiz için alınan numunenin kütlesi, g

2.8. Deneysel Hayvan Çalışmaları

2.8.1. Deney Hayvanlarına Verilecek Ekstraktların Hazırlanması

Bal, polen ve arı sütünün sulu ekstraktları hazırlandı. Propolis önce %98'lik alkol ile çözüldü. Daha sonra çözücü evaporatörde uçuruldu. Kalan kısım %24'lük alkolde çözüldü. Hayvanlara verilecek olan dozlar bal, polen ve propolis için 400 mg/kg, arı sütü için 50 mg/kg olarak ayarlandı. CCl_4 ise zeytin yağı ile 1:1 oranında karıştırılarak hazırlandı. Çalışma için 7 grup oluşturuldu ve toplam 49 sıçan kullanıldı (n=7). Hayvanlara 7 gün boyunca Tablo 8'de belirtildiği gibi uygulama yapıldı.

2.8.2. Deney Grupları ve Uygulamalar

Tablo 8. Deney grupları ve yapılan uygulamalar

| Grup No | Grubun Adı | Uygulama |
|----------|--------------------------------|--|
| Grup I | Serum fizyolojik kontrol grubu | Sıçanlara periton içi (intreperitonal: i.p.) yolla, karnın sol tarafına, yedi gün boyunca serum fizyolojik (SF) (0,8 mL/kg) verildi. |
| Grup II | Etil alkol kontrol grubu | Sıçanlara i.p. yolla karnın sol tarafına, yedi gün boyunca 0,8 mL/kg etil alkol verildi. |
| Grup III | CCl_4 Grubu | 0,8 mL/kg dozda karbontetraklorür (CCl_4) yedi gün boyunca karnın sağ tarafına verildi. |

Tablo 8'in devamı

| | | |
|----------|----------------|---|
| Grup IV | Polen grubu | Yedi gün boyunca 0,8 mL/kg dozda CCl ₄ karnın sağ tarafına verildi. Ardından gavaj yoluyla 400 mg/kg dozda suda çözünmüş polen sıçanlara verildi. |
| Grup V | Propolis grubu | Yedi gün boyunca 0,8 mL/kg dozda CCl ₄ karnın sağ tarafına verildi. Ardından gavaj yoluyla 400 mg/kg dozda %24'lük etil alkolde çözünmüş propolis sıçanlara verildi. |
| Grup VI | Bal grubu | Yedi gün boyunca 0,8 mL/kg dozda CCl ₄ karnın sağ tarafına verildi. Ardından gavaj yoluyla 400 mg/kg dozda suda çözünmüş bal sıçanlara verildi. |
| Grup VII | Arı sütü grubu | Yedi gün boyunca 0,8 mL/kg dozda CCl ₄ karnın sağ tarafına verildi. Ardından gavaj yoluyla 50 mg/kg dozda suda çözünmüş arı sütü sıçanlara verildi. |

2.8.3. Deney Hayvanlarının Vücut Ağırlığı Ölçümü

Sıçanların ilk gün ve son gün (8. gün) olmak üzere vücut tartımları $\pm 0,1$ hassasiyette elektronik tartı ile alınmıştır. Sıçanlardaki ağırlık değişimleri, çalışmanın ilk günü tespit edilen başlangıç değerlerine göre, aşağıdaki formül kullanılarak hesaplandı:

$$\text{Ağırlık değişim oranı} = 100 \times (\text{Ağırlık}_8 - \text{Ağırlık}_1) / (\text{Ağırlık}_1)$$

Ağırlık₈: 8. Gün ölçülen ağırlık (g)

Ağırlık₁: 1. gün ölçülen ağırlık (g)

2.8.4. Deneysel Hayvanlarından Örneklerin Alınması

Son uygulamadan 24 saat sonra (8. gün) tüm gruptaki sıçanlar dekapite edildi. Sıçanlar dekapite edilir edilmez hayvanların kanları cam huni yardımıyla %3,2'lik sodyum sitrat içeren tüplere alındı. Tüpler 3-5 dakika alt üst edildi. Daha sonra sıçanların karaciğerleri alındı ve %1,15'lik KCl içerisinde saklandı. Ayrıca histopatolojik inceleme için karaciğer kesitleri alındı ve %10'luk formaldehitte saklandı.

2.8.5. Örneklerde Yapılan Ön İşlemler

%1,15'lik KCl içerisindeki karaciğerler alınarak buz banyosu içerisinde homojenizatörde (17500 L/dak.) homojenize edildi. Elde edilen homojenizatlar santrifüj tüplerine alındı. Tüpler soğutmalı santrifüjde (+4°C) 4000 rpm'de 15 dakika santrifüj edildi. Süpernatant kısımları alındı ve -80°C'de saklandı.

Kanlar 2500 rpm'de 15 dakika santrifüj edildi. Plazma kısmı alındı ve -80°C'de saklandı. Plazma eldesinden kalan çökelti üzerine eşit miktarda serum fizyolojik eklendi, çalkalandı ve 3000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi. Üstte kalan kısım atıldı. Bu işlem 3 kez tekrarlandı. Daha sonra dipteki çökelti üzerine 1,5 katı kadar soğuk saf su eklendi, karıştırıldı ve eritrosit paketleri elde edildi.

2.9. Biyokimyasal Analizler

Karaciğer süpernatantlarında, plazmalarda ve eritrosit paketlerinde MDA ve SOD analizleri spektrofotometrik olarak yapıldı. Plazmalarda ALT ve AST enzim ölçümü otoanalizörde, satın alınan ticari kitlerle biyokimya laboratuvarında çalışıldı.

2.9.1. Süperoksit Dismütaz (SOD) Aktivitesinin Ölçülmesi

Ksantin oksidaz aracılığı ile üretilen O_2^- radikalinin reaksiyon ortamından nitroblue tetrazolium (NBT) indirgenmesinin numunede bulunan SOD enzimi tarafından engellenmesi prensibine dayanır (Sun vd., 1988). NBT'nin indirgenmesi ile 560 nm dalga boyunda maksimum absorbans veren mor renkli formazan oluşur. SOD aktivitesinin büyüklüğü oluşan formazanın absorbansıyla ters orantılıdır.

Karaciğer, plazma ve eritrosit paketlerinin SOD aktiviteleri Sun vd., (1988) metoduna göre tayin edildi. Analizde kullanılacak olan reaksiyon karışımı taze hazırlandı. Reaksiyon karışımında 0,6 mM EDTA, 400 mM Na₂CO₃, 0,3 mM Ksantin, 1 g/L BSA ve 150 µM NBT (nitroblue tetrazolium) bulunmaktadır. Çalışmamızda kullanılan karışım için 80 mL EDTA, 48 mL Na₂CO₃, 160 mL Ksantin ve 24 mL BSA çözeltilerinden eklendi ve karıştırıldı. Uygulamanın hemen öncesinde 80 mL NBT eklendi ve karıştırıldı. Reaksiyon karışımımız hazır hale geldi.

Ksantin oksidaz enziminin bu çalışmada 167 Ünite/L'lik bir konsantrasyonda, buzlu (NH₄)₂SO₄ içerisinde taze olarak hazırlanması gereklidir. Stok Ksantin oksidaz enzimi

$$37 \text{ mg protein/mL} \times 0.5 \text{ U/mg protein} = 18.5 \text{ U/mL} = 18500 \text{ U/L}$$

$$18500 \text{ U/L} \cdot X = 167000 \text{ U/L} \cdot 4 \text{ mL} \iff X = 0,0361 \text{ mL}$$

36,1 µl stok Ksantin oksidaz'dan alındı, 4 mL'ye buzlu 2M (NH₄)₂SO₄ ile tamamlandı.

SOD standartları saf su ile 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1, 0,5, 0 (kör) U/L olarak hazırlandı.

Analizden önce numunelere (karaciğer dokusu, plazma ve eritrosit paketi) ön hazırlık yapıldı. Bunun için 0,5 mL numune üzerine 400 µl etanol:kloroform (5:3) karışımından eklendi. Karışım 1 dakika vortekslelendikten sonra 18000 g'de 1 saat santrifüj edildi. Süpernatant kısmı alındı. Numune olarak süpernatantlar kullanıldı. Pipetlemeler Tablo 9'da verildiği gibi yapıldı.

Tablo 9. SOD analizi için kullanılan miktarlar

| | Numune | Standart | Kör |
|----------------------------------|---------------|-----------------|------------|
| Numune | 250 µL | - | - |
| Standart | - | 250 µL | - |
| Reaksiyon karışımı | 1,25 mL | 1,25 mL | 1,25 mL |
| Ksantin oksidaz | 25 µL | 25 µL | 25 µL |
| 25 dakika 25°C'de inkübe edilir. | | | |
| CuCl ₂ | 0,5 mL | 0,5 mL | 0,5 mL |

CuCl₂ ilavesinden sonra tüpler karıştırıldı ve 560 nm'de absorbansları okundu.

2.9.2. Malondialdehid (MDA) Seviyesinin Belirlenmesi

Lipit peroksidasyon ürünü olan MDA, oksidatif stresin bir göstergesi olarak kullanılmaktadır. Metot, tiyobarbitürik asit (TBA) ile MDA'nın oluşturduğu pembe renkli kompleksin 532 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak ölçülmesi esasına dayanır (Jain vd., 1989). MDA standartı olarak 1,1,3,3-Tetrametoksipropan kullanıldı. Stok çözeltilerden (100 nmol/mL) seri seyreltme ile 10; 5; 2,5; 1,25; 0,625; 0,3125 ve 0 konsantrasyonlarda standartlar hazırlandı.

2.9.2.1. Karaciğer Dokusunda MDA Seviyesinin Ölçülmesi

Karaciğer homojenatlarında MDA seviyeleri Mihara ve Uchiyama'nın (1978) spektrofotometrik metoduna göre yapıldı. 0,5 mL homojenat üzerine 3 mL %1'lik H_3PO_4 eklendi ve karıştırıldı. Daha sonra 1 ml % 0,67'lik tiyobarbitürik asit (TBA) ilave edildi. Karışım 45 dakika $100^\circ C$ 'deki su banyosunda bekletildi. Daha sonra 4000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi ve 532 nm'de absorbanları okundu. Numuneye uygulanan işlemler standartlara da uygulandı. Sonuçlar nmol MDA/ mL homojenat olarak verildi.

2.9.2.2. Eritrosit Paketlerinde MDA Seviyesinin Belirlenmesi

Shafiq-Ur-Rehman'ın (1984) yöntemi modifiye edilerek eritrosit paketlerinde MDA tayini yapıldı. 50 μL eritrosit paketi üzerine 450 μL azitli PBS ilave edildi. Elde edilen 500 μL 'lik karışım $37^\circ C$ 'da 10 dakika karıştırıldı. Üzerine 250 μL PBS ilave edildi. 2 saat süreyle $37^\circ C$ 'da inkübe edildi. Elde edilen bu 750 μL 'lik karışımdan 150 μL alınır üzerine 100 μL TCA ilave edildi. Bu karışım 10 dakika 3000 rpm'de santrifüj edildi. Elde edilen süpernatanttan 150 μL başka bir eppendorfa alınıp üzerine 50 μL TCA ve 50 μL TBA eklendi. Bu 250 μL 'lik karışım 15 dakika kaynamakta olan suda bekletildi. Soğuyunca 532 nm ve 600 nm'de mikro plate okuyucuda absorbanları okundu.

MDA standartlarından 150 μL alınıp süpernatant aşamasından sonraki işlemler gerçekleştirildi. Sonuçlar nmol MDA/ mL eritrosit paketi olarak verildi.

2.9.2.3. Plazmada MDA Seviyesinin Belirlenmesi

Yagi, (1994)' e göre plazmalarda MDA seviyesi tespit edilmiştir. Lipid peroksidasyon ürünü (MDA) ile tiyobarbitürik asit arasındaki reaksiyon sonucu oluşan kırmızı renk spektrofotometrik olarak ölçüldü. TBA ile reaksiyona girerek aynı rengi veren suda çözünür maddeleri uzaklaştırmak için serum lipitleri proteinle birlikte fosfotungstik asit/sülfürik asit sistemiyle çöktürüldü.

0,15 mL plazma üzerine 1,2 mL H₂SO₄ (0,084 N) ve 1,2 mL fosfotungstik asit (%10'luk) eklendi ve karıştırıldı. 5 dakika beklendikten sonra 4600 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi. Daha sonra üst faz atıldı. Çöken kısım 2 mL saf su ile vortekslendi. Her numunenin üzerine 0,5 mL TBA eklendi ve 100°C'de 1 saat beklendi. Daha sonra 4000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi ve 532 nm'de absorbanları okundu.

Standartların hazırlanmasında ise; 2 mL standart üzerine 0,5 mL TBA eklendi ve 100°C'de 1 saat beklendi. Daha sonra 532 nm'de absorbanları okundu. Sonuçlar nmol MDA/mL plazma olarak ifade edildi.

2.9.3. Katalaz (CAT) Aktivitesinin Tayini

Katalaz aktivitesinin belirlenmesinde Aebi (1984) metodu kullanıldı. Yöntem katalazın hidrojen peroksiti (H₂O₂) parçalayıp uzaklaştırması esasına dayanmaktadır.

Plazma ve karaciğer dokusunda katalaz aktivitesine bakılmıştır. Plazma ve dokularda gerekli seyreltmeler yapıldıktan sonra Tablo 10'daki gibi pipetleme yapıldı.

Tablo 10. Katalaz aktivitesinde kullanılan miktarlar

| Reaktifler | Kör | Numune |
|-------------------------------|---------|---------|
| Fosfat Tamponu | 750 µL | - |
| Numune | 1500 µL | 1500 µL |
| H ₂ O ₂ | - | 750 µL |

H₂O₂ eklenir eklenmez kuantaz küvetler altüst edildi ve 240 nm'de 30 sn süreyle her 10 sn'de bir absorbanlar kaydedilerek meydana gelen düşüşler izlendi. Reaksiyonun hız sabiti

kullanılarak katalazın spesifik aktivitesi ölçüldü. 10 sn'lik aralık için aşağıdaki formüle göre hesaplamalar yapıldı.

$$k = (2,3/10) \times \log(A_1/A_2) \text{ s}^{-1}$$

A_1 = Başlangıç Absorbansı

A_2 = 10 s sonraki absorbans

Yukarıdaki formüle göre bulunan k değeri seyreltme faktörü ile çarpıldı.

2.10. Histopatolojik İnceleme

Histopatolojik çalışmalar KTÜ Tıp Fakültesi Histoloji Anabilimdalı laboratuvarında Doç. Dr. Esin YULUĞ tarafından gerçekleştirildi. Çalışma sonunda her bir gruba ait sıçanlardan çıkarılan karaciğer dokuları %10'luk formaldehitte 48 saat tespit edildi. Tespit sonrası dereceli alkol serilerinden geçirilerek dehidrate edildi. Xylen'de şeffaflaştırıldıktan sonra parafine gömüldü. Parafin bloklardan tam otomatik mikrotom (Leica RM 2255) ile 4 µm kalınlığında kesitler alındı. Alınan kesitler Hematoksilen Eozin (H&E) ile boyandı. Elde edilen preparatların histolojik değerlendirmesi, çalışma gruplarından habersiz, bu konuda deneyimli bir histolog tarafından ışık mikroskopik olarak (Olympus BX-51; Olympus Optical Co, Ltd, Tokyo, Japan) yapıldı. Değerlendirmede tüm preparatlar X40, X100, X200 ve X400 büyütmede sırası ile gözden geçirildi. Değerlendirmede öncelikle H.E ile boyanan preparatlar genel histolojik yapı açısından değerlendirildi. Daha sonra elde edilen bulgulara göre yarı kantitatif hasar skorlaması yapıldı. Yarı kantitatif hasar skorlamasında karaciğer dokusu hepatosit dejenerasyonu, sinüzoidal aralıkta genişleme ve yağlı değişiklik açısından değerlendirildi.

2.11. İstatistiksel Analiz

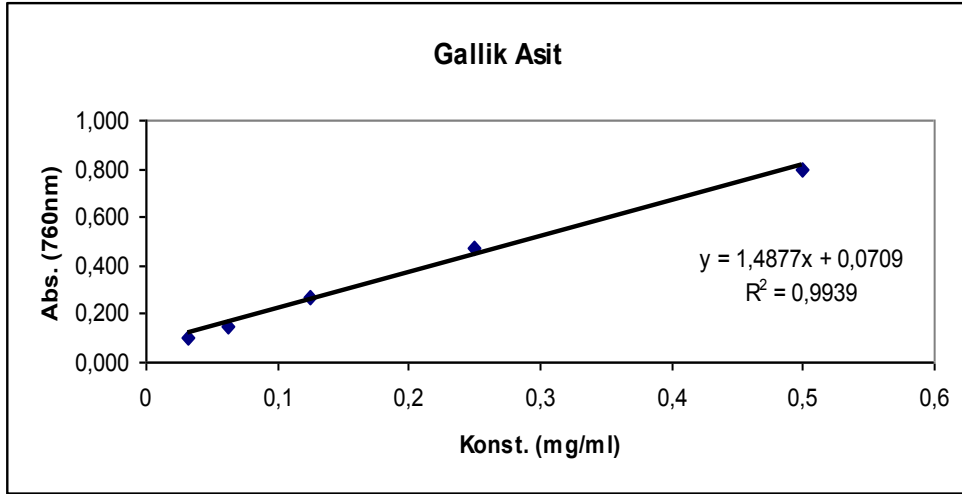
Verilerin değerlendirilmesinde SPSS (Statistical Package for Social Sciences) 15.0 for Windows® istatistik paket programı ve Microsoft® Excel (for windows XP) kullanıldı. Sonuçlar ortalama ± standart hata olarak ifade edildi ve $p < 0.05$ olasılık değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi. Gruplar arasında istatistiki olarak fark olup olmadığını test etmek için Kruskal-Wallis non-parametrik testi kullanıldı. İki bağımsız grup arasında ilişki olup olmadığı Pearson korelasyon testine göre ve önemlilik testleri $p < 0.05$ seviyesinde incelendi.

3. BULGULAR

3.1. Antioksidan Aktivite Ölçümleri

3.1.1. Toplam Fenolik Madde Miktarı

Bal, polen, propolis ve arı sütünde gerekli seyreltmeler yapıldıktan sonra toplam fenolik madde miktarları Folin-Ciocalteu reaktifi ve gallik asit standardı kullanılarak tayin edildi. 760 nm'deki absorbans değerleri y-ekseninde ve konsantrasyon değerleri ise x-ekseninde gösterilerek bir standart çalışma grafiği hazırlandı (Şekil 14).



Şekil 14. Gallik asit standart çalışma grafiği

Toplam fenolik madde miktarı gallik asit kalibrasyon denkleminde yararlanarak hesaplandı. 3 paralel tekrar yapıldı ve ortalamalar alındı. Elde edilen sonuçlar Tablo 11'de verilmiştir. Propolisin en yüksek fenolik madde içeriğine, arı sütünün de en düşük fenolik madde içeriğine sahip olduğu bulundu.

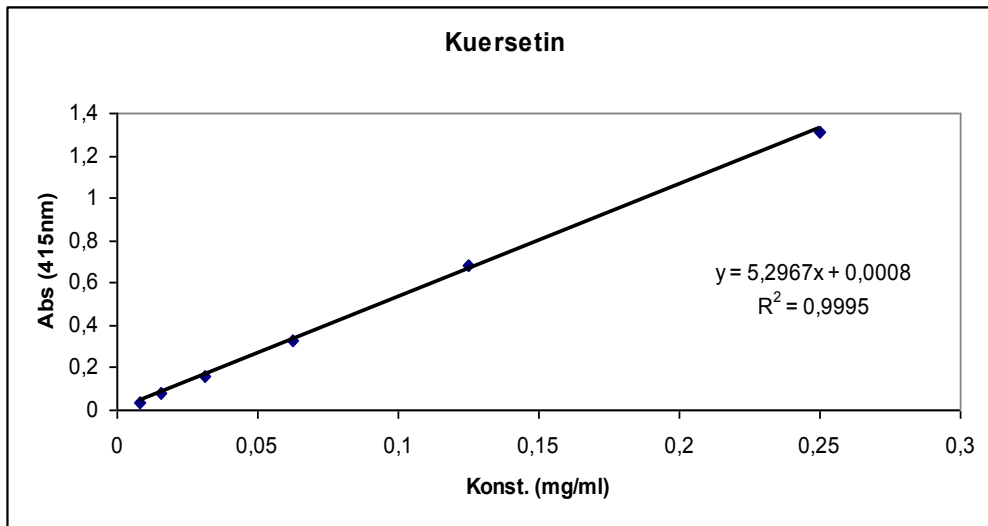
Tablo 11. Bal, polen, propolis ve arı sütünün toplam fenolik madde miktarları

| Numuneler | Toplam Fenolik Madde Miktarları | |
|-----------|---------------------------------|--|
| | (mg GAE/g numune) | |
| Arı sütü | 4,29 ± 0,03 ^b | |
| Polen | 13,78 ± 0,34 ^c | |
| Propolis | 183,86 ± 6,35 ^d | |
| Bal | 0,95 ± 0,07 ^a | |

Harfler gruplar arasında anlamlı bir fark olup olmadığını göstermektedir ($p < 0,05$)

3.1.2. Toplam Flavonoid Miktarı

Toplam flavonoid analizinde numunelerin flavonoid madde miktarı kuersetin eşdeğeri olarak verilmiştir. Bölüm 2.6.3’de anlatılan metoda göre tayin yapılmıştır. Öncelikle kuersetin kalibrasyon eğrisi çizilmiştir (Şekil 15). Daha sonra kalibrasyon eğrisinden yararlanarak numunelerin toplam flavonoid miktarları belirlendi. 3 paralel tekrar yapıldı ve ortalamalar alındı. Elde edilen sonuçlar Tablo 12’de verilmiştir.



Şekil 15. Kuersetin standart çalışma grafiği

Tablo 12. Numunelerin toplam flavonoid miktarları

| Numuneler | Toplam Flavonoid Miktarları (mg Kuersetin/g numune) |
|------------------|--|
| Arı sütü | 1,16 ± 0,08 ^b |
| Polen | 1,64 ± 0,11 ^b |
| Propolis | 106,61 ± 2,36 ^c |
| Bal | 0,56 ± 0,03 ^a |

Harfler gruplar arasında anlamlı bir fark olup olmadığını göstermektedir (p<0,05)

3.1.3. Toplam Antosiyanin Miktarı

Bu yöntem, antosiyaninlerin maksimum absorbanans gösterdiği dalga boyundaki absorbanans değerlerinin ortamın pH değerlerine göre değişiminin ölçümüne dayanmaktadır. pH-diferansiyel metodunun ilkesi, monomerik antosiyaninlerin pH 1,0'de renkli oksonium formunun egemen olmasına dayanmaktadır. Buna göre ortam pH 1,0 ve pH 4,5 olduğu zaman ölçülen absorbanans değerlerinin farkı, doğrudan antosiyanin konsantrasyonu ile orantılı bulunmaktadır. Örneklerin (bal, polen, propolis) en yüksek absorbanans gösterdiği 520 nm ve 700 nm'de, 1 cm'lik küvetlerde absorbanans değerleri saptanmış ve toplam antosiyanin miktarı siyanidin-3-glikozit cinsinden hesaplanmıştır (Tablo 13).

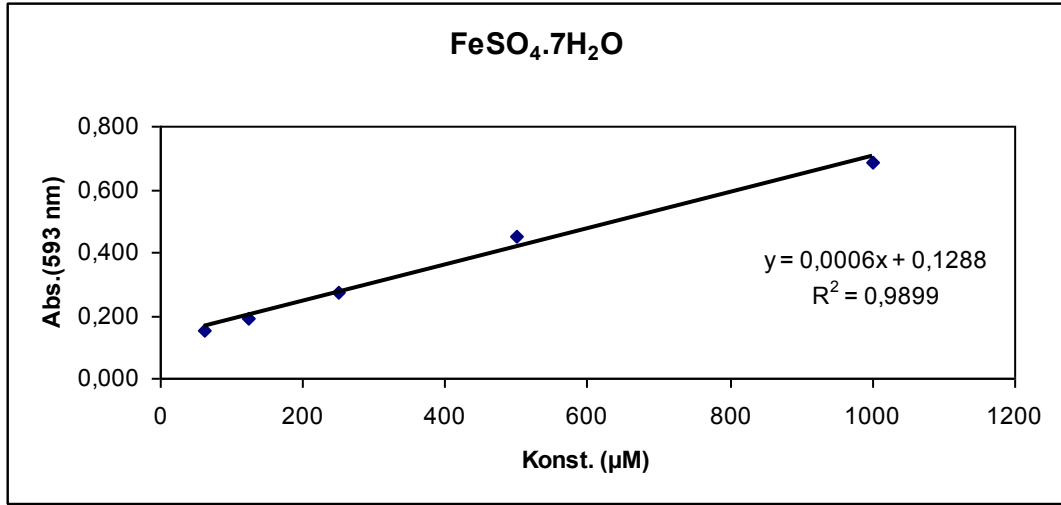
Tablo 13. Örneklerin toplam antosiyanin miktarları

| Numuneler | Toplam Antosiyanin Miktarları (mg Cyn-3-glu/g numune) |
|------------------|--|
| Polen | 4,06 ± 0,11 ^b |
| Propolis | 5,11 ± 2,36 ^c |
| Bal | 0,13 ± 0,03 ^a |

Harfler gruplar arasında anlamlı bir fark olup olmadığını göstermektedir (p<0,05)

3.1.4. Demir (III) İndirgeme / FRAP Yöntemi ile Antioksidan Kapasite Tayini

Demir (III) İndirgeme/Antioksidan Kuvveti yöntemiyle 595 nm'de numunelerin antioksidan kuvvetine bakıldı. Bu metotta artan absorbans yüksek Fe^{+3} indirgeme kuvvetini göstermektedir. Kalibrasyon eğrisi $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 'un değişik konsantrasyonlarındaki absorbans değerlerinden faydalanarak çizildi. Kalibrasyon eğrisinden faydalanarak örneklerin demir (III) indirgeme kuvvetleri hesaplandı.



Şekil 16. Demir sülfat standart çalışma grafiği

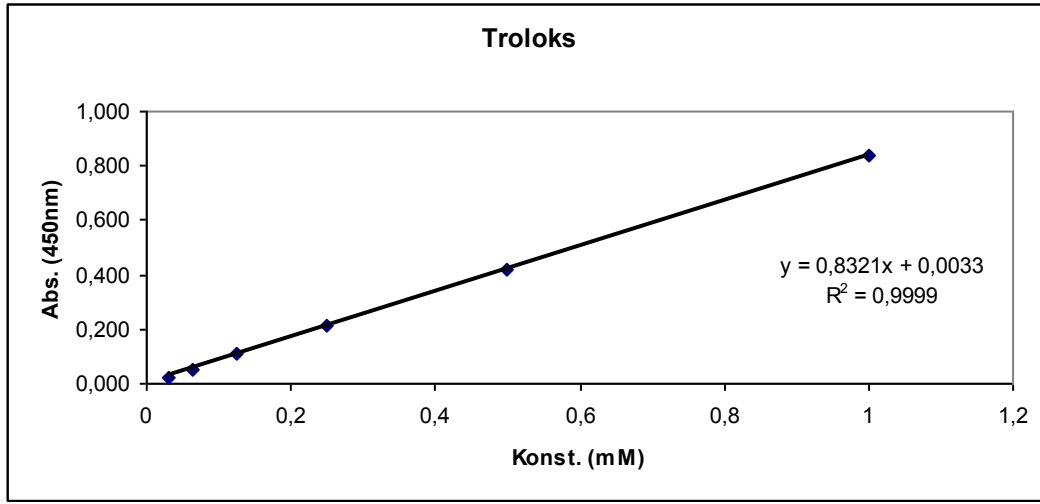
Tablo 14. Numunelerin demir (III) indirgeme kuvvetleri

| Numuneler | Demir (III) İndirgeme Kuvveti (FRAP) (µmol $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ /g numune) |
|-----------|---|
| Arı sütü | $1,80 \pm 0,14^a$ |
| Polen | $48,75 \pm 2,60^a$ |
| Propolis | $1416,2 \pm 0,07^b$ |
| Bal | $1,02 \pm 0,02^a$ |

Harfler gruplar arasında anlamlı bir fark olup olmadığını göstermektedir ($p < 0,05$)

3.1.5. Bakır (II) İyonu İndirgeyici Antioksidan Kapasite Tayini (CUPRAC)

Kalibrasyon eğrisi Troloks[®]'un değişik konsantrasyonlarındaki absorbans değerlerinden faydalanarak çizilmiştir. Troloks[®] konsantrasyonundan yola çıkarak numunelerin antioksidan kapasitesi ve mM Troloks[®] eşdeğeri /g numune olarak antioksidan güç (TEAC) ifade edildi.



Şekil 17. Troloks standart çalışma grafiği

Tablo 15. Numunelerin bakır (II) indirgeme kuvvetleri

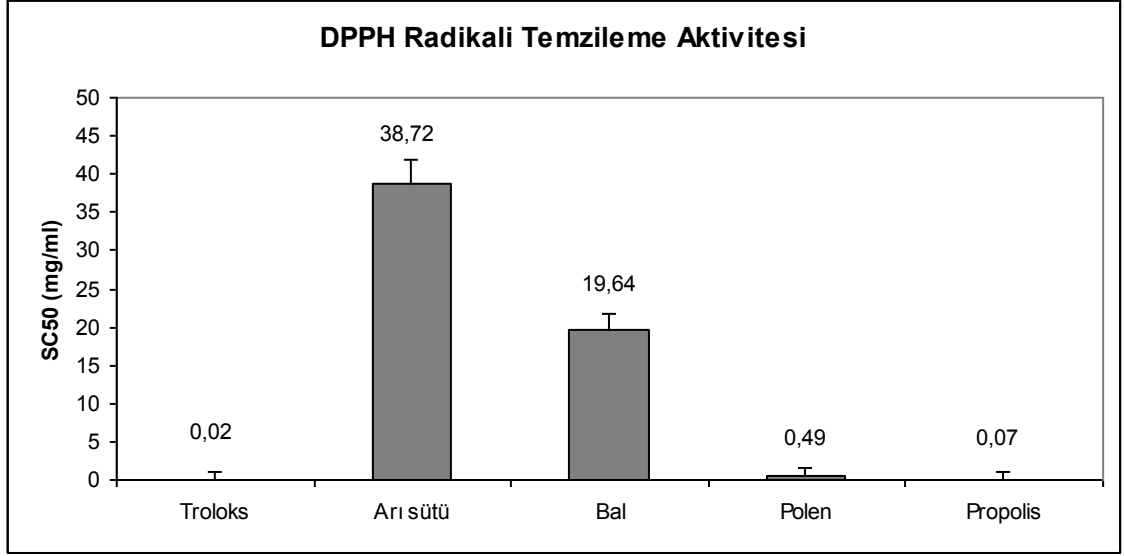
| Numuneler | Bakır (II) İndirgeme Kuvveti (CUPRAC) (mmol TEAC/g numune) |
|-----------|---|
| Arı sütü | 0,03 ± 0,01 ^a |
| Polen | 0,19 ± 0,06 ^b |
| Propolis | 2,95 ± 0,11 ^c |
| Bal | 0,01 ± 0,01 ^a |

Harfler gruplar arasında anlamlı bir fark olup olmadığını göstermektedir (p<0,05)

3.1.6. DPPH[•] Radikal Temizleme Aktivitesi

Artan numune konsantrasyonuna karşı 517 nm'deki absorbanslar grafiğe geçirilerek elde edilen grafiklerden antioksidan kapasiteler kantitatif olarak ifade edilmiştir. Antioksidan

aktivite, numunelerin SC_{50} değerleri belirlenerek karşılaştırılmıştır. SC_{50} , başlangıç DPPH' radikal konsantrasyonunu (kontrolün absorbansını) yarıya dūřüren numune konsantrasyonudur. Sonuçlar mg/ml cinsinden verildi. Standart olarak Troloks[®] kullanılmıştır.



şekil 18. DPPH radikali temizleme aktivitesi tayinleri sonucu elde edilen SC_{50} değerleri

SC_{50} değerlerini veren grafikten de anlaşılacağı gibi; propolisin DPPH temizleme kapasitesi diğer numunelerden oldukça iyidir.

3.1.7. Toplam Protein Miktarı

Yarı otomatik makro Kjeldahl yakma ünitesinde yapılan azot miktarı tespiti ardından polen ve arı sūtünde bulunan protein miktarları hesaplandı ve Tablo 16' da verildi.

Tablo 16. Polen ve arı sūtünün protein miktarı

| Numune | Ortalama%Protein |
|----------|------------------|
| Arı sūtü | 13,00 |
| Polen | 16,80 |

3.2. Deney Hayvanları Uygulamaları

3.2.1. Deney Hayvanlarının Vücut Ağırlığı Ölçümü

Sıçanların ağırlık takipleri sekiz gün boyunca yapıldı ve 1. gün sonundaki ağırlıkları ve 8. günkü (dekapitasyon yapıldığı gün) ağırlıkları baz alınarak vücut ağırlık değişimleri hesaplandı (Tablo 17). Ağırlık değişim oranı aşağıdaki denklem kullanılarak hesaplanmıştır.

$$\text{Ağırlık değişim oranı} = 100 \times (\text{Ağırlık}_8 - \text{Ağırlık}_1) / (\text{Ağırlık}_1)$$

Ağırlık₈: 8. Gün ölçülen ağırlık (g)

Ağırlık₁: 1. gün ölçülen ağırlık (g)

Tablo 17. Deney hayvanlarının vücut ağırlığı değişimleri

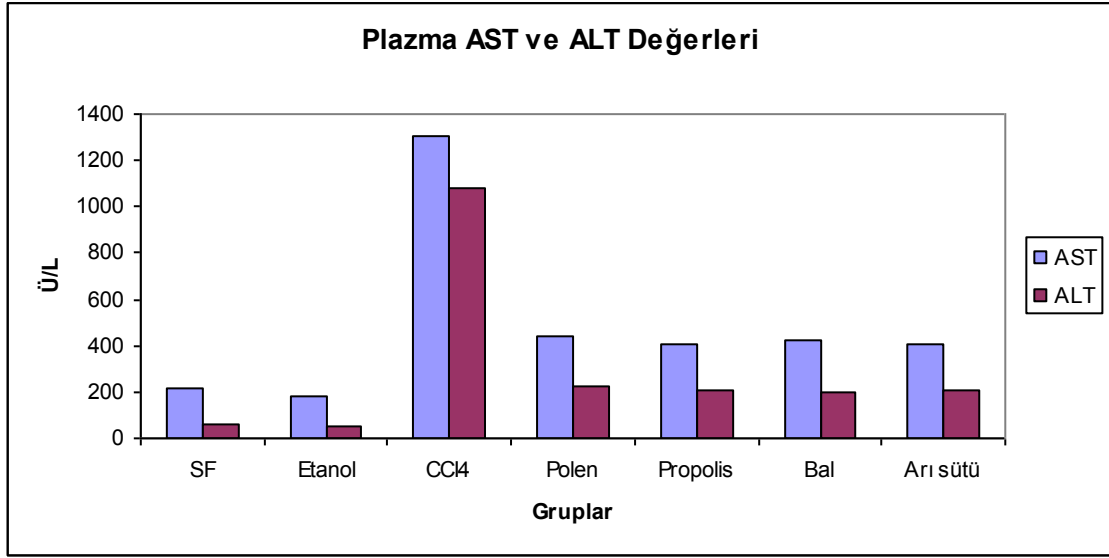
| Grup Adı | Grup Ağırlık Ortalaması (g) | | Ağırlık Değişim Oranı (%) |
|------------------|-----------------------------|-------------|---------------------------|
| | 1.Gün | 8.Gün | |
| Serum fizyolojik | 214 ± 17,75 | 223 ± 22,10 | +4,21 |
| Etil alkol | 215 ± 19,44 | 213 ± 17,29 | -0,93 |
| CCl ₄ | 219 ± 18,79 | 211 ± 17,72 | -3,65 |
| Polen | 218 ± 19,36 | 213 ± 20,06 | -2,29 |
| Propolis | 216 ± 20,23 | 210 ± 14,20 | -2,78 |
| Bal | 213 ± 11,29 | 213 ± 13,75 | 0,00 |
| Arı sütü | 219 ± 24,16 | 219 ± 19,86 | 0,00 |

3.2.2. Biyokimyasal Analiz Sonuçları

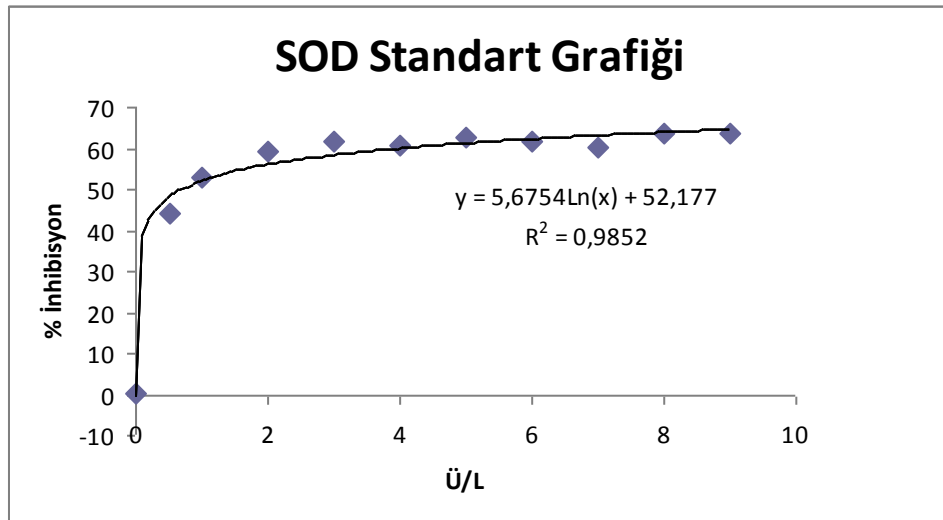
Plazma, eritrosit paketleri ve karaciğerdeki SOD aktivitesi spektrofotometrede belirlendi. Plazma, eritrosit paketleri ve karaciğerlerdeki MDA miktarları 1,1,3,3-Tetrametoksipropanın 10; 5; 2,5; 1,25; 0,625 nmol/mL'lik standartları kullanılarak hazırlanan MDA standart eğrisi kullanılarak hesaplandı. Sonuçlar nmol MDA/numune olarak ifade edildi. Eritrosit paketlerinde okumalar iki farklı absorbans değerinde 532 nm ve 600 nm'de yapıldı. Plazma ve karaciğer dokusunda CAT aktivitesi spektrofotometrede absorbans düşüşü izlenerek belirlendi.

3.2.2.1. Plazmada Yapılan Ölçümlerin Sonuçları

Plazmalarda AST ve ALT değerleri otoanalizörde, SOD aktivitesi, MDA miktarı ve CAT aktivitesi spektrofotometrede belirlendi. Standartlardan elde edilen kalibrasyon grafikleri Şekil 19'da, grafikten yararlanarak elde edilen sonuçlar Tablo 18'de verilmiştir.



Şekil 19. Grupların AST ve ALT düzeyleri



Şekil 20. SOD standart çalışma grafiği

Tablo 18. Plazmaya ait parametreler

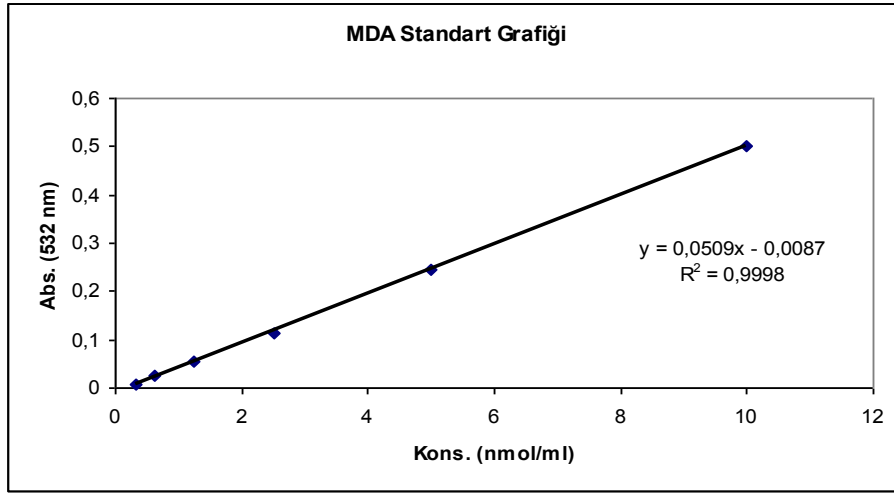
| Grup adı | AST (Ü/L) | ALT (Ü/L) | SOD (Ü/ml plazma) | CAT (kU/L) |
|------------------|-------------------------|------------------------|---------------------------|---------------------------|
| Serum fizyolojik | 220 ± 46 ^a | 61 ± 10 ^a | 0,16 ± 0,34 ^a | 0,128 ± 0,09 ^g |
| Etil alkol | 179 ± 31 ^a | 54 ± 6 ^a | 0,04 ± 0,06 ^a | 0,042 ± 0,01 ^b |
| CCl ₄ | 1303 ± 225 ^c | 1080 ± 20 ^c | 0,02 ± 0,04 ^a | 0,025 ± 0,01 ^a |
| Polen | 445 ± 140 ^b | 222 ± 120 ^b | 0,11 ± 7,61 ^a | 0,105 ± 0,56 ^e |
| Propolis | 409 ± 68 ^b | 205 ± 42 ^b | 0,12 ± 11,91 ^a | 0,116 ± 0,09 ^f |
| Bal | 424 ± 110 ^b | 199 ± 56 ^b | 0,09 ± 9,36 ^a | 0,098 ± 0,05 ^d |
| Arı sütü | 410 ± 112 ^b | 204 ± 73 ^b | 0,07 ± 12,10 ^a | 0,087 ± 0,02 ^c |

Harfler gruplar arasında anlamlı bir fark olup olmadığını göstermektedir (p<0,05)

Plazma AST ve ALT düzeylerine bakıldığında CCl₄ grubunda enzim miktarının çok yüksek olduğu ve arı ürünlerinin CCl₄ seviyesini azalttığı görüldü. Plazma MDA seviyesi tayin sınırlarının altında olduğu için belirlenemedi. CAT aktivitesine bakıldığında propolisin daha iyi olduğu görüldü. SOD aktivitesinde istatistiksel olarak anlam bulunamadı.

3.2.2.2. Karaciğer Dokusunda Yapılan Ölçümlerin Sonuçları

Gruplara ait karaciğer doku ölçüm sonuçları Tablo 19’da, standart eğri grafiği Şekil 21’de verilmiştir.



Şekil 21. Karaciğer dokuları için hazırlanan MDA standart çalışma grafiği

Tablo 19. Karaciğer dokularına ait parametreler

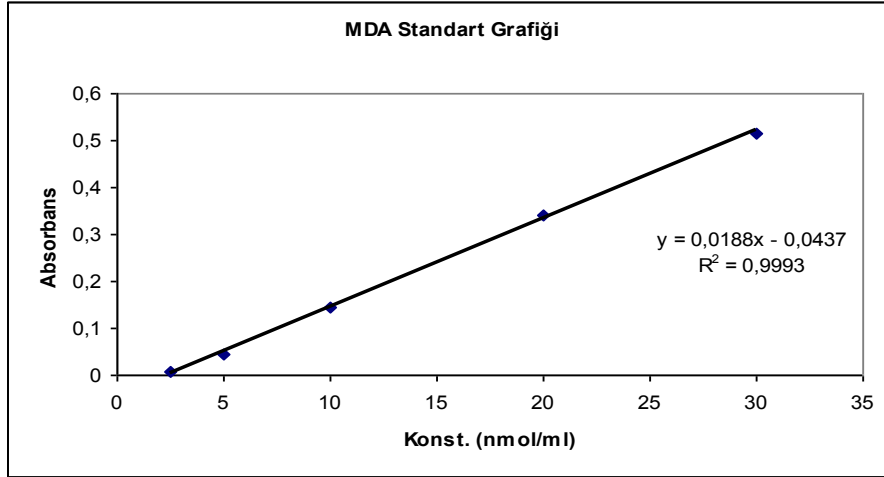
| Grup adı | MDA (nmol/g doku) | SOD (Ü/g doku) | CAT (k/g protein) |
|------------------|---------------------------|--------------------------|-----------------------------|
| Serum fizyolojik | 9,28 ± 1,00 ^a | 1,39 ± 0,01 ^a | 0,022 ± 0,02 ^d |
| Etil alkol | 11,24 ± 0,40 ^b | 1,75 ± 0,34 ^b | 0,014 ± 0,01 ^c |
| CCl ₄ | 21,23 ± 1,19 ^f | 6,40 ± 1,09 ^f | 0,006 ± 0,01 ^a |
| Polen | 12,50 ± 0,50 ^e | 4,33 ± 1,23 ^e | 0,012 ± 0,02 ^{b,c} |
| Propolis | 10,71 ± 0,70 ^c | 3,52 ± 0,35 ^c | 0,019 ± 0,03 ^d |
| Bal | 14,03 ± 0,42 ^e | 4,41 ± 2,22 ^e | 0,009 ± 0,01 ^{a,b} |
| Arı sütü | 16,65 ± 0,65 ^d | 3,85 ± 0,67 ^d | 0,008 ± 0,03 ^{a,b} |

Harfler gruplar arasında anlamlı bir fark olup olmadığını göstermektedir (p<0,05)

Karaciğer dokusunda yapılan analizlerde arı ürünlerinin karaciğer hasarını önlediği görüldü.

3.2.2.3. Eritrosit Paketlerinde Yapılan Ölçümlerin Sonuçları

Eritrosit paketlerine ait standart eğri grafiği Şekil 22’de, ölçüm sonuçları ise Tablo 20’de verildi.



Şekil 22. Eritrosit paketleri için hazırlanan MDA standart çalışma grafiği

Tablo 20. Eritrosit paketlerine ait parametreler

| Grup adı | MDA (nmol/g Hb) | SOD (Ü/g Hb) |
|------------------|----------------------------|----------------------------|
| Serum fizyolojik | 0,87 ± 0,36 ^{a,b} | 7,27 ± 0,65 ^{a,b} |
| Etil alkol | 1,16 ± 0,64 ^{a,b} | 6,94 ± 0,63 ^{a,b} |
| CCl ₄ | 1,88 ± 0,15 ^b | 4,88 ± 1,02 ^a |
| Polen | 0,79 ± 0,10 ^{a,b} | 6,66 ± 1,28 ^{a,b} |
| Propolis | 0,63 ± 0,13 ^a | 6,75 ± 1,37 ^b |
| Bal | 0,70 ± 0,14 ^{a,b} | 6,44 ± 0,11 ^{a,b} |
| Arı sütü | 0,94 ± 0,17 ^a | 6,00 ± 0,12 ^b |

Harfler gruplar arasında anlamlı bir fark olup olmadığını göstermektedir (p<0,05)

3.2.3. Histopatolojik İnceleme Sonuçları

Gruplara ait karaciğer dokularının ışık mikroskopik değerlendirmesinde;

Grup 1’de normal karaciğer dokusu morfolojisi izlendi. Hepatositler ve sinüzoidal aralık normal görünümde izlendi (Resim 1).

Grup 2’de vena centralis etrafında normal morfolojik yapıda hepatositler izlenmesine rağmen, periferde doğru gidildikçe hepatositlerde yağlı değişiklikler izlendi (Resim 2).

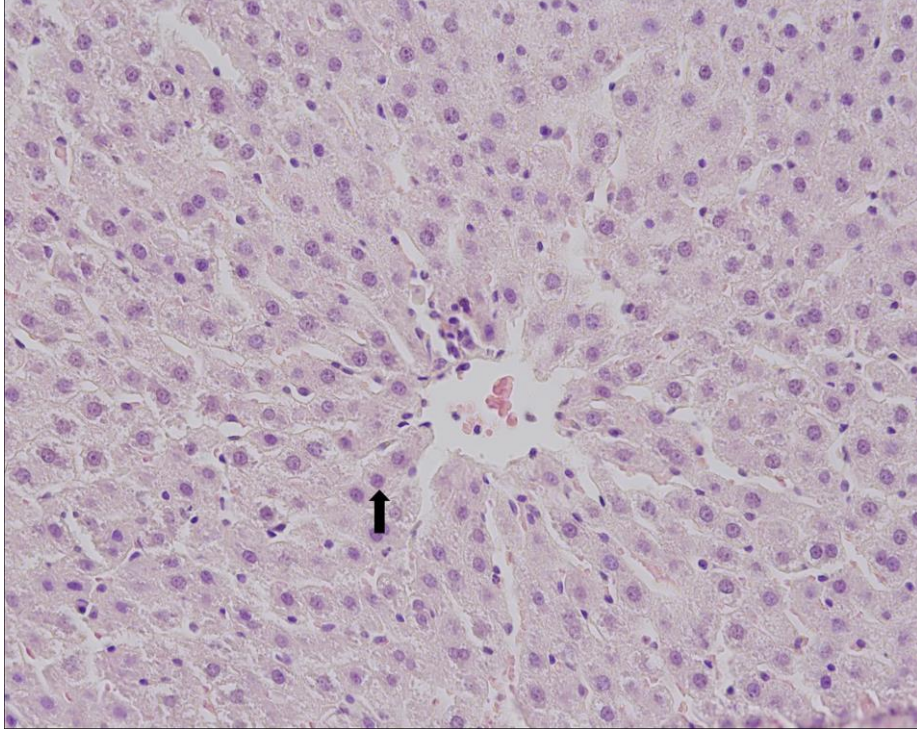
Grup 3’de vena centralis etrafında çok az miktarda normale yakın morfolojide hepatosit izlenmesine rağmen yaygın olarak hepatositlerde yağlı değişiklikler mevcut idi (Resim 3).

Grup 4’de vena centralis etrafında yağlı değişiklik gösteren hepatositler mevcut idi. Ancak periferde portal alandan itibaren vena centralis’e doğru normal morfolojiye yakın görünümde hepatositler mevcut idi (Resim 4).

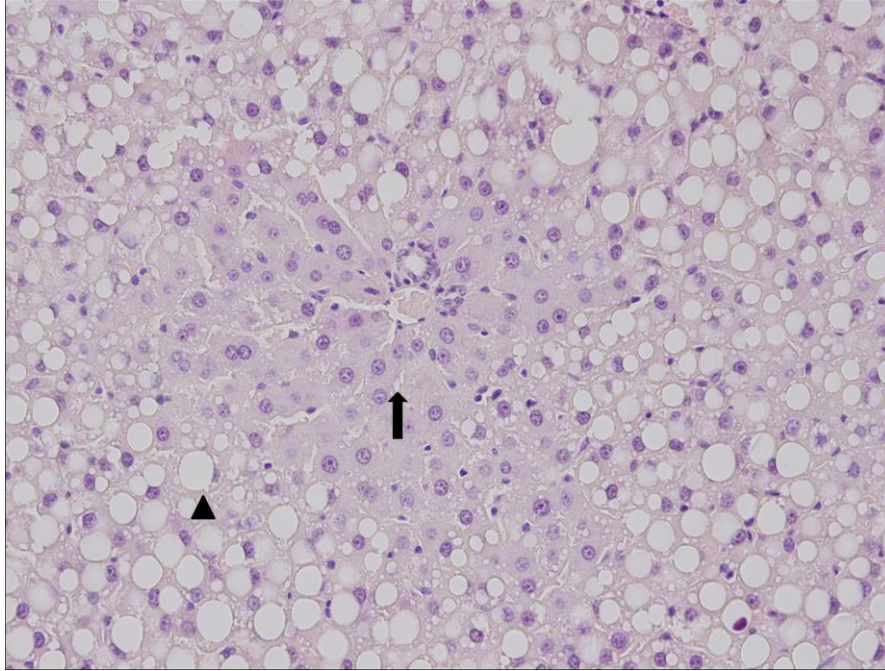
Grup 5’de vena centralis etrafında bolca yağlı değişiklik gösteren hepatositler mevcut idi. Vena centralisin periferinde ise yer yer normal morfolojide hepatositler yağlı değişiklik gösteren hepatositler arasında izlendi (Resim 5).

Grup 6’da vena centralis etrafında yağlı değişiklik gösteren hepatositler mevcut olmasına rağmen periferde oldukça yaygın normal morfolojide hepatositler izlendi (Resim 6).

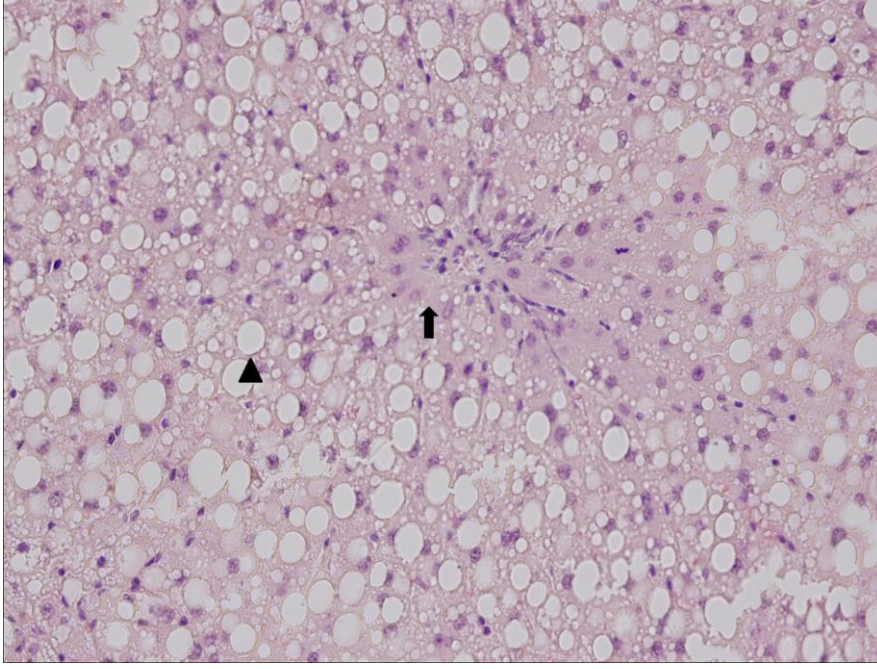
Grup 7’de vena centralis etrafında yağlı değişiklik gösteren hepatositler olmasına rağmen, periferde yaygın normal morfolojide hepatositler mevcut idi (Resim 7).



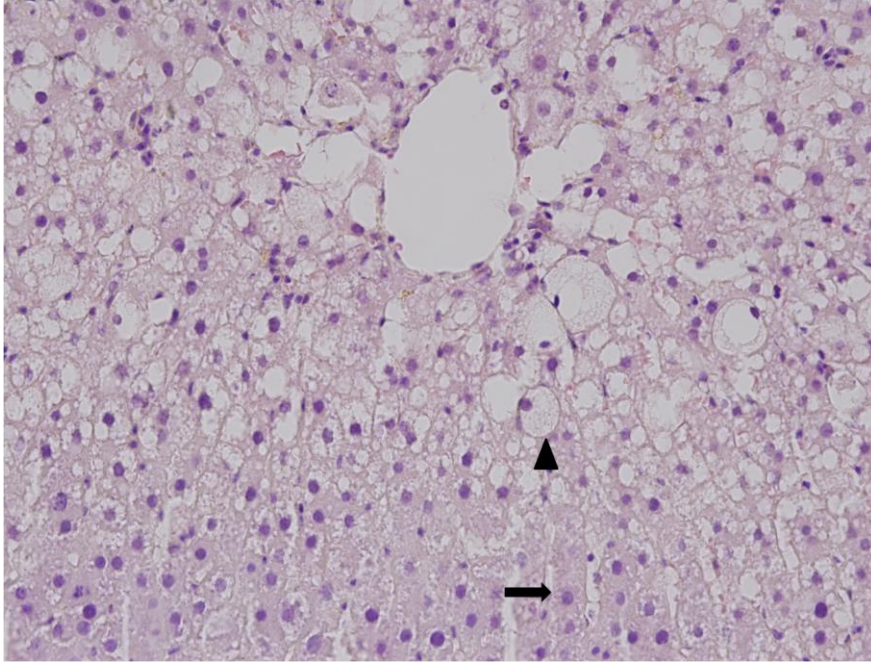
Şekil 23. Grup 1'e ait karaciğer dokusunda normal morfolojide hepatositler (↑) (H&E X 200).



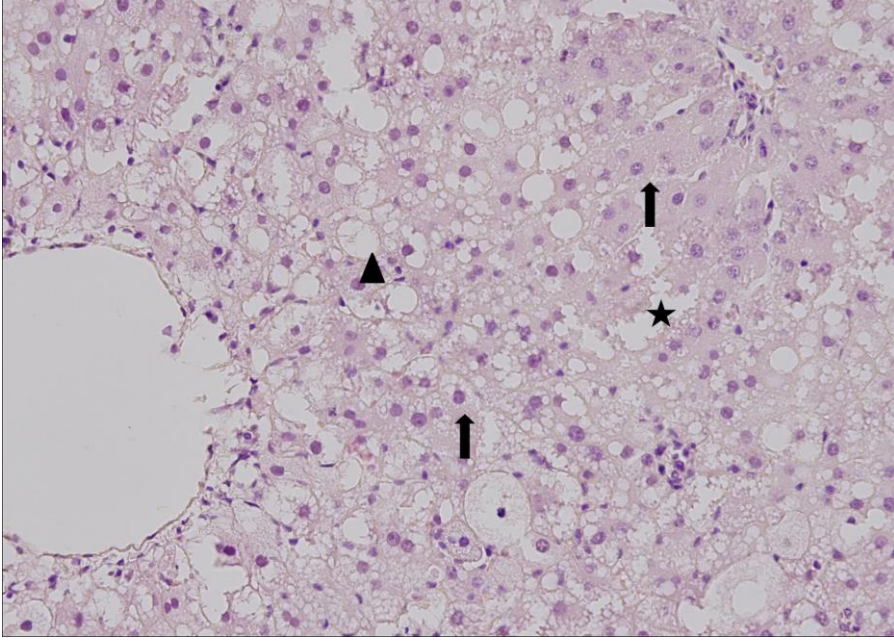
Şekil 24. Grup 2'ye ait karaciğer dokusunda normal hepatositler (↑) ve yağlı değişiklik içeren hepatositler (▲) (H&E X 200).



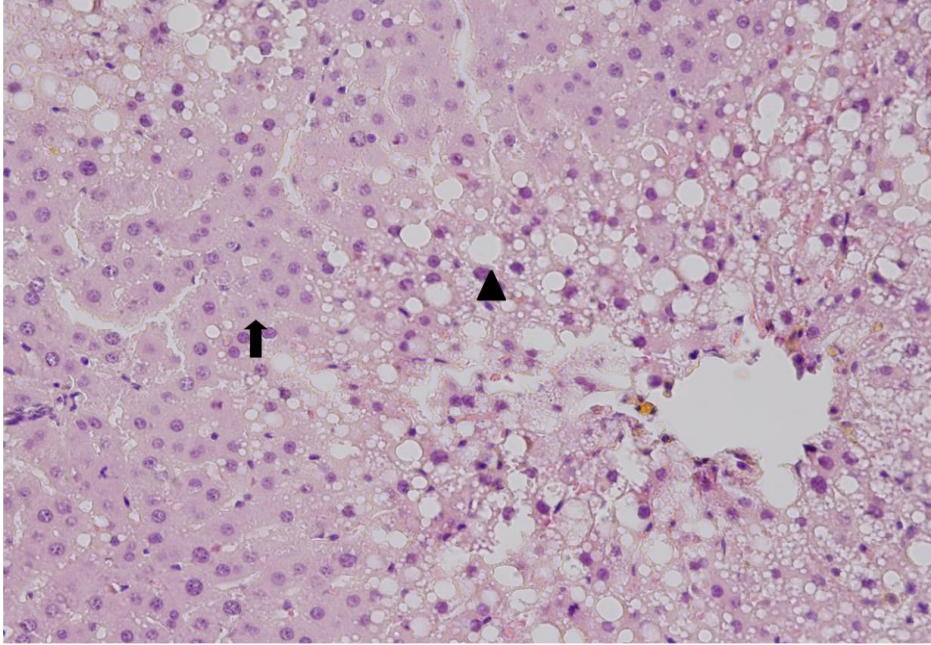
Şekil 25. Grup 3'e ait karaciğer dokusunda normal hepatositler (↑) ve yaygın yağlı değişiklik gösteren hepatositler (▲) (H&E X 200).



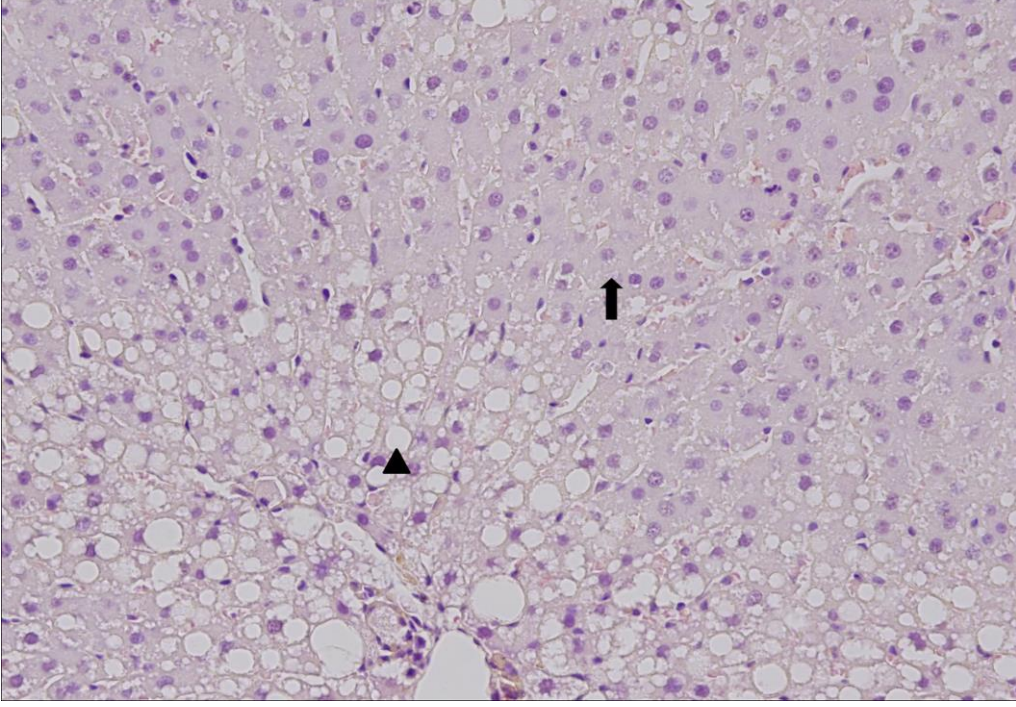
Şekil 26. Grup 4'e ait karaciğer dokusunda normal hepatositler (↑) ve yağlı değişiklik gösteren hepatositler (▲) (H&E X 200).



Şekil 27. Grup 5'e ait karaciğer dokusunda normal hepatositler (↑) ve yağlı değişiklik gösteren hepatositler (▲) ve yer yer sinüzoidal aralıkta genişlemeler (★) (H&E X 200).



Şekil 28. Grup 6'ya ait karaciğer dokusunda yaygın olarak normal hepatositler (↑) ve yağlı değişiklik gösteren hepatositler (▲) (H&E X 200).



Şekil 29. Grup 7'ye ait karaciğer dokusunda yaygın olarak normal hepatositler (↑) ve yağlı değişiklik gösteren hepatositler (▲) (H&E X 200).

4. TARTIŞMA

Bal, polen, arı sütü ve propolis gibi arı ürünleri protein, karbohidrat ve mineral bakımından oldukça zengin gıda ürünleridir. Bu doğal arı ürünlerinin tıbbi amaçlar için insan sağlığını koruma ve tedavi etme maksadıyla kullanımları apiterapi olarak adlandırılmaktadır. Apiterapik uygulamalar son yıllarda bir hayli gelişme göstermiştir.

Karaciğer, metabolik ve anabolik reaksiyonların hemen hemen tümünün gerçekleştiği yegane organ olup pek çok mikroorganizma, virüs ve ksenobiotikler tarafından hasara uğramaktadır. Karaciğer hasarlarının büyük çoğunluğunu hepatitler oluşturmaktadır. Tedavi yöntemlerinin pek çok alanda gelişme göstermesine rağmen karaciğer hasarlarının tedavisinde doğrudan kullanılan kimyasal kaynaklı ilaç bulunmamaktadır. Hepatitlerde doğal ürünler ve en son çare olarak ta interferon kullanılmaktadır. Enginar (*Cynara scolymus*) ve deve dikenini (*Silybum marianum*) özütleri karaciğer hasarlarının tedavisinde en çok kullanılan doğal özütlerdir. Bu nedenle özellikle hepatit hastaları için bu bitkisel özütlerden hazırlanmış haplar ve şuruplar eczanelerde ve aktarlarda bulunmaktadır (D'andrea vd., 2005). Her iki bitkisel kaynağın etken maddesi silimarin adı verilen bir karışım olup dört farklı izomerik flavoligninden oluşmaktadır. Bunlar; silibinin, izosilibinin, silidianin ve silikristindir. Silimarin ekstraktları uzun yıllar boyunca akut ve kronik karaciğer tedavilerinde kullanılmaktadır. Ancak yan etkileri de mevcuttur. Örneğin pek çok hepatik enzimi (aminoprin demetilaz, bezopren hidroksilaz, etoksikumarin de-etilaz ve glutatyon-S-transferaz) inhibe ettiği bildirilmektedir (D'andrea vd., 2005; Schümann vd., 2003). Bunu yanında karaciğer hasarları, viral enfeksiyonlar dışında çeşitli kimyasallara maruz kalma ve gıda zehirlenmeleri gibi etkiler sonucu oluşan oksidatif stres kaynaklıda olabilmektedir.

Arı ürünlerinin yüksek biyoaktif bileşime sahip olduğu ve antioksidan, antiviral, anti-inflamatuar ve anti-tümoral gibi pek çok biyolojik aktif özelliğinin olduğu yapılan bilimsel çalışmalar ile ortaya konulmuştur (Hegazi, 2012, Sarıkaya vd., 2009; Nakajima vd., 2009; Buratti vd., 2007; Eraslan, vd. 2009; Kolonkaya vd. 2002; Yıldız, 2011). Bu gerçekten yola çıkarak planlanan çalışmada bal, polen, propolis ve arı sütünden oluşmuş arı ürünlerinin karaciğer hasarını önlemedeki rolleri araştırıldı.

Bu çalışmada, CCl₄ ile kimyasal etkiye maruz kalmış sıçanlarda oksidatif stres kaynaklı oluşan karaciğer hasarının günlük diyetle birlikte alınan arı ürünleri ile önlenip önlenmediği aydınlatılmaya çalışıldı.

Deney hayvanlarında karaciğer hasarı yaptığı bilinen CCl₄ intraperitoneal yolla verilerek karaciğer hasarı oluşturuldu. Hasar oluşumu karaciğer fonksiyon testleri olarak bilinen plazma aspartat transaminaz (AST) ve alanin transaminaz (ALT) enzim seviyelerindeki artış ve hasarın oluşumunun engellenmesiyle yükselen enzimlerin aktivitelerinin azalması ile takip edildi. Ayrıca karaciğer doku biyopsileri ile plazma ve eritrositlerin antioksidan enzim aktiviteleri ve lipid peroksidasyon ürünlerinin seviyeleri de takip edilerek tespit edildi.

Çalışmada arı ürünleri olarak Karadeniz Bölgesi'nin baskın florasından olan kestanenin (*Chestnut sativa*) balı, poleni ve propolisi kullanıldı. Numuneler deneyimli arıcılardan temin edildi. Arı sütü hariç diğer arı ürünlerinin botanik orijinleri, palinolojik bir test olan mikroskobik polen şekillerine bakılarak değerlendirildi. Çalışmada kestanece zengin bal, polen ve propolis kullanılmasının en önemli sebebi, gerek literatür taramalarında (Tezcan vd. 2011; Nasuti vd. 2006; Küçük vd. 2007) gerekse çalışma grubumuzun yaptığı antioksidan çalışmalarda kestane balının zengin fenolik içeriğine sahip olduğu ve buna bağlı olarak biyolojik değerinin daha yüksek olduğu gerçeğidir.

Bu nedenle çalışmanın başlangıcında toplanan arı ürünlerinin bazı kimyasal analizleri ile antioksidan özellikleri tayin edildi. Antioksidan aktivite ölçümlerinde; toplam fenolik madde miktarı, toplam flavonoid miktarı, toplam antosiyanin miktarı, demir (III) indirgeme kapasitesi testi (FRAP), bakır (II) indirgeme kapasitesi testi (CUPRAC) ve DPPH radikali temizleme testi tercih edildi. Çalışmada kullanılan antioksidan yöntemler literatürde yaygın olarak kullanılan testler olup arı ürünlerinin antioksidan kapasitelerinin tayini içinde uygun testlerdir (Cao ve Prior, 1998; Stratil vd., 2006; Santas vd., 2008).

Fenolik maddeler sekonder metabolit ürünleri olup doğal ürünlerin antioksidan ve diğer birçok biyolojik karakterinden sorumlu bileşenlerdir. Bu nedenle toplam fenolik madde miktarları toplam antioksidan kapasiteyi temsil etmektedir. Standart fenolik ajan olan gallik asit kullanılarak yapılan çalışmada bal, polen, propolis ve arı sütünde toplam fenolik madde miktarı tayin edildi.

Çalışılan arı ürünlerinin antioksidan kapasitenin bir göstergesi olarak kabul edilen toplam fenolik madde miktarlarının 0,95-183,86 mg GAE/g numune olarak değişim gösterdiği ve en yüksek polifenol miktarının propoliste, en düşük içeriğin ise balda olduğu tespit edildi. Propolis'in toplam fenolik madde miktarının yüksek bulunması beklenen bir sonuç olup bulunan değerler literatürle uyumludur. Literatürde yapılan çalışmalarda bal, polen ve propolisin karşılaştırıldığında propolisin diğer arı ürünlerine göre daha yüksek polifenol

miktarına sahip olduğu görülmektedir (Sarıkaya vd., 2009; Nakajima vd., 2009; Buratti vd., 2007). Değişik bal türleri arasında yapılan çalışmalarda kestane balının polifenolik madde miktarının diğer ballardan daha yüksek oranlarda olduğu bildirilmektedir (Aljadi ve Kamaruddin, 2004; Al-Mamary vd., 2002, Küçük vd., 2007). Beretta vd., (2005) değişik balların antioksidan özelliklerini incelemiş ve kestane balının toplam fenolik miktarını 211,2 mg GAE/kg olarak bildirmişlerdir. Slovenya’da yapılan bir çalışmada kestane balının fenolik miktarının 199,9 mg GAE/kg olduğu bildirilmektedir (Bertoncelj vd., 2007). Yapılan farklı bir çalışmada ise kestane balının toplam polifenol miktarının 430 mg GAE/100g bal olduğu görülmektedir (Kolaylı vd., 2008). Marghitaş vd., (2009a) 24 adet farklı balda yaptığı çalışmada balların toplam polifenol miktarlarını 2-125 mg GAE/100g aralığında olduğunu bildirmişlerdir. Propolisin yüksek polifenol imiktarına sahip olduğunu gösteren birçok çalışma vardır (Moreira vd., 2008; Kumazawa vd., 2004; Ahn vd., 2007; Choi vd., 2006; Kalogeropoulos vd., 2009). Fakat kestane propolisinin polifenol miktarı ile ilgili literatürde fazla çalışma bulunmamaktadır. Sarıkaya vd., (2009)’de iki farklı kestane propolisi kullanılmış ve polifenol miktarlarının 313 ve 476 mg GAE/g arasında değişim gösterdiğini bildirmişlerdir. Türkiye florasına ait kestane propolisinin total fenolik miktarı 125,30 mg GAE/g propolis olarak bildirilmektedir (Silici, 2008). Aliyazıcıoğlu vd. (2013)’de yaptıkları çalışmada Türkiye flosarına ait değişik propolis örneklerinin toplam fenolik madde miktarlarının 115-210 mg GAE/g propolis olarak değişim gösterdiğini bildirmişlerdir. Brezilya’da yapılan bir çalışmada 49 adet propolis örneğinin toplam fenolik madde miktarlarının 41-390 mg GAE/g propolis arasında olduğu bildirilmektedir (Silva vd. 2006). Japonya’nın farklı bölgelerinden toplanan propolis örneklerinin toplam polifenol miktarları 53,3-366 mg GAE/g propolis arasında bulunmuştur (Hamasaaka vd., 2004). Farklı coğrafyalardan toplanan propolis örneklerinde yapılan bir çalışmada propolislerin toplam polifenol miktarları ise yaklaşık 100-300 mg GAE/g propolis arasında olduğu bildirilmektedir (Kumazawa vd., 2004). Gerek yapılan çalışmaya ve gerekse literatürdeki değerlere bakıldığında propolisin toplam fenolik madde miktarının coğrafik ve floral kaynaklara bağlı olarak değişim gösterdiği ancak diğer arı ürünlerine kıyasla en yüksek fenolik madde miktarına sahip olduğu görülmektedir.

Polen bitkilerin erkek üreme organları yüksek protein değerine sahip suda çözünebilen bir gıda maddesidir. Çalışmada, kestane bal, propolis ve polenin karaciğer hasarının önlemede rolünün araştırılmasının nedenlerinden biri kestane (*Chestnut sativa*) florasına sahip arı ürünlerinin literatürde antioksidanca zengin olmasıdır. Çalışmamıza benzer şekilde Yıldız,

(2011)'de yaptığı doktora tez çalışmasında kestane poleninun deney hayvanlarında CCl₄ ile oluşturulan karaciğer hasarını önlemede etkili olduğunu bildirmektedir. Yapılan bu çalışmada pozitif kontrol grubu olarak deney hayvanlarına silibinin adı verilen deve dikenini özütünden verildiği ve polenin silibinininden daha etkili olduğu bildirilmektedir. Bu nedenle yapılan bu çalışmada pozitif kontrol olarak silibinin kullanılmayıp sonuçların kestane poleni ile karşılaştırılması planlanmıştır. Çalışmamızda kullanılan kestane poleninun toplam fenolik madde miktarı 13,78±0,34 mg GAE/g polen olarak belirlendi. Portekiz'in farklı bölgelerinden toplanan değişik türdeki polenlerin toplam polifenol miktarları yaklaşık 10-17 mg GAE/g numune arasında bulunmuştur (Morais vd., 2011). Eraslan vd., (2009)'de poleninun toplam polifenol miktarı 8,5 mg GAE/g polen, Kroyer ve Hegedus, (2007)'de ise 8,2 mg GAE/g polen bulunmuştur. Yapılan başka bir çalışmada Brezilya'nın iki farklı bölgesinden toplanan polenlerde toplam polifenol miktarları bakılmış ve 3,6-10,9 mg GAE/g polen arasında değerler olduğu bildirilmiştir (Carpes vd., 2007). Literatürdeki çalışmalara bakıldığında kestane poleninun diğer polen türlerinden daha yüksek polifenol içerdiği görülmektedir. Yapılan çalışmada kullanılan propolis örneğinin (183,86±6,35 mg GAE/g) polenden (13,78±0,34 mg GAE/g) yaklaşık olarak 14 kat ve baldan (0,95±0,07 mg GAE/g) yaklaşık 200 kat ve arı sütünden ise (4,29±0,03 mg GAE/g) yaklaşık 40 kat yüksek fenolik madde miktarına sahip olduğu bulundu. Literatürde çok sayıda polen ve propolis ile ilgili çalışmalar mevcut olup arı sütünün fenolik madde miktarı ile fazla çalışma bulunmamaktadır. Nagai ve Inoue, (2004), arı sütünde Folin-Ciocalteu metoduna göre toplam fenolik madde miktarını 21,2 µg GAE/mg arı sütü olarak bildirmektedir. Farklı bir çalışmada 18 farklı arı sütünün toplam polifenol değerleri ortalama 0,45 mg GAE/g numune olarak bildirilmiştir (Boyacıoğlu, 2012). Nagai ve Inoue, (2004) arı sütünün protein ve yağ asitlerince zengin bir karışım olup fenolik madde miktarının çok yüksek olmadığını belirtmektedir. Ancak bulduğumuz çalışma sonuçları göstermektedir ki arı sütünün toplam fenolik madde miktarı ve ona bağlı olarak antioksidan kapasitesi baldan daha yüksektir. Dolayısıyla arı sütü gerek besin olarak ve gerekse de antioksidan yönden değerli bir doğal üründür.

Polifenolik bileşiklerin alt sınıflarından biri de flavonoidlerdir. Flavonoidler bitkinin renk, koku ve aromasından sorumlu ajanlar olup flavonlar, flavonoller, flavononlar, antosiyanidinler, izoflavonlar gibi alt sınıflara ayrılırlar (Bors vd., 1990; Ross ve Kasum, 2002). Halk arasında Vitamin P olarak da bilinirler (Sorata vd., 1984) ve sarı, kırmızı, mavi renkli olup yüksek antioksidan kapasiteye sahiptirler (Naczk ve Shahidi, 2004). Çalışmada kullanılan arı ürünlerinin toplam flavonoid madde miktarları Chang vd., (2002)'nin ileri

sürdüğü kolorimetrik bir yöntem olan $AlCl_3$ yöntemine göre tayin edildi ve kuersetin standardı kullanılarak değerlendirildi.

Çalışmada kullanılan numunelerin flavonoid miktarları bal için; 0,56 mg kuersetin/g numune, polen için; 1,64 mg kuersetin/g numune, propolis için; 106,61 mg kuersetin/g numune ve arı sütü için 1,16 mg kuersetin/g numune olarak bulundu. Literatürde kestane balının toplam flavonoid profili ile ilgili çok az bilgi bulunmaktadır. Andrade vd., (1997), kapiler zon elektroforez tekniğini kullanarak farklı bitkisel kaynaklı Avrupa ballarının flavonoid profilini belirlemişlerdir. Bu araştırmaya göre, kestane balı fenolik asitler açısından çok zengin olduğunu fakat flavonoidler açısından oldukça fakir olduğunu rapor etmişlerdir. Blasa vd., (2007) kullandıkları baldaki flavonoid miktarını 1,64 mg kateşin/100 g bal olarak bildirmişlerdir. Aynı araştırmacının farklı bir çalışmasında incelediği balların flavonoid miktarlarının 0,45-0,93 mg kateşin/100 g bal arasında değişim gösterdiğini bildirmişlerdir (Blasa vd., 2006). Romanya'da 24 bal örneğinde yapılan çalışmada balların flavonoid miktarları 0,91-28,25 mg kuersetin/100 g bal arasında bulunmuştur. En yüksek flavonoid miktarının çoklu floraya sahip ballarında olduğu bildirilmiştir (Marghitaş vd., 2009a). Socha vd., (2009)'da 10 farklı balın flavonoid miktarı incelemiş ve balların flavonoid miktarlarının 6,9-28,5 mg kuersetin/100 g bal arasında olduğunu bildirmişlerdir. Yıldız, (2011) 4 farklı kestane polenin toplam flavonoid miktarlarının 8,07-9,64 mg kuersetin/g arasında değişim gösterdiğini ve Zonguldak yöresine ait kestane polenin flavonoid miktarının daha yüksek olduğunu bildirmiştir. Marghitaş vd., (2009b) yaptıkları çalışmada 12 polen türünü incelemiş ve en yüksek flavonoid miktarının söğüt poleninde (13,6 mg kuersetin/g polen) olduğunu belirtmiştir. Leja vd., (2007)'de toplam flavonoid miktarlarının 3,8 mg Kuersetin/g ile 13,6 mg Kuersetin/g arasında değişim gösterdiği tespit edilmiştir. İspanya'da yapılan bir araştırmada 11 çeşit polen kullanılmış ve polenlerin flavonoid miktarının 0,35-0,51 mg rutin/100 g polen arasında olduğu bulunmuştur (Bonvehi vd., 2001). Carpes vd., (2009) kuersetin standardını kullanarak polendeki flavonoid miktarını 8,92 mg/g polen olarak bildirmiştir. Itavo vd., (2011) yaptığı çalışmada 2 farklı renkte propolis çalışmış ve toplam flavonoid miktarlarını 4,5 ve 14,9 g kuersetin/kg propolis olarak bildirmiştir. Yapılan başka bir çalışmada farklı coğrafik bölgelerden toplanan 16 adet propolisin flavonoid miktarı 2,5-176 mg kuersetin/g propolis arasında olduğu bildirilmiştir (Kumazawa vd., 2004). Moreno vd., (2000)'de propolis örneklerinin flavonoid miktarları 13,3-42,6 mg kuersetin/g propolis arasında olduğu belirtilmiştir. Japonya'nın farklı bölgelerinden toplanan 14 propolis örneğinin flavonoid miktarları 18,3-113,1 mg kuersetin/g propolis arasında bulunmuştur (Hamasaka vd.,

2004). Çin’de yapılan bir araştırmada ise 20 propolis örneği kullanılmış ve propolislerin toplam flavonoid miktarları 8,3-188 mg kuersetin/g propolis arasında olduğu bildirilmiştir (Ahn vd., 2007). Arı sütünün flavonoid içeriği hakkında çalışmalar var iken (Cushnie ve Lamb, 2005; Fiorani vd., 2006) toplam flavonoid miktarı hakkında çok az çalışmaya rastlanmaktadır. Boyacıoğlu, (2012)’de 18 arı sütün örneği incelenmiş ve flavonoid miktarını ortalama 0,42 mg kuersetin/g arı sütün olarak bulmuştur. Çalışmamızda kullanılan arı sütün daha yüksek flavonoid miktarına sahiptir.

Fenolik bileşiklerin bir başka sınıfını antosiyaninler oluşturur (Shahidi ve Naczki, 1995). Çalışmada arı ürünlerinin toplam antosiyanin miktarları pH-differansiyel metoduna göre tayin edilip sonuçlar referans antosiyaninlerden siyanidin-3-glukozit cinsinden ifade edildi. Bal, polen ve propolisin antosiyanin miktarları sırasıyla 0,13; 4,06; 5,11 mg Cyn-3-glu/g numune olarak bulundu. Owayss vd., (2004) alışmasında çeşitli arı ürünlerinin (bal, polen, propolis ve bal mumu) antosiyanin miktarlarını ölçmüşler ve 3 farklı bal, polen ve propolis türünde antosiyanin miktarlarının bal için 9,89-14,35 µg Cyn-3-glu/g, propolis için, 10,97-34,65 µg Cyn-3-glu/g ve polen için 24,15-50 µg Cyn-3-glu/g aralığında olduğunu bildirmişlerdir. Leja vd., (2007) kullandığı 12 polende antosiyanin miktarlarını 91,7-327 mg Cyn-3-glu/100g polen arasında olduğunu bildirmiştir. Farklı bir çalışmada kestane polenlerinin antosiyanin miktarları 54,32-92,71 mg Cyn-3-glu/kg polen aralığında olduğu bulunmuştur (Yıldız, 2011).

Çalışmada, arı ürünlerinin antioksidan aktivitesinden sorumlu fenolik bileşikler kantitatif olarak tayin edildikten sonra antioksidan aktivite testleri ile her bir doğal ürünün antioksidan kapasiteleri tayin edildi. Bu amaçla, demir (III) indirgeme/antioksidan kuvveti (FRAP) yöntemiyle FeSO₄ standardı kullanılarak 595 nm’de numunelerin toplam antioksidan kuvvetleri incelendi ve sonuçlar µmol FeSO₄.7H₂O/g numune olarak verildi. Numunelerin demir (III) indirgeme kuvveti sıralaması propolis (1416,2 µmol/g) > polen (48,75 µmol/g) > arı sütün (1,80 µmol/g) > bal (1,02 µmol/g) şeklinde olduğu tespit edildi. Çalışılan tüm arı ürünlerinin demir (III) indirgeme aktivitesine sahip olduğu görölmektedir. Sarıkaya vd., (2009)’de iki adet kestane balı kullanılmış ve FRAP değerleri Trolox[®] eşdeğeri cinsinden 94,27 ve 104,42 µM/g olarak verilmiştir. Farklı bir çalışmada 9 bal örneği kullanılmıştır ve bu balların 2 tanesinde kestane karışımı bulunmaktadır. Kestane karışımı bulunan balların FRAP değeri Trolox[®] eşdeğeri cinsinden 67 ve 87 µM/mg olarak belirtilmiştir (Ulusoy vd., 2010). Blasa vd., (2007)’de multifloral bal örneğinin FRAP değeri 37,7 µmol FeSO₄/100 g bal olarak bulunmuştur. Beretta vd., (2005) alışmasında 15 türde bal kullanılmış ve kestane balının

FRAP değerini 388,6 $\mu\text{M FeSO}_4/\text{g}$ bal olarak bulmuştur. Farklı bir çalışmada 6 bal örneği kullanılmış ve FRAP değerleri 139,9-1131,3 $\mu\text{M FRAP}$ (1000 μM asetik asit = 2000 $\mu\text{M FRAP}$) aralığında olduğu bildirilmiştir (Taormina vd., 2001). Bertoncej vd., (2007) yaptıkları çalışmada 7 adet balı (kestane, akasya, köknar, ihlamur, ladin, orman ve karışık bal türleri) incelemiş ve FRAP değeri en yüksek balın köknar balı (426,4 $\mu\text{mol FeSO}_4.7\text{H}_2\text{O /L}$) olduğunu bildirmiştir. Karadeniz Bölgesi'ne ait 4 kestane polenin demir (III) indirgeme kapasitelerinin Troloks[®] eşdeğeri cinsinden 68,04-82,31 mM TEAC/g kuru polen arasında olduğu bildirilmiştir (Yıldız, 2011). Marghitaş vd., (2009b)'da Romanya'nın değişik floralarından 12 tür polen toplanmış ve bu polenlerin FRAP değerleri 0,26-5,36 mmol $\text{FeSO}_4.7\text{H}_2\text{O/g}$ polen arasında bulunmuştur. Farklı bir çalışmada Sonoran Çölü'nden toplanan 6 farklı polen türünde demir indirgeme kapasitesi incelenmiş ve FRAP değerleri 0,93-3,96 mM TEAC/g polen arasında olduğu bildirilmiştir (LeBlanc vd., 2009). Yine Romanya'da yapılan farklı bir çalışmada polenlerin demir (III) indirgeme kapasiteleri 0,433-1,542 mmol $\text{FeSO}_4.7\text{H}_2\text{O/L}$ olarak verilmiştir (Stanciu vd., 2008). Sarıkaya vd., (2009) kestane propolis örneklerinin demir indirgeme antioksidan gücünü 327,76 ve 659,88 $\mu\text{M Troloks}^{\text{®}}/\text{g}$ numune olarak bildirmiştir. Yapılan bir çalışmada Yunanistan, Ege Denizi adaları ve Kıbrıs'ın çeşitli yerlerinden propolis örnekleri toplanmış ve bu örneklerin FRAP değerleri 2,14-3,35 mmol askorbik asit/g numune arasında bulunmuştur (Kalogeropoulos vd., 2009). Bonvehi ve Gutierrez, (2011) İspanya'da yaptıkları çalışmada 19 propolis örneğinin demir (III) indirgeme kapasitelerini 1,573-4,669 $\mu\text{mol FeSO}_4.7\text{H}_2\text{O/g}$ propolis arasında bulmuşlardır. Yapılan bir çalışmada arı sütünün FRAP değeri 8 $\mu\text{mol FeSO}_4.7\text{H}_2\text{O/L}$ olarak verilmiştir (Ross, 2009). Farklı bir çalışmada ise 18 arı sütünün FRAP değeri ortalama 0,30 mg TEAC/g olarak belirtilmiştir (Boyacıoğlu, 2012).

Bakır (II) iyonu indirgeyici antioksidan kapasite (CUPRAC) son yıllarda kullanılmaya başlanılan Apak vd., (2004) tarafından geliştirilen bir antioksidan ölçüm yöntemi olup FRAP yöntemi gibi doğal ürünlerin toplam antioksidan kapasitesinin ölçümü için çok basit ve güvenilir bir metottur. Çalışmada CUPRAC değerleri bal için 0,01, polen için 0,19, propolis için 2,95 ve arı sütü için 0,03 mmol TEAC/g numune olarak bulundu. Sarıkaya vd., (2009)'da kestane ballarının CUPRAC değerleri 6,5 ve 7,7 $\mu\text{M TEAC/mg}$ bal olarak ve kestane propolislerinin CUPRAC değerleri 0,692 ve 1,410 $\mu\text{M TEAC/g}$ propolis olarak bulunmuştur. Ulusoy vd., (2010)'da 9 bal örneğinin CUPRAC değerleri araştırılmış ve değerlerin 124,8-532 $\mu\text{mol TEAC/g}$ arasında olduğu bildirilmiştir. Boyacıoğlu, (2012) çalışmasında kullandığı balların bakır (II) indirgeme gücünü 0,85-12,28 mg TEAC/g numune arasında olduğunu

belirtmiştir. Aynı çalışmada polen, propolis ve arı sütü örneklerinin de CUPRAC değerleri araştırılmıştır. Propolislerin CUPRAC değerleri 447-1433 mg TEAC/g arasında, polenlerin 14,97-89,37 mg TEAC/g arasında ve arı sütü örneklerinin ise 0,95-8,71 mg TEAC/g arasında olduğu bildirilmiştir. Türkiye'nin farklı bölgelerinden toplanan polenlerin CUPRAC değerleri 26,2-89,4 mg TEAC/g arasında bulunmuştur (Yeşiltaş vd., 2012).

Yapılan çalışmada toplam fenolik madde miktarı arı sütünde 4,29 mg GAE/g numune olup baldan (0,95 mg GAE/g) yaklaşık 5 kat daha yüksek olarak tespit edildi. Buna paralel olarak toplam flavonoid, FRAP ve CUPRAC değerleri bala göre arı sütünde daha yüksek bulundu. Arı ürünlerinin antioksidan aktivitesinden esas sorumlu bileşikler fenolik maddeler olup gerek literatürde yapılan çalışmalarda gerekse de bu çalışmada artan fenolik bileşen miktarına paralel olarak toplam antioksidan aktivitede artış göstermektedir (Hegazi, 2012; Eraslan vd., 2008).

Doğal ürünlerin serbest radikal temizleme yeteneğinin belirlenmesinde en yaygın kullanılan yöntem DPPH radikali temizleme testi olup iyi bir antioksidan test yöntemidir (Ahn vd., 2007). Yöntem 517 nm de absorbans veren DPPH[•] radikalinin antioksidan madde varlığında kaybolması ve neticesinde absorbanstaki azalma ile karakterizedir. Radikalin %50'sini temizleyen madde miktarı SC₅₀ olarak adlandırılır ve düşük SC₅₀ yüksek radikal temizleme kapasitesini ve dolayısıyla yüksek aktiviteyi gösterir.

Troloks[®] standart öncülüğündeki yapılan ölçümlerde numunelerimizin SC₅₀ değerleri; bal, polen, arı sütü ve propolis için sırası ile 19,64; 0,49; 38,72 ve 0,07 mg/mL'dir. Diğer testlerde olduğu gibi en iyi DPPH radikal temizleme aktivitesini propolis gösterdi. Arı sütü en düşük DPPH radikal temizleme aktivitesine sahip ürün olup kestane balına göre iki kat daha düşük DPPH radikal temizleme yeteneği göstermiştir. Arı sütü düşük DPPH radikali temizleme kapasitesi göstermesine rağmen yüksek Fe (II) iyonu indirgeyebilme kapasitesi göstermiştir. Bunun sebebi yüksek olasılıkla arı sütünde bulunan indirgen ajanların DPPH radikaline karşı afinitelerinin daha düşük olması olabilir.

Sarıkaya vd., (2009)'da kullanılan kestane ballarının SC₅₀ değerleri 5,7 ve 9 mg/mL olarak bulunmuştur. Aynı çalışmada kestane propolislerinin de SC₅₀ değerleri incelenmiş ve 5 ve 5,2 mg/mL olarak bulunmuştur. Ulusoy, (2005)'de farklı bölgelere ait kestane ballarının SC₅₀ değerleri karşılaştırılmış ve 0,015-0,058 g/mL arasında olan sonuçlar elde edilmiştir. Türkiye'nin farklı bölgelerinden toplanan balların DPPH radikalini temizleme aktiviteleri 90-296 µg/mL arasında bulunmuştur (Ulusoy vd., 2010). Farklı bir çalışmada Nijerya'nın farklı bölgelerinden toplanan 12 bal örneğinin DPPH radikali temizleme kapasiteleri incelenmiş ve

SC₅₀ değerleri 45,94-83,13 mg/mL arasında olduğu bildirilmiştir (Ita, 2011). Beretta vd., (2005)'te 14 farklı balın DPPH radikali temizleme aktiviteleri 1,63-47,62 mg/mL arasında bulunmuştur. Yeşiltaş vd., (2012)'de çalışmasında kullandığı polenlerin SC₅₀ değerlerinin 4,4-9,4 mg TEAC/g arasında olduğu bildirmiştir. Marghitaş vd., (2009b) alışmasında polenlerin DPPH radikali temizleme kapasitesini 0,135-2,814 mmol Toloks/g arasında bulmuştur. Brezilya'da yapılan bir çalışmada polenlerin DPPH radikali temizleme kapasiteleri 810-4690 µg/mL arasında bulunmuştur (Carpes vd., 2009). Farklı bir çalışmada ise çalışılan polenlerin SC₅₀ değerleri 2,16-5,87 mg/mL arasında hesaplanmıştır (Morais vd., 2011). Arjantin'de yapılan bir çalışmada propolislerin DPPH radikali temizleme kapasiteleri 20-67,5 µg/mL aralığında bulunmuştur (Moreno vd., 2000). Moreira vd., (2008) alışmasında propolislerin SC₅₀ değerlerini 0,052 ve 0,006 mg/mL olarak vermiştir. Gülçin vd., (2010) Erzurum propolisinde yaptığı çalışmada SC₅₀ değerini 11,45 µg TEAC/mL olarak vermiştir. Farklı bir çalışmada Yunanistan ve Kıbrıs propolisleri kullanılmış ve DPPH radikali temizleme aktivitelerinin 80,2-338,5 mmol Troloks/g aralığında olduğu bildirilmiştir (Kalogeropoulos vd., 2009). Nagai ve Inoue, (2004) arı sütünün DPPH radikal temizleme aktivitesini 0,1 mM askorbik asidin aktivitesinden daha düşük olduğunu bildirmektedir. Buratti vd., (2007) alışmasında 4 farklı arı sütü kullanılmış ve SC₅₀ değerlerinin 1,4-7,0 mg/mL olarak bildirmiştir. Aynı çalışmada 12 adet bal ve propolis örneklerinin de DPPH radikali temizleme aktivitesine bakılmıştır. Sonuçlar ise ballar için 8-15,5 mg/mL, propolisler için 1-36 mg/mL aralığında verilmiştir.

Polen ve arı sütünün toplam protein miktarları yarı otomatik Kjeldahl yakma nitesi kullanılarak tespit edildi. Polenin %16,80 protein miktarına, arı sütünün ise %13,0 protein miktarına sahip olduğu gözlendi. Yıldız, (2011)'de kestane polenlerinin protein miktarları %17,67 ile %23,67 arasında bulunmuştur. Tüylü ve Sorkun, (2006), alışmalarında Bursa'nın farklı bölgelerinden topladıkları polenlerin protein miktarlarını %23,32-%24,25 aralığında olduğunu bildirmişlerdir. Arjantin'de yapılan bir çalışmada polenlerin protein miktarları %13,6-%39,9 arasında olduğu bulunmuştur (Andrada ve Telleria, 2005). Arı sütünün protein miktarı için yapılan bir çalışmada 7 farklı arı sütü kullanılmış ve protein miktarları %11,99-%14,01 aralığında bulunmuştur (Garcia-Amoedo ve Almeida-Muradian, 2007). Tayland'ta yapılan bir çalışmada arı sütü örneklerinin protein miktarları %12,05 ile %13,76 arasında olduğu bildirilmiştir (Wongchai ve Ratanavalachi, 2002). Sabatini vd. (2009) kullandıkları arı sütü örneklerinin protein miktarlarını %27-41 arasında olduğunu belirtmiştir.

Sonuç olarak bir genelleme yapmak gerekirse, çalışmada kullanılan propolis örneğinin bal, polen ve arı sütünden yüksek polifenol, flavonoid ve antosiyanin içeriğine sahip olduğu ve bunlara bağlı olarak yüksek antioksidan kapasitesine sahip olduğu belirlendi. Protein miktarı bakımından polenin arı sütüne göre daha yüksek protein içerdiği gözlemlendi.

Karaciğer anabolik ve katabolik metabolizmalardan sorumlu temel organdır. Ayrıca ilaç metabolizmasının gerçekleştiği temel doku olup ksenobiyotiklerin karaciğer mikrozomlarında (P450 sistemi ile) metabolize edilerek hidrofilik hale getirilmesini ve idrarla vücuttan atılmasını sağlamaktadır (Lock ve Reed 1998; Sturgill ve Lambert 1997). Ksenobiyotik olarak adlandırılan çeşitli ilaçlar ve kimyasallar karaciğerde serbest radikal oluşmasına yol açarak hepatoksik bozukluklara neden olmaktadır (Fernandez-Checa and Kaplowitz, 2005). Karaciğer hasarları ayrıca çeşitli bakteriyel ve viral enfeksiyonlardan dolayı da meydana gelmektedirler ve bunlar hepatit olarak adlandırılmaktadır. Hepatitlerin tedavilerinde ise kimyasal ilaçlardan ziyade doğal ürünler kullanılmaktadır. Bu nedenle son yıllarda özellikle hepatit tedavisinde doğal bitki ve gıdaların iyileştirici etkilerini dikkate almaktadır (Ulicna vd., 2003; Al-Qarawi vd., 2004; Rizk vd., 2007; Eminedoki vd., 2010; Khan vd., 2010; Ting vd., 2011)

Bu nedenle planlanan çalışmada bir kimyasal ajan olan ve karaciğer için toksik olduğu bilinen CCl₄ tarafından sıçanlarda oluşturulan karaciğer hasarını önlemede arı ürünlerinin etkinlikleri incelenip hangi ürünün daha etkili olduğu tespit edildi. CCl₄ indüklü karaciğer hasarı insanlardaki çeşitli toksinlerin meydana getirdiği karaciğer hasarına eş olarak kabul edilir. Bu genel inancıya göre CCl₄ hepatoksisitesi sitokrom P450'nin triklorometil serbest radikalini (CCl₃•) indirgeyici aktivitesine bağlıdır. CCl₃• kendi başına yüksek toksik etkiye sahiptir ve *in vivo* olarak çok sayıda ek reaktif ara maddelere dönüşebilir. Oluşan serbest radikaller hücre membranlarındaki fosfolipidlerde bulunan yağ asidlerinin peroksidasyonuna yol açarak hücre harabiyetine sebep olur (Basu, 2003; Stoyanovsky ve Cederbaum 1999; Castro vd., 1997). CCl₄'e bağlı olarak gelişen karaciğer hasarında lipit peroksidasyonu son derece önemlidir. Çünkü bu hasara bağlı olarak ilerleyen süreçte karaciğer fibrozu ve siroz oluşur (Nadkarni ve Souza, 1988).

Çalışma bir grupta 7 adet sıçan olmak üzere, toplam 7 ayrı grup ve 49 adet dişi sıçan üzerinde 7 gün süreyle uygulanarak gerçekleştirildi. İlk iki grup kontrol grupları olarak belirlendi. Grup I'e sadece serum fizyolojik (SF) (0,8 ml/kg sıçan) intraperitoneal (i.p.) yolla uygulandı. Grup II'ye propolisin çözücüsü olduğu için etil alkol (0,8 ml/kg sıçan) i.p. yolla uygulandı. Grup III, CCl₄ ile hasar oluşturulan gruptur ve CCl₄ zeytinyağında çözülerek (1:1)

(0,8 ml/kg sıçan) i.p. yolla uygulandı. Grup IV, polen grubu olup, CCl₄ ile birlikte uygulandı. CCl₄ (0,8 ml/kg sıçan) i.p. yolla, polen (400 mg/kg sıçan) gavaj yoluyla uygulandı. Grup V, gavaj yoluyla uygulanan propolis grubu (400 mg/kg sıçan) olup CCl₄ (0,8 ml/kg sıçan) ile birlikte uygulandı. Grup VI, gavaj yoluyla uygulanan bal grubu(400 mg/kg sıçan) olup CCl₄ (0,8 ml/kg sıçan) ile birlikte uygulandı. Grup VII, arı sütü grubu (50 mg/kg sıçan) olup CCl₄ (0,8 ml/kg sıçan) ile birlikte uygulandı. CCl₄ i.p. yolla, arı sütü gavaj yoluyla uygulandı. 8. gün sıçanlar dekapite edilerek kanları ve karaciğerleri hızlı bir şekilde alındı ve ayrıldı.

Sıçanlarda deney sonrası ağırlık değişimleri incelendiğinde serum fizyolojik kontrol grubunda %4,21 oranında kilo artışı gözlemlenirken, alkol grubunda %0,93 oranında azalma görüldü. Polen grubunda %2,29 ve propolis grubunda %2,78 oranında kilo kaybı gözlemlendi. En yüksek kilo kaybının gözlemlendiği grup CCl₄ grubu (%3,65) iken, bal ve arı sütü gruplarında ise değişim gözlenmedi. Burada CCl₄ uygulanan sıçanlarda bal ve arı sütünün kilo kaybına karşı hayvanlarda bir direnç gösterdiği, hayvanları hastalığa karşı beslediği belirlendi.

ALT, karaciğerdeki intraselüler bir enzimdir ve karaciğer hasarının belirlenmesinde belirteç olarak kullanılmaktadır. AST, tek başına karaciğere özel değildir fakat organ hasarında artış gösterir. ALT ve AST değerlerindeki artış karaciğer hasarının bir göstergesidir (Kanter vd., 2003; Öztürk vd., 2009). Bu nedenle çalışmada karaciğer hasarının oluştuğunun tespit edilmesinde ve arı ürünlerinin tedavisinin izlenmesinde plazma AST ve ALT enzimlerinin aktiviteleri belirteç olarak kullanıldı. Ayrıca eritrosit, plazma ve karaciğerde CCl₄'den kaynaklanan oksidasyonun değişimleri ve oksidasyon ürünleri SOD, MDA ve CAT düzeylerinin belirlenmesi ile test edildi.

Plazma ALT ve AST aktivitelerinde, serum fizyolojik ve alkol grubu olarak adlandırdığımız kontrol gruplarında anlamlı değişim gözlenmezken, CCl₄ grubunda SF kontrol grubuna göre ALT ve AST değerleri son derecede anlamlı bir şekilde yüksek bulundu. Ayrıca histopatolojik bulgular da bu anlamlı yükselişi desteklemektedir. Bu sonuçlar CCl₄ grubunda deneysel karaciğer fibrozunu (siroz) gerçekleştirdiğimizi göstermektedir. Polen, propolis, bal ve arı sütünün uygulandığı gruplarda ise ALT ve AST değerlerinde CCl₄ grubuna göre anlamlı bir düşüş gözlemlendi. Bu sonuçlar arı ürünlerinin karaciğer hasarını önlemede etkili olduğunu gösterdi.

Sirozda oluşan lipid peroksidasyonu ve antioksidan enzimlerde olan değişikliklerin karaciğerde meydana gelen hasarın derecesine bağlı olduğu ileri sürülmektedir. Recknagel, (1967) CCl₄'ün yol açtığı karaciğer hasarının genellikle karaciğer mikrozomlarındaki lipid

peroksidasyonuna bağlı olduğunu bildirmiştir. Yine yapılan çalışmalarda radikal hasarın bir göstergesi olan lipid peroksidasyonu artmış MDA seviyeleri ile açıklanmaktadır. CCl₄ kullanımına bağlı olarak ortaya çıkan lipid peroksidasyonu, artmış MDA seviyeleriyle pozitif korelasyon göstermektedir (zenirler vd., 1996; Wang vd., 2007; Yıldız, 2011; Ramadana ve Al-Ghamdi, 2012). Yapılan alışmalar antioksidan ajanların artan MDA seviyesini anlamlı bir şekilde düşürdüğünü bildirmektedir (Noyan vd., 2006; Sanmugapriya ve Venkataraman, 2006; Kanter vd., 2003).

Nitekim alışmamızda da literatürde belirtildiği gibi CCl₄ uygulaması sonrasında analiz yapılan eritrosit paketlerinde ve karaciğer dokularında MDA seviyesinin arttığı gözlemlendi. Plazmada da MDA seviye analizi yapıldı fakat MDA seviyesi çalışılan standart eğrinin tayin sınırlarının altında olduğu için belirlenemedi. Karaciğer dokusunda yapılan analizlerde kontrol gruplarına ait MDA seviyeleri düşük bulunurken, CCl₄'e maruz kalmış sıçanlarda MDA değerleri anlamlı olarak artış gösterdi. Arı sütü, bal, polen ve propolis ile beslenen sıçanlarda ise MDA seviyesi anlamlı olarak azalma gösterdi. Propolis MDA seviyesini en fazla azaltan ürün olup onu polen, bal ve arı sütü izledi. Eritrosit paketlerinde ise CCl₄'e maruz kalmış grupların MDA seviyesinin yükseldiği, ancak arı ürünleri ile beslenen gruplarda ise MDA seviyesinin anlamlı derecede azaldığı gözlemlendi. Artmış lipid peroksidasyonu, proteolitik lizozomal enzimlerin ve mitokondriyal matriks enzimlerinin sitoplazma içine salınmasına sebep olabilmekte ve bu da hücre içi proteinlerin yıkılmasına ve hücre ölümüne yol açabilmektedir (Sinclair vd., 1990; Morrow vd., 1991; Thomas, 1995). Bu durumda özellikle hücrelerin sıvı ortamlarında katalaz (CAT), süperoksit dismutaz (SOD), glutatyon peroksidaz gibi enzimleri içeren vücudun antioksidan savunma sisteminin önemi ortaya çıkmaktadır. Eğer antioksidan savunma sistemi reaktif oksijen türlerini yeteri kadar zararsızlaştıramazsa, reaktif oksijen türlerinin bahsedilen toksik etkilerine maruz kalınabilir (Sinclair vd., 1990). Bu sonuçlarda bize gıda olarak tüketilen arı ürünlerinin (bal, polen, propolis ve arı sütü) oksidatif stres sonucu oluşan lipit peroksidasyonu önlediği ve bu lipit peroksidasyonu nleme yeteneğinin arı ürünlerinin fenolik içeriklerine paralel bir şekilde değişim gösterdiğini göstermektedir.

Yapılan çalışmada oksidatif stresin MDA'dan başka SOD ve CAT antioksidan enzimleri üzerindeki etkileri de ölçüldü. SOD metabolizmada oksijenin eksik indirgenmesi ile oluşan süperoksit radikallerinin temizlenmesinde rol oynayan bir antioksidan enzimdir. CAT enzimi, substrat olarak SOD enziminin ürününü (H₂O₂-hidrojen peroksit) kullanmaktadır. Fakat hücrelerdeki hidrojen peroksitin tek kaynağı SOD enzimi değildir. Başka kaynaklardan

da gelmesi (peroksizomlar, sitokrom P450 sistemleri, prostaglandinlerin sentezi vb.) ihtimal dahilindedir. Plazma, karaciğer dokusu ve eritrositlerde SOD aktivitesi, plazma ve karaciğer dokusunda ise CAT aktivitesi ölçüldü. Plazma SOD aktivitesinde anlamlı bir değişim gözlenmezken, CCl₄'e maruz kalmış sıçanların eritrosit paketlerindeki SOD seviyesinin düştüğü, ancak karaciğer dokusundaki SOD seviyesinin ise arttığı gözlemlendi. CCl₄ uygulaması karaciğer dokusunda oksidatif hasara neden olarak süperoksit radikallerinde artış meydana getirebilir. Buna bağlı olarak SOD aktivitesinde de artış gözlenmiş olabilir. CAT aktivitesinin kontrol gruplarına göre CCl₄ grubunda daha düşük olduğu gözlemlendi. Arı ürünleri ile beslenen gruplarda ise CCl₄'e maruz bırakılan gruba göre CAT aktivitesinin arttığı gözlemlendi. Bu durum artmış oksidatif strese bağlı enzimlerin aşırı tüketiminden veya muhtemelen diğer sistemlerin (glutasyon peroksidaz enzimi ve bazı enzimatik olmayan süreçler) CAT enziminden daha etkin bir şekilde detoksifikasyon sürecine katkıda bulunması olabilir.

Literatürde arı ürünlerinin CCl₄, parasetamol ve alkol gibi toksik maddelerin meydana getirdiği karaciğer hasarını önlediğini gösteren birçok çalışma bulunmaktadır (Cemek vd., 2010; Eminatedoki vd., 2010; Kolankaya vd., 2002).

Kolankaya vd., (2002) yaptıkları çalışmada alkolle sıçanlarda karaciğer hasarı oluşturmuş ve serum lipit değişimi ile ALP ve AST enzimlerinin aktivitelerini incelemiştir. Sonuç olarak kestane propolisi ile beslenmenin karaciğer hasarını önlediğini ve serum lipit profilini düzenlediğini bildirmişlerdir. Bhadauria, (2012)'de propolisin CCl₄'ün neden olduğu karaciğer hasarını önlediğini bildirmiştir. Benzer şekilde farklı bir çalışmada propolisin CCl₄ indüklü karaciğer hasarında koruyucu rolü olduğu rapor edilmektedir (Bhadauria vd., 2008). Araujo vd., (2003) CCl₄ ile karaciğer hasarı oluşturulan farelerde enzim aktivite ölçümleri (ALT ve AST) ile histopatolojik incelemeler yapılmış ve Brezilya propolisinin CCl₄'ün neden olduğu karaciğer hasarını önlediğini belirtilmiştir. Sharma vd., (1997) propolisin karaciğeri alkol ve CCl₄'ün hepatoksik etkisinden koruduğunu belirtmiştir.

Cemek vd., (2010) çalışmasında CCl₄'ün neden olduğu karaciğer hasarına karşı arı sütünün koruyucu etkisini araştırmıştır. Bu amaçla oksidatif stres parameterlerini (MDA, GSH, ALT, AST) incelemiş ve arı sütünün koruyucu etkisi olduğunu rapor etmiştir. Aynı yazarın farklı bir çalışmasında CCl₄'ün neden olduğu karaciğer hasarında arı sütünün antioksidan enzimlerin aktivitelerini artırdığı belirtilmiştir (Cemek vd., 2012). Karadeniz vd., (2011) yaptıkları çalışmada Sisplatin (CDDP) ile oluşturulan karaciğer hasarında arı sütünün oksidatif stresi azalttığını ve lipit peroksidasyonunu engellediğini ortaya koymuştur.

Eminedeki vd., (2010) parasetamolün hepatoksik etkisine karşı balın koruyucu olduğunu bildirmiştir. Balın CCl₄'ün neden olduğu karaciğer hasarına karşı koruyuculuğunun incelendiği bir çalışmada MDA, NO, MMP-2, AST ve ALT parametrelerine bakılmış ve balın oksidatif stresi önlediği tespit edilmiştir (Khadr vd., 2007). Mahesh vd., (2009) asetaminofen ile karaciğer hasarı oluşturulmuş sıçanlarda yaptıkları çalışmada balın oksidatif stresi azaltarak karaciğeri koruduğunu bildirmiştir. Aynı zamanda Resende vd., (2003) ve Noori vd., (2006) balın CCl₄ baskılanmış karaciğer hasarını önlediğini belirtmişlerdir. Farklı bir çalışmada okratoksinin sıçanlarda oluşturduğu toksisiteye karşı bal ve propolisin lipit peroksidasyonunu düşürdüğü ve hepatit ile mücadele ettiği gözlemlenmiştir (El-Khayat vd., 2009).

Yıldız, (2011) kestane polenin CCl₄'ün neden olduğu karaciğer hasarında koruyucu etkiye sahip olduğunu bildirmiştir. Eraslan vd.,(2009)'de propoksürün sıçanlardaki oksidatif etkisinin polenle besleme sonrasında azaltıldığı bildirilmiştir. Aynı yazarın polenin karaciğer hasarını önlemedeki rolünün araştırıldığı farklı çalışmalarında oksidatif stres parametrelerini incelemiş (SOD, MDA, CAT, GSH) ve polen ekstraktları ile beslemenin tedavi edici etkisini ortaya koymuştur (Eraslan vd., 2008; Eraslan vd., 2010).

Bu çalışmada CCl₄'ün toksik etkilerine bağlı olarak oksidatif stresi artırdığı, bal, propolis, polen ve arı sütünün meydana gelen bu strese karşı lipit peroksidasyonunu önlediği, antioksidan enzimlerin miktarını arttırarak oksidatif stresi ve karaciğer hasarını önleyici olduğu kanaatine varıldı.

Sonuç olarak, CCl₄'e maruz kalmış deney hayvanlarında karaciğer hasarı meydana gelmektedir. Bu hasar daha çok oksidatif kaynaklı bir stresten ileri gelmektedir ve karaciğer hücrelerinde deformasyona ve sentez yeteneğinde azalmaya neden olmaktadır. Yapılan bu çalışmada CCl₄ ile birlikte bal, polen, propolis ve arı sütünün gıda takviyesi olarak gavaj (oral) yoluyla deney hayvanlarına verildiği takdirde CCl₄ kaynaklı toksik etkiyi azalttığı ve karaciğer hasarını engellediği görülmektedir. Ayrıca apiterapik arı ürünlerinin antioksidan yönden etkinliklerinin içerdikleri fenolik madde miktarları ile doğru orantılı olarak değişim gösterdiği pek çok bilimsel araştırmada bildirilmektedir (Basnet vd., 1997; Molan, 2001; Bonvehi vd., 2001). Ancak bu ürünlerin oksidatif kaynaklı karaciğer hasarını önlemedeki rollerinin kullanılan ürünlerin fenolik madde miktarına birebir bağlı olmadığı çalışılan ALT ve AST değerlerinden anlaşılmaktadır. Propolis ve polenin arı sütü ve bala göre çok yüksek fenolik madde miktarına sahip olduğu halde neden hepsi CCl₄ tarafından oluşturulan oksidatif kaynaklı karaciğer hasarını önlemede benzer etkiye sahiptirler? Propolis ve polenin karaciğer

hasarını önlemede bal ve arı sütünden neden daha yüksek etki göstermemiştir? Bunun bir kaç cevabı olabilir. Bir tanesini arı ürünlerinin biyo-yararlılıkları ile izah etmek mümkündür. Yani bal ve arı sütünün propolis ve polene göre mide ve barsak sistemindeki emilimleri ile kana geçme zamanları arasında farklılıklar olabilir. Nitekim arı ürünlerinin biyo-yararlılıkları ile ilgili literatüre baktığımızda arı sütünün yaklaşık olarak %29, balın %60 emilim gösterdiği, polen ve propolisin ise çok daha düşük seviyede yani %2 oranında emilim gösterdiği bildirilmektedir (Boyacıoğlu, 2012). Bu çalışma bizim bulgularımızla da uyum göstermektedir. Bal, propolis, polen ve arı sütünün antioksidan özellikleri birbirinden farklı olsa da biyo-yararlılıkları ile sindirim sisteminde erişilebilirlikleri dengelenmektedir. Yapılan çalışmada bu ürünlerin sadece antioksidan aktiviteleri ele alındı. Ancak bu ürünlerin anti-inflamatuar etkinlikleri ele alınmadı. Nitekim yapılan bir çalışmada kestane balının anti-inflamatuar role sahip olduğu ve bu etkisinden dolayı yüksek gastroprotektif role sahip olduğu bulundu (Nasuti vd. 2006). Literatürde arı ürünlerinin yara iyileşmesinde aktif rol oynadığına dair farklı çalışmalar bulunmaktadır (Fujii vd., 1990; Park vd., 1996; Kohno vd., 2004; Tanno vd., 2006; Kassim vd., 2010; Maruyama vd., 2010; Küpeli Akkol vd., 2010). Dolayısıyla çalışmada kullanılan dört farklı antioksidan aktiviteye sahip arı ürünlerinin karaciğer hasarını önlemedeki etkinlikleri benzer olmasında anti-inflamatuar aktivitelerinin etkili olduğu söylenebilir.

Bu sonuçlardan yola çıkarak çeşitli sebeplerle oluşan karaciğer hasarlarının önlenmesinde ve tedavi edilmelerinde bal, polen, propolis ve arı sütü gibi doğal arı ürünlerinin yüksek potansiyele sahip olduklarını söylemek mümkündür. Özellikle de kimyasal kirliliğe maruz kalmış yerlerde çalışan kimselerin düzenli olarak arı ürünlerini kullanmaları durumunda başta karaciğer hasarları olmak üzere oksidatif strese korunacağını göstermektedir. Ayrıca çeşitli nedenlerle hepatite yakalanmış kimselerin arı ürünleri ile beslenmesinin tedavide etkili olacağı görülmektedir. Ancak viral hepatit oluşturulmuş deney hayvanlarındaki denemeler ve hepatitli kimseler üzerinde yapılacak olan çalışmalar arı ürünlerinin gerçek etkiliklerini ortaya çıkartabilecektir. Ayrıca bu ürünlerin doğal ürün olmaları nedeniyle hepatite maruz kalmış kimselerin bu ürünleri bol miktarda tüketmelerinde bir sakınca bulunmadığından, insan organizmasında denemeleri de kolay olacaktır.

5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Bu çalışmada Karadeniz Bölgesi'nin baskın florasından olan kestanenin balı, poleni ve propolisi ile arı sütünün biyoaktif özellikleri ortaya çıkarıldı ve bu arı ürünlerinin CCl₄ ile sıçanlarda oluşturulan karaciğer hasarını önlemedeki rolü araştırıldı.

Antioksidan aktivite ölçümlerinde; toplam fenolik madde miktarı, toplam flavonoid miktarı, toplam antosiyanin miktarı, demir (III) indirgeme kapasitesi testi (FRAP), bakır (II) indirgeme kapasitesi testi (CUPRAC) ve DPPH radikali temizleme testleri tercih edildi.

Çalışmada kullanılan propolis örneğinin bal, polen ve arı sütünden yüksek polifenol, flavonoid ve antosiyanin içeriğine sahip olduğu bulundu. CUPRAC, FRAP ve DPPH analizlerinde de propolisin diğer arı ürünlerinden daha yüksek aktiviteye sahip olduğu tespit edildi. *In vitro* olarak yapılan çalışmalarda bulunan sonuçların *in vivo* hayvan çalışmalarında ki etkisinin araştırılması için deney hayvanları ile bir çalışma kurgulandı.

Karaciğer için toksik olduğu bilinen ve karaciğerde ileri seviyede harabiyete neden olan CCl₄ tarafından sıçanlarda oluşturulan karaciğer hasarını önlemede arı ürünlerinin etkinlikleri incelendi. Bu kapsamda çalışma süresince sıçanlar bu gıdalarla beslendi. Karaciğerde oluşan hasarı ve arı ürünlerinin bu hasarı önleyip önlemediği plazma ALT ve AST enzimlerinin seviyeleri ile karaciğer dokusu, plazma ve eritrosit paketlerinde SOD, MDA ve CAT parametrelerin seviyeleri incelenerek belirlendi. Ayrıca sıçanların kilo değişimleri de takip edilerek birer gıda maddesi olan apiterapik arı ürünlerinin hayvanların vücut kitlelerine etkisi de takip edildi.

Plazma ALT ve AST aktivitelerinde CCl₄ grubunda SF kontrol grubuna göre anlamlı bir artış gözlemlendi. Bu artış karaciğer harabiyetinin oluştuğunu gösterdi. Polen, propolis, bal ve arı sütünün uygulandığı gruplarda CCl₄ grubuna göre anlamlı bir düşüş gözlemlendi. CCl₄ ile beslenme sonrasında analiz yapılan karaciğer dokusu ve eritrosit paketlerinde oksidasyonun bir göstergesi olarak MDA seviyesinin arttığı gözlemlendi. Plazma MDA seviyesi tayin sınırlarının altında olduğu için belirlenemedi. Karaciğer dokusunda yapılan analizlerde kontrol gruplarına ait MDA seviyeleri düşük bulunurken, CCl₄'e maruz kalmış sıçanlarda MDA değerleri anlamlı olarak artış gösterdi. Bu artış arı sütü, bal, polen ve propolis ile beslenen sıçanlarda ise anlamlı olarak azalma gösterdi. Eritrosit paketlerinde ise CCl₄'e maruz kalmış grupların MDA seviyesinin yükseldiği, ancak arı ürünleri ile beslenen gruplarda ise MDA seviyesinin anlamlı derecede azaldığı gözlemlendi. CCl₄'e maruz kalmış sıçanların eritrosit

paketlerindeki SOD seviyesinin düştüğü, ancak karaciğer dokusundaki SOD seviyesinin ise arttığı görüldü. CAT aktivitesinin kontrol gruplarına göre CCl₄ grubunda daha düşük olduğu gözlemlendi. Arı ürünleri ile beslenen gruplarda ise CCl₄'e maruz bırakılan gruba göre CAT aktivitesinin arttığı görüldü. Bütün bu bulguları histopatolojik sonuçlar desteklemektedir.

Sıçanlarda deney sonrası ağırlık değişimleri incelendiğinde serum fizyolojik kontrol grubunda kilo artışı gözlemlenirken, alkol kontrol grubunda, CCl₄ grubunda, polen ve propolis grubunda azalma görüldü. En yüksek kilo kaybı CCl₄ grubunda gözlemlendi. Bal ve arı sütü gruplarında ise değişim gözlenmedi.

Sonuç olarak, CCl₄'e maruz kalmış deney hayvanlarında karaciğer hasarı meydana gelmektedir. Bal, polen, propolis ve arı sütünün CCl₄ kaynaklı toksik etkiyi azalttığı ve karaciğer hasarını engellemede benzer etkiye sahip olduğu görülmektedir.

Bu sonuç bize çeşitli nedenlerle hepatite yakalanmış kimselerin arı ürünleri ile beslenmesinin tedavide etkili olabileceğini göstermektedir. Bu amaçla klinik çalışmalar yapılabilir.

Yapılan bu çalışmada kg canlı deney hayvanı başına verilen 400 mg balın CCl₄ hasarına karşı karaciğeri koruduğu bulundu. Bunu insan organizması için düşünecek olursak, ortalama 70 kg'lık bir insanın günde 28 gr (2 tatlı kaşığı) bal tüketmesi tavsiye edilebilir.

Sonuçlarımızın gerek bölge gerekse ülke kapsamında arı ve arıcılık ürünlerinin ülke ekonomisindeki üretimine pozitif yönde katkı sağlaması çalışmamız adına önem arz etmektedir. Bu çalışmada apiterapik arı ürünlerinin sadece karaciğer hasarıyla olan ilişkisi incelenmiştir. Çalışmadan elde edilen sonuçların farklı açıdan değerlendirilip biyosistem üzerindeki başka etkileri de araştırılabilir.

İlerleyen çalışmalarda bu çalışmada yapılamayan diğer antioksidan enzimlerinin aktivitelerine bakılabilir.

Farklı floraya ait bal, polen ve propolis örneklerinin karaciğer hasarı üzerine etkileri incelenebilir.

7. KAYNAKLAR

- Abd El Hady, F.K. ve Hegazi, A.G., 2002. Egyptian Propolis: 2. Chemical Composition, Antiviral and Antimicrobial Activities of East Nile Delta propolis, Z Naturforsch, 57, 386-394.
- Aebi H. 1984. Catalase in vitro, Enzymol,105, 121-6.
- Ahn, M.R., Kumazawa, S., Usui, Y., Nakamura, J., Matsuka, M., Zhu, F. ve Nakayama, T., 2007. Antioxidant Activity and Constituents of Propolis Collected in Various Areas of China, Food Chem. 101,4, 1383-1392.
- Aliyazıcioglu, R., Sahin, H., Erturk, O., Ulusoy, E. ve Kolayli, S. 2013. Properties of Phenolic Composition and Biological Activity of Propolis from Turkey, International Journal of Food Properties, 16, 277-287.
- Akkuş, İ., 1995. Serbest Radikaller ve Fizyopatolojik Etkileri, Mimoza Yay., Konya.
- Akşit, D., Yıldız, Z., Çelik, H. ve Sargon, M., 1998. Karın II: Karın Boşluğu, Klinik Anatomi, Ed., M.Yıldırım, 5. Baskı, Yüce Yay., İstanbul, 216-219.
- Akyüz, E., 2007. *Polygonum bistorta* ssp. *carneum* Bitki Ekstraktlarının Kromatografik Yöntemlerle Kimyasal Bileşiminin Belirlenmesi ve Antioksidan ve Antimikrobiyal Aktiviteleri, Yüksek Lisans Tezi, Karadeniz Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Trabzon.
- Aljadi, A.M., ve Kamaruddin, M.Y., 2004. Evaluation of The Phenolic Contents and Antioxidant Capacities of Two Malaysian floral Honeys, Food Chemistry, 85, 513-518.
- Al-Mamary, M.A., Al-Meerı A. ve Al-Haborı, M., 2002. Antioxidant Activities and Total Phenolics of Different Types of Honey, Nutrition Res., 22, 1041-1047.
- Almaraz, N., Campos, M.G., Avila, J.A., Naranjo, N., Herrera, J. ve Gonzalez, L.S., 2007. Antioxidant Activity of Polyphenolic Extract of Monofloral Honeybee Collected Pollen From Mesquite (*Prosopıs juliflora*, Leguminosae), J Food Compos Anal., 20, 2, 119-124.
- Al-Qarawi, A.A., Mousa, H.M., Ali, B.H., Abedl-Rahman, H. ve El-Mougy, S.A. 2004. Protective Effect of Extracts from Dates (*Phoenix dactylifera* L.) on Carbon Tetrachloride-Induced Hepatotoxicity in Rats, Int. J. Rev. Vet. Med., 2, 176-179.
- Al-Waili, N.S., Saloom, K.Y., Al-Waili, T.N., Al-Waili, A.N., Akmal, M., Al-Waili, F.S. ve Al-Waili, H.N. 2006. Influence of Various Diet Regimens on Deterioration of Hepatic Function and Hematological Parameters Following Carbon Tetrachloride: A Potential Protective Role of Natural Honey, Nat Prod Res., 20, 13, 1258-64.

- Amoros, M., Lurton, E., Boustie, J., Girre, L., Sauvager, F. ve Cormier, M., 1994. Comparison of The Anti-Herpes Simplex Virus Activities of Propolis and 3-methyl-but-2-enyl caffeate, Journal of Natural Products, 64, 235–240.
- Andrade, P., Ferreres, F., Gil, M.I. ve Tomas-Barberan, F.A., 1997. Determination of Phenolic Compounds in Honeys With Different Floral Origin by Capillary Zone Electrophoresis, Food Chemistry, 60, 1, 79-84.
- Andrada, C.A. ve Telleria, M.C. 2005. Pollen collected by honey bees (*Apis mellifera* L.) from south of Caldén district(Argentina): botanical origin and protein content, Grana, 44, 115–122.
- Anonim, 1989. Arı Zehiri Tasarısı, Türk Standartları Enstitüsü, Ankara.
- AOAC, 2000. Official Methods of Analyses, Official Methods of Analysis of AOAC International, CD-ROM. 17th edition, Arlington, VA: AOAC International.
- Apak, R., Güçlü, K., Özyürek, M. ve Karademir, S.E., 2004. Novel Total Antioxidant Capacity Index for Dietary Polyphenols and Vitamins C and E, Using Their Cupric Ion Reducing Capability in the Presence of Neocuproine: CUPRAC Method, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 52,7970–7981.
- Araujo, C.E.P., Sawaya, A.C.H.F., Cunha, I.B.S., Andreussi, V., Marcucci, M.C. ve Shimizu, M.T., 2003. Analysis of the Hepatoprotective Activity and the Toxicological, Chemical and Physical-Chemical Composition of A Sample Brazilian Propolis, Lecta, 21, 37-45.
- Armbrust, T., Batusic D., Ringe, B. ve Ramadari, G., 1997. Mast Cells Distribution in Human Liver Disease and Experimental Rat Liver Fibrosis. Indications for Mast Cell Participation in Development of Liver Fibrosis, J Hepatol., 26, 1042-1054.
- Ask-Upmark, E. 1967. Prostatitis and Its Treatment, Acta Med. Scand., 181, 355-357.
- ATSDR, (Agency for Toxic Substances and Disease Registry), 2005.Toxicological Profile for Carbon Tetrachloride, Atlanta: U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service.
- Azza, M.M., 2010. Prophylactic Role of L-Carnitine and Ubiquinone in Combating The Cardio-Toxicity Induced by Carbon Tetrachloride in Rat, International Journal of Academic Research, 2, 2, 52-59 .
- Balachandran, P. ve Govindarajan, R., 2005. Cancer: An Ayurvedic Perspective, Pharmacol. Res., 51,1, 19-30.
- Bankova, V., Popova, M., Bodganov, S. ve Sabatini, A.G., 2002. Chemical Composition of European Propolis: Expected and Unexpected Results, Verlag der Zeitschrift für Naturforschung, 57, 530–533.

- Banskota, A.H., Nagaoka, T., Sumioka, L.Y., Tezuka, Y., Awale, S., Midorikawa, K., Matsushige, K. ve Kadota, S. 2002. Antiproliferative Activity of the Netherlands Propolis and Its Active Principles in Cancer Cell Lines, Journal of Ethnopharmacology, 80, 67-73.
- Basnet, P., Matsuno, T. ve Neidlein, R., 1997. Potent Free Radical Scavenging Activity of Propol Isolated from Brazilian Propolis, Z Naturforsch. 52, 828.
- Bast A. ve Guido R. 1991. Oxidant and Antioxidants, Am. J. Med. 91,3, 2-13.
- Bast, A., Haenen, G.R.M.M. ve Doelman C.J.A., 1991. Oxidants and Antioxidants: State of the Art, The American Journal of The Medical Sciences, 91, 3625-3635.
- Basu S., 2003. Carbon Tetrachloride-Induced Lipid Peroxidation: Eicosanoid Formation and Their Regulation by Antioxidant Nutrients, Toxicology, 189, 113-27.
- Battistoni, A., Folcarelli, S., Cervoni, L., Polizio, F., Desideri, A., Guartosio, A. ve Rotilio, G., 1998. Role of The Dimeric Structure in Cu, Zn Superoxide Dismutase, J Biol Chem., 273, 10, 5655-5661.
- Becker, B.F., Reinholz, N., Leipert, B., Raschke, P., Permanetter, B. ve Gerlach, E., 1991. Role of Uric Acid As An Endogenous Radical Scavenger and Antioxidant, Chest., 100, 176-181.
- Benzie, J.,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, Meth. Enzymology, 299, 15-27.
- Beratta, G., Granata, P., Ferrero, M., Orioli, M. ve Facino, R.M., 2005. Standardization of Antioxidant Properties of Honey by A Combination of Spectrophotometric/Fluorimetric Assays and Chemometrics, Anal. Chim. Acta, 533, 185-191.
- Bertoncelj, J., Dobersek, U., Jamnik, M. ve Golob, T., 2007. Evaluation of The Phenolic Content, Antioxidant Activity and Colour of Slovenian Honey, Food Chemistry, 105, 2, 822–828.
- Bhadauria, M., Nirala, S.K. ve Shukla, S., 2008. Multiple Treatment of Propolis Extract Ameliorates Carbon Tetrachloride Induced Liver Injury in Rats, Food and Chemical Toxicology, 46, 2703–2712.
- Bhadauria, M., 2012. Propolis Prevents Hepatorenal Injury Induced by Chronic Exposure to Carbon Tetrachloride, Evid Based Complement Alternat Med., doi:10.1155/2012/235358.
- Bilaloğlu, G.V. ve Harmandar, M., 1999. Flavonoidler, Aktif Yayınevi, İstanbul, 334-354.
- Billingham, M.E., Morley, J., Hanson, J.M., Shipolini, R.A. ve Vernon, C.A., 1973. An Anti-inflammatory Peptide from Bee Venom, Nature, 245, 163–164.

- Blasa, M., Candiracci, M., Accorsi, A., Piacentini, M. P., Albertini, M. C. ve Piatti, E., 2006. Raw Millefiori Honey is Packed Full of Antioxidants, Food Chemistry, 97, 217–222.
- Blasa, M. Candiracci, M. Accorsi, A. Piacentini, M. P. ve Piatti, E., 2007. Honey Flavonoids As Protection Agents Against Oxidative Damage To Human Red Blood Cells, Food Chemistry, 104, 1635–1640
- Blum, M.S., Novak, A.F. ve Taber, S., 1959. 10-Hydroxy-decenoic Acid, An Antibiotic Found in Royal Jelly, Science, 130, 452–453.
- Bogdanov, S., Ruoff, K. ve Persano Oddo, L. 2004. Physico-chemical Methods for the Characterisation of Unifloral Honeys: A Review, Apidologie, 35, 4–17.
- Bonvehi, S.J., Torrento, S.M. ve Lorente, C.E., 2001. Evaluation of Polyphenolic And Flavonoid Compounds in Honeybee-Collected Pollen Produced in Spain, J Agric Food Chem, 49, 1848-1853.
- Bonvehi, S.J. ve Gutierrez, A.L., 2011. Antioxidant Activity and Total Phenolics of Propolis from the Basque Country (Northeastern Spain), Journal of the American Oil Chemists' Society, 88, 9, 1387-1395.
- Bors, W., Heler, W., Michel, C. ve Saran, M. 1990. Flavonoid as Antioxidants: Determination of Radical-Scavenging Efficiencies, Methods in Enzimology, 186, 343-355.
- Botsoglou, N.A., Taitzoglou, I.A., Botsoglou, E., Zervos I., Kokoli, A., Christaki E. ve Nikolaidis, E., 2009. Effect of Long-Term Dietary Administration of Oregano and Rosemary on The Antioxidant Status of Rat Serum, Liver, Kidney and Heart After Carbon Tetrachloride-Induced Oxidative Stres, J. Sci. Food Agric., 89, 1397–1406.
- Boyacıoğlu, D., 2012. Arı Ürünlerinin Antioksidan Özellikleri ve Biyoyararlılığı, Arı Platformu, Sözlü Bildiri, İstanbul.
- Bray, T. M., 2000. Dietary Antioksidants and Assessment of Oxidative Stres, Nutr; 16, 7, 8, 872-879.
- Bravo, L., 1998. Polyphenol Chemistry, Dietary Sources, Metabolism and Nutritional Significance, Nutr. Rev., 56, 317-333.
- 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, 1387–1392
- Burdock, G. A., 1998. Review of the Biological Properties And Toxicity Of Bee Propolis (Propolis), Food Chemistry and Toxicology, 36 , 347–363.

- Campos, M.G., Cunha, A., ve Markham, K.R. 1997. Bee-products Properties, Applications And Apitherapy. In Bee-pollen Composition, Properties And Applications, Ed. Mizrahi, A. ve Lensky, Y., London, UK, Plenum Publishers, 93-100.
- Campos, M.G., Webby, R.F., Markham, K.R., Mitchell, K.A. ve Da Cunha, A.P., 2003. Age-induced Diminution of Free Radical Scavenging Capacity in Bee Pollens and The Contribution of Constituent Flavonoids, J. Agric. Food. Chem., 51, 742–745.
- Cao, G. ve Prior, R.L., 1998. Comparison of Different Analytical Methods For Assessing Total Antioxidant Capacity of Human Serum, Clinical Chemistry, 44, 6, 1309–1315.
- Castro, G.D., Diaz Gomez, M.I. ve Castro, J.A., 1997. DNA Bases Attack by Reactive Metabolites Produced During Carbon Tetrachloride Biotransformation and Promotion of Liver Microsomal Lipid Peroxidation, Res Comm Mol Pathol and Pharmacol., 95, 253-8.
- Carpes, S.T., Bengini, R., Alencar, S.M. ve Masson, M.L., 2007. Study of Preparations of Bee Pollen Extracts, Antioxidant and Antibacterial Activity, Ciênc. agrotec., 31, 6, 1818-1825.
- Carpes, S.T., Mourao, G.B., Alencar, S.M. ve Masson, M. L., 2009. Chemical Composition and Free Radical Scavenging Activity of Apis Mellifera Bee Pollen From Southern Brazil, Brazilian Journal of Food Technology, 12, 1, 4, 220-229.
- Cemek, M., Aymelek, F., Büyükokuroğlu, M.E., Karaca, T., Büyükben, A. ve Yılmaz, F., 2010. Protective Potential of Royal Jelly Against Carbon Tetrachloride Induced-Toxicity and Changes in The Serum Sialic Acid Levels, Food and Chemical Toxicology, 48, 2827–2832.
- Cemek, M., Yılmaz, F., Büyükokuroğlu, M.E., Büyükben, A., Aymelek, F. ve Ayaz. A., 2012. Serum and Liver Tissue Bio-Element Levels, and Antioxidant Enzyme Activities in Carbon Tetrachloride-Induced Hepatotoxicity: Protective Effects of Royal Jelly, Journal of Medicinal Food, 15, 8, 747-752.
- Cemeroğlu, B., 2004. Meyve ve Sebze İşleme Teknolojisi 1. Cilt. Gıda Teknolojisi Derneği Yayınları, No: 35, Ankara, 77-88.
- Chang, C.C., Yang, M.H., Wen, H.M. ve Chern, J.C., 2002. Estimation of Total Flavonoid Content In Propolis by Two Complementary Colorimetric Methods, Journal of Food and Drug Analysis, 10, 178–182.
- Chavan, S., Sava, L., Saxena, V., Pillai, S., Sontakke, A. ve Ingole D., 2005. Reduced Glutathione: Importance of Specimen Collection, Indian Journal of Clinical Biochemistry, 20, 1, 150-152.
- Cheeseman, K.H. ve Slater, T.F., 1993. An Introduction to Free Radical Biochemistry, British Medical Bulletin, 49, 3, 479-480.

- Chemid, 1996. A Chemical Database Sponsored by The National Library of Medicine, Bethesda, ND.
- Christopher, M.H. ve Kim, M.D., 1997. Potentiating Health and the Crisis of the Immune System. Plenum Press, New York, Chapter 24, 243-270.
- Choi, Y.M., Noh, D.O., Cho, S.Y., Suh, H.J., Kim, K.M. ve Kim, J.M., 2006. Antioxidant and Antimicrobial Activities of Propolis from Several Regions of Korea, Food Sci. Technol., 39, 756–761.
- Crane, E., 1983. The Archaeology of Beekeeping, Gerald Duckworth & Co, London.
- Crawford, J.M., 2002. The Liver and the Biliary Tract, In “Robbins Basic Pathology, Ed. Kumar, V., Cotran, R.S. ve Robbins, S.L. 7th Ed., 592-611, Elsevier Saunders, Philadelphia.
- Cushnie, T.P.T. ve Lamb, A.J., 2005. Detection of Galangin-Induced Cytoplasmic Membrane Damage in *Staphylococcus Aureus* by Measuring Potassium Loss, J Ethnopharmacol., 101, 243–8.
- D’Andrea, V., Perez, L.M., ve Sanchez Pozzi, E.J. 2005. Inhibition of Rat Liver UDP Glucuronosyltransferase by Silymarin and The Metabolite Silibinin-Glucuronide, Life Sciences, 77, 683–692.
- Dıĝrak, M., Alma, M.H., İçlim, A. ve Şen, S., 1998. Antibacterial and Antifungal Effects of Various Commercial Plant Extracts, Pharmaceutical Biology, 36, 5, 1-5.
- Diler, A. ve Tietz. 2005. Klinik Kimyada Temel İlkeler, Beşinci Baskıdan Çeviri, Palme Yayıncılık, 748-760.
- Doĝaroĝlu, M., 2008. Modern Arıcılık Teknikleri, Doĝa Arıcılık Tic. Ltd. Şti., Tekirdaĝ.
- El-Khayat, Z., Ezzat, A.R., Arbid, M.S., Rasheed, W.I. ve Elias, T.R. 2009. Potential Effects of Bee Honey and Propolis Against the Toxicity of Ochratoxin A in Rats, Macedonian Journal of Medical Sciences, 2, 4, 311-318.
- Eminedoki, D.G., Uwakwe, A.A. ve Ibe, G.O., 2010. Protective Effect of *Garcinia kola* Seed and Honey Mixture Against Paracetamol-induced Hepatotoxicity in Rats, Nigerian Journal of Biochemistry and Molecular Biology, 25, 2, 86 – 90.
- Eraslan, G., Kanbur, M. ve Silici, S., 2008. Effect of Carbaryl on Some Biochemical Changes In Rats: The Ameliorative Effect of Bee Polen, Food Chem Toxicol., 47, 86-91.
- Eraslan, G., Kanbur, M., Silici, S., Liman, B.C., Altınordulu, S. ve Sarıca, Z.S., 2009. Evaluation of Protective Effect of Bee Pollen Against Propoxur Toxicity in Rat, Ecotoxicology and Environmental Safety, 72, 931–937

- Eraslan, G., Kanbur, M., Silici, S. ve Karabacak, M., 2010. Beneficial Effect of in Honey on Trichlorfon Induced Some Biochemical Alterations in Mice, Ecotoxicolo Environ Safety, 73, 1084–1091.
- Evers, D.L., Chao, C.F., Wang, X., Zhang, Z.G., Huong, S.M. ve Huang, E.S., 2005. Human Cytomegalovirus-Inhibitory Flavonoids: Studies on Antiviral Activity and Mechanism of Action, Antiviral Res., 68, 3, 124–34.
- Fang, Y., Yang, S. ve Wu, G., 2002. Free Radicals, Antioxidants and Nutrition, Nutrition, 18, 10, 872.
- Farrell, G.C., 1998. Liver Disease Caused by Drugs, Anesthetics and Toxins, Sleisenger & Fordtran's Gastrointestinal and Liver Disease, 2.cilt, Ed., Feldman, M., Sleisenger, M. H., W.B. Saunders Company, Pennsylvania, Philadelphia.
- Fernandez-Checa, J.C. ve Kaplowitz, N., 2005. Hepatic Mitochondrial Glutathione:Transport and Role in Disease and Toxicity, Toxicol. Applied Pharm., 204, 263 – 273.
- Fiorani, M., Accorsi, A., Blasa, M., Diamantini, G. ve Piatti, E. 2006. Flavonoids from Italian Multifloral Honeys Reduce The Extracellular Ferricyanide in Human Red Blood Cells, J Agric Food Chem., 54, 8328–34.
- Foulis, P.R., Sandford, B.H. ve Gottfried, M., 1988. Drug Induced Morphologic Changes in the Liver, Ann. Clin. Lab. Sci., 18, 215-228.
- Francis, F.J, 1985. Pigments and Other Colorants, Ed., Fennema, O.R., Food Chemistry (2nd ed.), New York: Marcel Dekker, 545–584.
- Frankel, S., Robinson, G.E. ve Berenbaum, M.R., 1998. Antioxidant Capacity and Correlated Characteristics of 14 Unifloral Honeys, Journal of Apicultural Research, 37, 27–31.
- Fujii, A., Kobayashi, S., Kuboyama, N., Furukawa, Y., Kaneko, Y., Ishihama, S., Yamamoto, H. ve Tamura, T., 1990. Augmentation of wound healing by royal jelly (RJ) in streptozotocin-diabetic rats, Japanese Journal of Pharmacology, 53, 3, 331-337.
- Fuleki, T. ve Francis, F.J., 1968. Quantitative Methods For Anthocyanins. 2. Determination Of Total Anthocyanin And Degradation Index For Cranberry Juice, J. Food Science, 3378-83.
- Garcia, M., Perez-arquillue, C., Juan, T., Juan, M.I. ve Herrera, A., 2001. Pollen Analysis and Antibacterial Activity of Spanish Honeys, Food Science and Technology International, 7, 155-158.
- Garcia-Amoedo, L.H. ve Almeida-Muradian, L.B. 2007. Physicochemical composition of pure and adulterated royal jelly, Química Nova, 30, 2, 257-259.
- Genç, F., 1993. Arıcılığın Temel Esasları ,Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Ofset Tesisi, Yayın No:149, Erzurum, 286 s.

- Gheldof, N., Wang, X.H. ve Engeseth, N.J., 2002. Identification and Quantification of Antioxidant Components of Honeys from Various Floral Sources, J. Agric. Food Chem., 50, 5870-5877.
- Ghisalberti, E. L., 1979. Propolis: a review, Bee World, 60, 59 – 84.
- Giese, J., 1994. Spices and Seasoning Blends: A Taste for All Seasons, Food Technol., 48, 4, 87-98.
- Giusti, M. M. ve Wrolstad, R. E., 2001. Unit F1.2.1-13. Anthocyanins, Characterization and measurement with Uvvisible spectroscopy, Ed., Wrolstad, R. E., Current Protocols in Food Analytical Chemistry, New York, USA.
- Griffith, O.W., 1999. Biological and Pharmacologic Regulation of Mammalian Glutathione Synthesis, Free Radic Biol Med., 27, 10, 916-935.
- Gomez-Caravaca, A.M., Gomez-Romero, M., Arraez-Roman, D., Segura-Carretero, A. ve Fernandez-Gutierrez, A., 2006. Advances in the Analysis of Phenolic Compounds in Products Derived From Bees, J Pharmac Bio Anal., 41, 1220–34.
- Gonzalez-Miret, M.L., Terrab, A., Hernanz, D., Fernandez-Recamales, M.A. ve Heredia, F.J. 2005. Multivariate Correlation Between Color and Mineral Composition of Honeys and by Their Botanical Origin, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 53, 7, 2574–2580.
- Grange, J.M., 1990. Reply: honey and propolis as possible promoters of the healing of ulcers in leprosy., Leprosy Review, 61, 2, 195.
- Gruszecki, W.I. ve Strzalka, K., 2005. Carotenoids as Modulators of Lipid Membrane Physical Properties, Biochim. Biophys. Acta., 30, 1740, 2, 108-115.
- Gülcin, İ., Bursal, E., Şehitoğlu, M.H., Bilsel, M. ve Gören, A.C., 2010. Polyphenol Contents and Antioxidant Activity of Lyophilized Aqueous Extract of Propolis from Erzurum, Turkey, Food and Chemical Toxicology, 48, 2227–2238.
- Güven, A., Erginsoy, S. ve Kaya, N., 2003. Kazlarda Karbontetraklorür Zehirlenmesinin Biyokimyasal ve Patolojik Parametrelere Etkisi, Kafkas Üniv. Vet. Fak. Dergisi, 9, 131-136.
- Güzel, C., 1996. Bir Organ Olarak Karaciğer, "Tıbbi Fizyoloji", (Guyton and Hall Textbook of medical Physiology), Çvr., ed., Çavuşoğlu, H., Nobel Tıp Kitabevi, İstanbul, 884 s.
- Habib, F.K., Ross, M., Lewenstein, A., Zhang, X. ve Jatou, J.C., 1995. Identification of Prostate Inhibitory Substance in A Pollen Extract, Prostate, 26, 3, 133-139.
- Halliwell, B. ve Gutteridge, J.M.C., 1989. Oxygen Radicals and Singlet Oxygen, Free Radicals in Biology and Medicine, Oxford, Clarendon. 93-109.

- Halliwell, B., 1990. How to Characterize A Biological Antioxidant, Free Radic. Res. Commun., 1, 1-32.
- Halliwell, B., Cross, C.E. ve Gutteridge, J.M.C., 1992. Free Radicals, Antioxidants, aAnd Human Disease. Where Are We Now?, J. Lab. Clin. Med., 119, 598–620.
- Halliwell, B., 1994. Free Radicals, Antioxidant And Human Disease: Curiosity, Cause or Consequence?, The Lancet, 344, 721-724.
- Halliwell B. ve Gutteridge J.M., 2000. Free Radical in Biology and Medicine, Third ed., Oxford University Press, Oxford, 160-165.
- Hamasaka, T., Kumazawa, S., Fujimoto, T. ve Nakayama T., 2004. Antioxidant Activity and Constituents of Propolis Collected in Various Areas of Japan, Food Sci. Technol. Res., 10, 1, 86–92.
- Haris, G.K., Qian, Y., Leonard, S.S., Sbarra, D.C. ve Shi XL. 2006. Luteolin and Chrysin Differentially Inhibit Cyclooxygenase-2 Expression and Scavenge Reactive Oxygen Species But Similarly Inhibit Prostaglandin-E2 Formation İn RAW 264.7 Cells, J Nutr., 136, 6, 1517– 1521.
- Hegazi, A.G., 1998. Propolis An Overview, J. Bee In-formed, 5, 22-23 ve 6, 23-28.
- Hegazi, A.G. 2012. Medical importance of Bee Products, Uludag Bee Journal, 12, 4, 136-146.
- Huang, W.Z., Dai, X.J., Liu, Y.Q., Zhang, C.F., Zhang, M. ve Wang, Z.T., 2006. Studies on Antibacterial Activity of Flavonoids And Diaryl Heptanoids From *Alpinia Katsumadai*, J Plant Resour Environ, 15, 1, 37–40.
- Ita, B.N. 2011. Antioxidant Activity of Honey Samples From The Southern Rainforest and Northern Savannah Ecosystems in Nigeria, IJPSR, 2, 8, 2115-2120.
- Itavo, C.C.B.F., Morais, M.G., Costa, C., Ítavo, L.C.V., Franco, G.L., Da Silva, J.A. ve Reis, F.A., 2011. Addition of Propolis or Monensin in the Diet: Behavior and Productivity of Lambs in Feedlot, Animal Feed Science and Technology, 165, 161–166.
- Ivanovska, N.D., Dimov, V.B., Bankova, V.S. ve Popov, S.S., 1995. Immunomodulatory Action of Propolis. VI. Influence of A Water Soluble Derivative on Complement Activity *in vivo*, J. Ethnopharmacol., 47,3, 145-147.
- Iwasaki, M., 1990. Propolis-Containing Antibiotic Ointments for Atopic Dermatitis Treatment, Japanese Patent No. JP 02 142 734 [90 142 734], 2 s.
- Jain, S., McVie, R., Duett, J. ve Herbst, J., 1989. Erythrocyte Membrane Lipid Peroxidation and Glycosylated Hemoglobine in Diabetes, Diabetes, 38, 1539–1543.
- Jerry, P., Liu, L., Zeng, M. ve Stamler, J.S., 2000. An Apoptotic Model for Nitrosative Stress, Biochem., 39, 1040-1047.

- Kadayıfçı, A., 1998. Karaciğer hastalıkları, İç hastalıkları El Kitabı, Ed., Kadayıfçı A., Karaaslan Y., Hekimler Yayın Birliği, Ankara.
- Kalogeropoulos, N. Konteles, S.J., Troullidou, E., Mourtzinou, I. ve Karathanos, V.T., 2009. Chemical Composition, Antioxidant Activity and Antimicrobial Properties of Propolis Extracts from Greece and Cyprus, Food Chemistry, 116, 452–461
- Kanbur, M., Eraslan, G., Beyaz, L., Silici, S., Liman, B.C., Altinordulu, S. ve Atasever, A., 2009. The Effects of Royal Jelly on Liver Damage Induced by Paracetamol in Mice, Exp. Toxicol. Pathol., 61, 123–132.
- Kanter, M., Meral, I., Dede, S., Gündüz, H., Cemek, M., Özbek, H. ve Uygan, I., 2003. Effects of *Nigella sativa L.* and *Urtica dioica L.* on Lipid Peroxidation, Antioxidant Enzyme Systems and Some Liver Enzymes in CCl₄-treated Rats, J. Vet. Med. A, 50, 264–268.
- Karadeniz, A., Simsek, N., Karakus, E., Yildirim, S., Kara, A., Can, I., Kisa F., Emre, H. ve Turkeli, M., 2011. Royal Jelly Modulates Oxidative Stress and Apoptosis in Liver and Kidneys of Rats Treated with Cisplatin, Oxidative Medicine and Cellular Longevity, doi:10.1155/2011/981793
- Karadeniz, F., Burdurlu, H.S., Koca, N. ve Soyer, Y. 2005. Antioxidant Activity of Selected Fruits And Vegetables Grown in Turkey, Turk J Agric For., 29, 297-303
- Kassim, M., Achoui, M., Mustafa, M.R., Mohd, M.A. ve Yusoff, K.M., 2010. Ellagic acid, phenolic acids, and flavonoids in Malaysian honey extracts demonstrate in vitro anti-inflammatory activity, Nutrition Research, 30, 650 – 659.
- Kawamura, J., 1961. Influence of Gelee Royale on Embryos, Journal of Show a Medical Association, 20, 1465–1471.
- Kelly, F.J., 1998. Use of Antioxidants in The Prevention and Teratment of Disease, J Int Fed Clin Chem., 10, 1, 21-23.
- Kerem, Z., Chetrit, D., Shoseyov, O. ve Regev-Shoshani, G., 2006. Protection of Lipids from Oxidation by Epicatechin, Trans-Resveratrol, and Gallic and Caffeic Acids in Intestinal Model Systems, J Agric Food Chem., 54, 26, 10288–10293.
- Kesic, A., Mazolovic, M., Crnkic, A., Catovic, B., Hadzidedic, S. ve Dragosevic, G., 2009. Influence of L- Ascorbic Acid Content on Total Antioxidant Activity of Bee Honey, Eur J Sci Res., 32, 1, 95 – 101.
- Khadr, M.E., Mahdy, K.A., El-Shamy, K.A., Morsy, F.A., El-Zayat, S.R. ve Abd-Allah, A.A., 2007. Antioxidant Activity and Hepatoprotective Potential of Black Seed, Honey and Silymarin on Experimental Liver Injuries Induced by CCl₄ in Rats, J. Appl. Sci., 7, 24, 3909 – 3917.

- Khan, R.A., Khan, M.R. ve Sahren, S. 2010. Evaluation of *Launaea procumbens* Use in Renal Disorders: A Rat Model, Journal of Ethnopharmacology, 128, 2, 452–461.
- Kırca, A., 2004. Siyah Havuç Antosiyaninlerinin Bazı Meyve Ürünlerinde Isıl Stabilitesi. Doktora Tezi, Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- Kimoto, T., Aga, M., Hino, K., Koya-Miyata, S., Yamamoto, Y., Micallef, M.J., Hanaya, T., Arai, S., Ikeda, M. ve Kurimoto, M., 2001. Apoptosis of Human Leukemia Cells Induced by Artepillin C, An Active Ingredient of Brazilian Propolis, Anticancer Research, 21, 221–228.
- Kohno, K., Okamoto, I., Sano, O., Arai, N., Iwaki, K., Ikeda, M. ve Kurimoto, M., 2004. Royal jelly Inhibits The Production of Proinflammatory Cytokines by Activated Macrophages, Biosci. Biotechnol. Biochem., 68, 138–145.
- Kogure, K., Ishizaki, M., Nemoto, M., Kuwano, H. and Makuuchi, M., 1999. A Comparative Study of The Anatomy of Rat and Human Livers, J Hepatobiliary Pancreat. Surg., 6, 171–175.
- Kohno, K., Okamoto, I., Sano, O., Arai, N., Iwaki, K., Ikeda, M. ve Kurimoto, M., 2004. Royal Jelly Inhibits the Production of Proinflammatory Cytokines by Activated Macrophages, Biosci. Biotechnol. Biochem., 68, 1, 138–145.
- Kolankaya, D., Selmanoğlu, G., Sorkun, K. ve Salih, B., 2002. Protective Effects of Turkish Propolis on Alcohol-Induced Serum Lipid Changes and Liver Injury in Male Rats, Food Chemistry, 78, 213–217
- Kolaylı, S. ve Keha, E., 1999. A Comparative Study of Antioxidant Enzyme Activities in Freshwater and Seawater Adapted Rainbow Trout, Journal of Biochemical and Molecular Toxicology, 13, 6, 334-337.
- Kolaylı, S., Aliyazıcıoğlu, R., Ulusoy, E. ve Karaoğlu, Ş., 2008. Antioxidant and Antimicrobial Activities of Selected Turkish Honeys, Hacettepe J.Biol.&Chem., 36, 2, 163-172
- Kopani, M., Celec, P., Danisovic, L., Michalka, P. ve Biro, C., 2006. Oxidative Stress and Electron Spin Resonance, Clin Chim Acta., 364, 61-66.
- Krell, R. 1996. Value-Added Products From Beekeeping. FAO Agricultural Services Bulletin No. 124. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome.
- Kroyer, G. ve Hegedus, N., 2001. Evaluation of Bioactive Properties of Pollen Extracts As Functional Dietary Food Supplement, Innovative Food Science & Emerging Technologies, 2, 171-174
- Kujumgiev, A., Tsvetkova, I., Serkedjieva, Y., Bankova, V., Christov, R. ve Popov, S., 1999. Antibacterial, Antifungal and Antiviral Activity of Propolis of Different Geographic Origin, Journal of Ethnopharmacology, 64, 235–240.

- Kumazawa, S., Hamasaka, T. ve Nakayama, T., 2004. Antioxidant Activity of Propolis of Various Geographic Origins, Food Chem., 84, 329–339.
- Kurilich, A.C., Clevidence, B.A., Britz, S.J., Simon, P.W. ve Novotny, J.A., 2005. Plasma and Urine Responses Are Lower for Acylated vs Nonacylated Anthocyanins from Raw and Cooked Purple, J. Agric. Food Chem., 53, 6537-6542.
- Kus, I., Ogeturk, M., Oner, H., Sahin, S., Yekeler, H. ve Sarsilmaz, M., 2005. Protective Effects of Melatonin Against Carbon Tetrachloride-Induced Hepatotoxicity in Rats: A Light Microscopic and Biochemical Study, Cell Biochem Funct., 23,3, 169-174.
- Kutluca, S., Genç, F. ve Korkmaz, A., 2008. Propolis, Samsun İl Tarım Müdürlüğü Çiftçi Eğitimi ve Yayım Şubesi Yayını, Samsun, 52.
- Küçük, M., Kolaylı, S., Karaoglu, Ş., Ulusoy, E., Baltacı, C. ve Candan, F., 2007. Biological Activities and Chemical Composition of Three Honeys of Different Types from Anatolia, Food Chem., 100, 526-534.
- Küpeli Akkol, E., Orhan, D.D., Gürbüz, I. Ve Yesilada, E., 2010. In vivo activity assessment of a "honey-bee pollen mix" formulation, Pharm Biol., 48, 3, 253-259.
- LeBlanc, B.W., Davis, O.K., Boue, S., DeLucca, A. ve Deeby, T., 2009. Antioxidant Activity of Sonoran Desert Bee Polen, Food Chemistry, 115, 1299–1305.
- Lee, J.D., Park, H.J., Chae, Y. ve Lim, S., 2005. An Overview of Bee Venom Acupuncture in the Treatment of Arthritis, Evid Based Complement Alternat Med, 2, 79–84.
- Leja, M., Mareczek, A., Wyzgolik, G., Klepacz-Baniak, J. ve Czekonska, K., 2007. Antioxidative Properties of Bee Pollen in Selected Plant Species, Food Chemistry, 100, 237–240.
- Lercker, G., Caboni, M.F., Vecchi, M.A., Sabatini, A.G. ve Nanetti, A., 1992. Caratterizzazione dei Principali costituenti della Gelatina Reale, Apicoltura, 8, 11-21.
- Lock, E.A. ve Reed, C.J. 1998. Xenobiotic Metabolizing Enzymes of The Kidney, Toxicol Pathol, 26, 1, 18-25.
- MacDougall, D.B., 2002. Colour in Food Improving Quality. Woodhead Publishing Limited. Cambridge, England, 179-221.
- Mahesh, A., Shaheetha, J., Thangadurai, D. ve Rao, D. M., 2009. Protective Effect of Indian Honey On Acetaminophen Induced Oxidative Stress and Liver Toxicity in Rat, Biologia, 64, 6, 1225-1231.
- Manibusan, M.K., Odin, M. ve Eastmond, D.A., 2007. Postulated Carbon Tetrachloride Mode of Action: A Review, J Environ Sci Health C Environ Carcinog Ecotoxicol Rev., 25, 185-209.

- Mantle, D. ve Preedy, V.R., 1999. Free Radicals As Mediators Of Alcoholtoxicity, Adverse Drug React Toxicol Rev., 18, 235–252
- Marcucci, M.C., Ferreres, F., Garcia-Viguera, C., Bankova, V.S., De Castro, S.L., Dantas, A.P., Valente, P.H.M. ve Paulino, N. 2001. Phenolic Compounds from Brazilian Propolis With Pharmacological Activities, J Ethnopharmacol, 74, 105–112.
- Marghitas, L.A., Dezmirean, D., Adela, M., Bobis, O., Laslo, L. ve Bogdanov, S., 2009a. Physico-chemical and Bioactive Properties of Different Floral Origin Honeys From Romania, Food Chemistry, 112, 863–867.
- Marghitas, L.A., Stanciu, O.G., Dezmirean, D.S., Bobis, O., Popescu, O., Bogdanov, S. ve Campos, M.G., 2009b. In vitro Antioxidant Capacity of Honeybee-Collected Pollen of Selected Floral Origin Harvested from Romania, Food Chemistry, 115, 878–883
- Maria, I., Moreno, N., Isla, M.I., Sampietro, A.R. ve Vattuone, M.A., 2000. Comparison of the Free Radical-Scavenging Activity of Propolis From Several Regions of Argentina, Journal of Ethnopharmacology, 71, 109–114.
- Maruyama, H., Sakamoto, T., Araki, Y. ve Hara, H., 2010. Anti-inflammatory effect of bee pollen ethanol extract from *Cistus* sp. of Spanish on carrageenan-induced rat hind paw edema, BMC Complementary and Alternative Medicine, 10, 30, 1-11.
- Matsuno, T., 1995. A New Clerodane Diterpenoid Isolated From Propolis, Zeitschrift für Naturforschung, 50, 93–97.
- Mccord, J.M. ve Day, E.D., 1978. Superoxide-Depent Production of Hydroxyl Radical Catalyzed by Iron EDTA complex, FEBS Letters, 86,1, 139-142.
- McKibben, J., ve Engeseth N.J, 2002. Honey As A Protective Agent Against Lipid Oxidation in Ground Turkey, J. Agric. Food Chem., 30, 50, 3, 592-595.
- McLellan, M.R., Kime R.W., Lee, C.Y. ve Long, T.M., 1995. Effect Of Honey As An Antibrowning Agent in Light Raisin Processing, Food Process. Preserv. 19, 1-8.
- Melliou, E., ve Chinou, I., 2005. Chemistry and Bioactivity of Royal Jelly from Greece, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 53, 8987–8992.
- Mendiratta, S., Zhi-chao, Q. ve James, M., 1998. Enzyme Dependent Ascorbate Recycling in Human Erythrocytes: Role of Thioredoxin Reductase, Free Radical Biology and Medicine, 25, 2, 221-228.
- Meydanoğlu, F., 1985. Arı Sütünün Bileşimi, Dietik, Terapatik Özellikleri, TÜBİTAK Marmara Araştırma Enstitüsü, Beslenme ve Gıda Teknolojisi Ünitesi, Gebze, Kocaeli.
- Middleton, J.E., 1998. Effect of Plant Flavonoids on Immune and Inflammatory Cell Function, Advances in Experimental Medicine and Biology, 439, 175–182.

- Mihara, M. ve Uchiyama, M., 1978. Determination of Malondialdehyde Precursor in Tissues by Thiobarbituric Acid Test, Ann Biochem., 86, 271- 278.
- Mizrahi, A. ve Lensky, Y. 1997. Bee products: Properties, Applications And Apitherapy, London, UK, Kluwer Academic Publishers, 269.
- Mohammed, A. ve Bash, M., 1997. International Symposium on Apitherapy, Cairo, Egypt, 8-9th March.
- Mohammadzadeh, S., Shariatpanahi, M., Hamed, M., Ahmadkhaniha, R., Samadi, N. ve Ostad, S.N., 2007. Chemical Composition, Oral Toxicity and Antimicrobial Activity of Iranian Propolis, Food Chemistry, 103, 1097–1103.
- Molan, P.C., 1992. The Antimicrobial Activity of Honey, 1. The Nature of Antibacterial Activity, Bee World, 73, 5–28.
- Molan, P.C., 1997. Honey As An Antimicrobial Agent. International Conference on Bee Product: Properties, Applications and Apitherapy, Israel, 27.
- Molan, P.C., 2001. Potential of Honey in the Treatment of Wounds And Burns, Am J Clin Dermatol., 2, 9–13.
- Molan, P.C. 2002. Re-introducing Honey in the Management of Wounds and Ulcers – Theory and Practice, Ostomy/Wound Management, 48, 11, 28-40.
- Molan, P.C., 2006. The Evidence Supporting The Use of Honey As A Wound Dressing, Int J Low Extrem Wounds, 5, 40–54.
- Moolenaar, M., Poorter, R.L., Van der Toorn, P.P., Lenderink, A.W., Poortmans, P. ve Egberts, A.C., 2006, The Effect of Honey Compared to Conventional Treatment on Healing of Radiotherapy-induced Skin Toxicity in Breast Cancer Patients, Acta Oncol., 45, 623–624.
- Morais, M., Moreira, L., Feas, X. ve Estevinho, L.M. 2011. Honeybee-collected Pollen From Five Portuguese Natural Parks: Palynological Origin, Phenolic Content, Antioxidant Properties and Antimicrobial Activity, Food and Chemical Toxicology, 49, 1096–1101.
- Moreira, L., Dias, L.G., Pereira, J.A. ve Estevinho, L., 2008. Antioxidant properties, total phenols and pollen analysis of propolis samples from Portugal, Food and Chemical Toxicology, 46, 3482–3485
- Morrow, J.D., Hill, K.E., Burk, R.F., Nammour, T.M., Badr, K.F. ve Roberts, L.J., 1991. 2nd. Formation of Unique Biologically Active Prostaglandins *in vivo* by A Non-Cyclooxygenase Free Radical and Catalyzed Mechanism, Adv Prostaglandin Thromboxane Leukot Res., 21, 125-128.
- Naczka, M. ve Shahidi, F. 2004. Extraction and Analysis of Phenolics in Food, Journal of Chromatography A, 1054, 95-111.

- Nagai, T., Sakai, M., Inoue, R. ve Suzuki, N., 2001. Antioxidative Activities of Some Commercially Honeys, Royal Jelly, and Propolis, Food Chemistry, 75 , 237–240.
- Nagai, T., Inoue, R., Inoue, H. ve Suzuki, N. 2003. Preparation and Antioxidant Properties of Water Extract of Propolis, Food Chemistry, 80, 29-33.
- Nagai, T. ve Inoue, R., 2004. Preparation and Functional Properties of Water Extract and Alkaline Extract of Royal Jelly, Food Chem., 84, 181–186.
- Nakajima, Y., Tsuruma, K., Shimazawa, M., Mishima, S. ve Hara, H., 2009. Comparison of Bee Products Based on Assay of Antioxidant Capacities, BMC Complementary and Alternative Medicine, 9, 4-13
- Nakajin, S., Okiyama, K., Yamashita, S., Akiyama, Y. ve Shinoda, M., 1982. Effect of Royal Jelly on Experimental Hyper Cholesterol Emia in Rabbits, Yakugaku Zasshi, 36, 65–69.
- Nakaya, M., Onda, H., Sasaki, K., Yukiyoishi, A., Toshibana, H. ve Yamada, K., 2007. Effect of Royal Jelly on Bisphenol A-Induced Proliferation of Human Breast Cancer Cells, Biosciences, Biotechnology and Biochemistry, 71, 253–255.
- Nasuti, C., Gabbianelli, R., Falcioni, G., ve Cantalamessa, F. 2006. Antioxidative and Gastroprotective Activities of Anti-Inflammatory Formulations Derived from Chestnut Honey İn Rats, Nutrition Research, 26, 130– 137.
- Naziroğlu, M., ay, M., Üstündağ, B., Aksakal, M. ve Yekeler, H., 1999. Protective Effects of Vitamin E on Carbon Tetrachloride Induced Liver Damage in Rats, Cell Biochemistry and Function, 17, 253-259.
- Noyan, T., Komuroğlu, U., Bayram, I. ve Sekeroğlu, M.R., 2006. Comparison of the Effects of Melatonin and Pentoxifylline on Carbon Tetrachloride Induced Liver Toxicity in Mice, Cell Biol. Toxicol., 22, 381–391.
- Ouchemoukh, S., Schweitzer, P., Bey, M.B., Djoudad-Kadji, H. ve Louaileche, H. 2010. HPLC Sugar Profiles of Algerian Honeys, Food Chemistry, 121, 561–568.
- Owayss, A.A., Rady, M.M. ve Gadallah, F.M., 2004. Pigmentation of Some Honeybee, *Apis Mellifera L.*, Products, Fayoum J. Agric. Res. & Dev.,18, 2, 121-132.
- Ögetürk, M., olakoğlu, N., Kuş, M. A., Kuş, G. ve Sarsılmaz, M., 2009. Karbon Tetraklorür ile Oluşturulan Deneysel Akciğer Hasarında Kafeik Asit Fenetil Esterin Koruyucu Etkinliği, F.Ü.Sağ.Bil.Tıp Derg., 23, 57 – 61.
- Özcelik, B., Orhan, I. ve Toker, G., 2006. Antiviral and Antimicrobial Assessment of Some Selected Flavonoids, Z Naturforsch C, Biosci., 61, 9, 632–8.

- Özdemir, C., Dağdemir, E., Özdemir, S. ve Sağdic, O., 2008. The Effects of Using Alternative Sweeteners to Sucrose on Ice Cream Quality, Journal of Food Quality, 31, 4, 415–428.
- Özenirler, S., Dinçer S., Akyol, G., Öz, I., Kandilci, U. ve Babül, A., 1996. CCl₄'ün Oluşturduğu Karaciğer Hasarına Ginkgo Biloba'nın Etkisi, 13. UGK Antalya, Sözlü Bildiriler, 138.
- Öztürk, I.C., Öztürk, F., Gül, M., Ates, B. ve Cetin, A., 2009. Protective Effects of Ascorbic Acid on Hepatotoxicity and Oxidative Stress Caused by Carbon Tetrachloride in The Liver of Wistar Rats, Cell Biochem. Funct., 27, 309–315.
- Park, E., Kim, S. ve Park, S., 1996. Anti-inflammatory activity of propolis, Archives of Pharmacal Research, 19, 5, 337-341.
- Pramyothin, P., Ngamtin, C., Pongshompoo, S. ve Chaichantipyuth, C., 2007. Hepatoprotective Activity of Phyllanthus Amarus Schum. Et. Thonn. Extract in Ethanol Treated Rats: in vitro and in vivo Studies, J. Ethnopharmacol., 114, 169– 173.
- Proestos, C., Chorianopoulos, N., Nychas, G.J. ve Komaitis. M., 2005. RP-HPLC Analysis of The Phenolic Compounds of Plant Extracts. Investigation of Their Antioxidant Capacity And Antimicrobial Activity, J. Agr. Food Chem., 23, 53, 1190–1195.
- Ramadana, M.F. ve Al-Ghamdi, A., 2012. Bioactive compounds and health-promoting properties of royal jelly: A review, Journal of Functional Foods, 4, 39 –52.
- Recknagel, R.O., 1967. Carbon Tetrachloride Hepatotoxicity, Pharmacol. Rev., 19: 145-208.
- Recknagel, R., Glende, E.A., Dolak, J.A. ve Waller R.L., 1989. Mechanisms of Carbon Tetrachloride Toxicity, Pharma Ther., 43, 139-154.
- Resende, R.J., Beletti, M.E., Machado, E.R., Fonseca, N.M., Mundim, A.V, Melo, L.C., Lima, C.A ve De, P., 2003. Effect of Honey And Amino Acids Containing Either Levulose or Liver Proteolysates Against Carbon Tetrachloride-Induced Acute Hepatotoxicity in Mace, Arch. Velerinaria, 19, 104-109
- Riboli, E. ve Norat, T., 2003. Epidemiologic Evidence of The Protective Effect of Fruit and Vegetables on Cancer Risk, Am. J. Clin. Nutr., 78, 3, 559-569.
- Rizk, Z.M., Abdallah, M.S., Sahara, H.M., Ali, S.A., İbrahim, N.A. ve Moustafa, M.M. 2007. Efficiency of *Cupressus sempiverens L.* and *Juniperus phoenicea* Aganist Carbon Tetrachloride Hepatotoxicity in Rats, Trends in Medical Research, 2, 2, 83-94.
- Robbins, R.J., 2003. Phenolic acids İn Foods: An Overview of Analytical Methodology, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 51, 10, 2866–2887.
- Robbins, S.L., Cotran, R.S. ve Kumar,V., 2000. Basic Pathology, 6th Ed, Philadelphia, WB Saunders Company, 516-519.

- Ross, J.A. ve Kasum C.M. 2002. Dietary flavonoids: Bioavailability, Metabolic Effects and Safety, Annu. Rev. Nutr. 22, 19-34.
- Ross, L., 2009. An Evaluation of The Antioxidant and Antimicrobial Properties of Bee Products Commercially Available in The UK, Yüksek Lisans Tezi, Universty of Chester, İngiltere.
- Sabatini, A.G., Marcazzan, G., Caboni, M.F., Bogdanov, S. ve Almeida-Muradian, L.B., 2009. Quality and standardisation of Royal Jelly, Journal of ApiProduct and ApiMedical Science, 1, 1, 1-6.
- Saldamlı, İ., 2007. Gıda Kimyası, Hacettepe Üniversitesi Yayınları, Ankara, 463-492.
- Santas, J., Carbo, R., Gordon, M.H. ve Almajano, M.P., 2008. Comparison of the Antioxidant Activity of Two Spanish Onion Varieties, Food Chemistry, 107, 1210–1216.
- Sarıkaya, A.O., Ulusoy, E., Öztürk, N., Tuncel, M. ve Kolaylı, S., 2009. Antioxidant Activity and Phenolic Acid Content of Chestnut Honey and Propolis, J Food Biochem, 33, 471-481.
- Saric, A., Balog, T., Sobocanec, S., Kusic, B., Sverko, V., Rusak, G., Likic, S., Bubalo, D., Pinto, B., Reali, D. ve Marotti, T., 2009. Antioxidant Effects Of flavonoid From Croatian Cystus İncanus L. Rich Bee Polen, Food and Chemical Toxicology, 47, 547–554.
- Sanmugapriya, E. ve Venkataraman, S., 2006. Studies on Hepatoprotective and Antioxidant Actions of Strychnos Potatorum Linn. Seeds on CCl₄-Induced Acute Hepatic Injury in Experimental Rats, J. Ethnopharmacol., 105, 154–160.
- Schmidt, J.O., 1996. Bee products: chemical composition and application, Ed., Mizrahi, H., Lensky, Y., Bee Products: Properties, Applications and Apitherapy, Plenum, New York, 15–26.
- Schimdt, L.S., Schmidt, J.O., 1997. Medical Overconcern; What are the Real Allergic and Healty Risks from Bee Products and Apitherapy. İnternational Coference on: Bee Product: Properties, Applications and Apitherapy, İsrail, 43.
- Schmidt, J.O., 1997. Bee Product Chemical Composition and Application. İnternational Coference on: Bee Product: Properties, Applications and Apitherapy, İsrail, 15.
- Schümann, J., Prockl, J., Kiemer, A.K., Vollmar, A.M., Bang, R., ve Tiegs, G. 2003. Silibinin Protects Mice from T cell–dependent Liver Injury, J. Hepatol., 39, 333–340.
- Seven, A. ve Candan, G., 1996. Antioksidan Savunma Sistemleri, Cerrahpaşa J. Med., 27, 41-50.
- Shafiq-Ur-Rehman, 1984. Lead-induced Regional Lipid Peroxidation in Brain, Toxicol Lett., 21, 333–337.

- Shahidi, F. ve Naczk, M., 1995. Food Phenolics: Sources, Chemistry, Effects, Applications, Technomic Publishing, Co. Inc., Lancaster, 235-280.
- Shaker, E., Mahmoud, H. ve Mnaa, S., 2010. Silymarin, the Antioxidant Component and *Silybum marianum* Extracts Prevent Liver Damage, Food Chem. Toxicol., 48, 803–806.
- Sharma, M., Pillai, K.K., Husain, S.Z. ve Giri, D.K., 1997. Protective Role of Propolis Against Alcohol Carbon Tetrachloride-Induced Hepatotoxicity in Rats, Indian Journal of Pharmacology, 29, 2, 76-81.
- Shelef, L.A., 1983. Antimicrobial Effects of Spices, J. Food Safety, 6, 29-44.
- Sherlock, S., 1986. The Spectrum of Hepatotoxicity Due to Drugs, Lancet, 2, 440- 444.
- Sherlock, S. ve Dooley, J., 1987. Diseases of the Liver and Biliary System, Hepatic Cirrhosis, 9th Ed, London, Blackwell Scientific Publications, 371-384.
- Shinoda, M., Nakajin, S., Oikawa, T., Sato, K., Kamogawa, A. ve Akiyama, Y., 1978. Biochemical Studies on Vasodilative Factor in Royal Jelly, Yakugaku Zasshi, 98, 139–145.
- Sies, H., 1991. Oxidative Stress from Basic Research to Clinical Application, Am. J. Med., 9, 31-37.
- Sies, H., 1999. Glutathione and Its Role in Cellular Functions, Free Radic Biol Med., 27, 10, 916-935.
- Silici, S., 2008. Farklı Botanik Orijine Sahip Propolis Örneklerinde Biyolojik Olarak Aktif Bileşiklerin Belirlenmesi, Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi, 24, 120-128.
- Silva, J.F.M., Souza, M.C., Matta, S.R., Andrade, M.R. ve Vidal, F.V.N. 2006. Correlation Analysis Between Phenolic Levels of Brazilian Propolis Extracts and Their Antimicrobial and Antioxidant Activities, Food Chemistry, 99, 431–435.
- Sinclair, A.J., Barnet, A.H. ve Lunec, J., 1990. Free Radicals and Antioxidant Systems in Health and Disease, Br J Hosp Med., 43, 334-344.
- Slater, T.F., 1982. Free Radicals As Reactive Intermediates in Injury., Ed., Snyder, I.R., Parke, D.V., Kocsis, J.J., Jollow, D.J., Gebson, G.G. ve Witmer, C.M., Biological Reactive Intermediates II, Chemical Mechanisms and Biological Effects, New York, Plenum Press, 575-589.
- Slinkard, K. ve Singleton, V. L., 1977. Total Phenol Analysis: Automation and Comparison with Manuel Methods, Am. J. Enol. Viticult., 28, 49-55.

- Sturgill, M.G. ve Lambert, G.H. 1997. Xenobiotic-induced Hepatotoxicity: Mechanisms of Liver Injury and Methods of Monitoring Hepatic Function, Clin Chem, 43, 2, 1512-1526.
- Socha, R., Juszczak, L., Pietrzyk, S. ve Fortuna, T., 2009. Antioxidant Activity and Phenolic Composition of Herbhoney, Food Chemistry, 113, 2, 568-574.
- Son, D.J., Lee, J.W., Lee, Y.H., Song, H.S., Lee, C.K. ve Hong, J.T., 2007. Therapeutic Application of Anti-Arthritis, Pain-Releasing, and Anti-Cancer Effects of Bee Venom and Its Constituent Compounds, Pharmacol. Ther., 115, 246-270.
- Sorata, Y., Takahama, U. ve Kimura, M. 1984. Protective Effect of Quercetin and Rutin on Photosensitized Lysis of Human Erythrocytes in The Presence of Hematoporphyrin, Biochim. Biophys. Acta., 799, 313-317.
- Sönmez, R. ve Ö. Altan, 1992. Teknik Arıcılık, Ege Üniversitesi Basımevi, Bornova, İzmir.
- Spletstoeser, W.D. ve Werner, S.P., 2002. Oxidative Stress in Phagocytes ‘The Enemy Within’, Microsc Res Technique, 57, 441-455.
- Stanciu, O., Marghitas, L.A., Dezmirean, D., 2008. A Comparison of Methods Used to Define the Antioxidant Capacity of Bee Pollen and Beebread from Romania, 43rd Croatian and 3rd International Symposium on Agriculture, Opatija, Croatia, 751-754.
- Stangaciu, S., What is apitherapy? www.apitherapy.com (Accessed 27.10.06).
- Staroverov, V.N, ve Davidson, E.R., 2000. Distribution of Effectively Unpaired Electrons, Chem Phys Lett., 330, 161-168.
- Storz, G. ve Imlay, J.A., 1999, Oxidative Stress, Curr. Opin. Microbiol., 2, 188-194.
- Stoyanovsky, D.A. ve Cederbaum, A.I., 1999. Metabolism of Carbon Tetrachloride to Trichloromethyl Radical: An ESR And HPLC-EC Study, Chem Res Toxicol., 12, 730-736.
- Stratil, P., Klejdus, B. ve Kuban, V., 2006. Determination of Total Content of Phenolic Compounds and Their Antioxidant Activity in Vegetables–Evaluation of Spectrophotometric Methods, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 54, 3, 607-616.
- Sun, Y., Oberley, L. ve Li, Y., 1988. A Simple Method For Clinical Assay of Superoxide Dismutase, ClinChem., 34, 497-500.
- Şahinler, N., 2000. Arı Ürünleri Yapısı ve İnsan Sağlığı Açısından Önemi, M.K.Ü. Ziraat Fakültesi Dergisi, 5, 139-148.
- Şişmanoğlu, M., 1995. Karaciğer ve Biliyer Sistem hastalıkları, “Cecil Essentials of Medicine”, Çev. Ed., Tuzcu, M., Yüce Yayınları, İstanbul, sayfa 336-342.

- Takenaka, T., Yatsunami, K. ve Echigo, T., 1986. Changes in Quality of Royal Jelly During Storage, Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi, 33, 1, 1-7.
- Tamura, S., Kono, T., Harada, C., Yamaguchi, K. ve Moriyama, T., 2009. Estimation and Characterisation of Major Royal Jelly Proteins Obtained From The Honeybee *Apis mellifera*, Food Chem., 114, 1491–1497.
- Tan-No, K., Nakajima, T., Shoji, T., Nakagawasai, O., Nijima, F., Ishikawa, M., Endo, Y., Sato, T., Satoh, S. ve Tadano, T., 2006. Anti-inflammatory Effect of Propolis through Inhibition of Nitric Oxide Production on Carrageenin-Induced Mouse Paw Edema, Biol. Pharm. Bull., 29, 1, 96-99.
- Taormina, P.J., Niemira, B.A. ve Beuchat, L.R., 2001. Inhibitory Activity of Honey Against Foodborne Pathogens As Influenced by The Presence of Hydrogen Peroxide and Level of Antioxidant Power, Z. International Journal of Food Microbiology, 69, 217–225.
- Tezcan, F., Kolaylı, S., Sahin, H., Ulusoy, E. ve Erim, B.F. 2011. Evaluation of Organic Acid, Saccharide Composition and Antioxidant Properties of Some Authentic Turkish Honeys, J. Food Nutr. Res., 50, 33-40.
- Thomas, M.J., 1995. The Role of Free Radicals And Antioxidants: How Do We Know That They Are Working, Crit Rev Food Sci Nutr, 35, 182, 21-39.
- Ting, H., Hsu, Y., Tsai, F.L., Chou, M. ve Chen, W. 2011. The in vitro and in vivo Antioxidant Properties of Seabuckthorn (*Hippophae Rhamnoides* L.) Seed Oil, Food Chemistry, 125, 652–659.
- Toussoun, Z., Rashed, A. ve Hegazi, A.G., 1997. Honey and Propolis As Management of Some Chronic Skin Ulcers, International Symposium on Apitherapy Cairo, Egypt.
- Townsend, G.F., Morgan, J.F., Tolnai, S., Hazlett, B., Morton, H.J. ve Shuel, R.W., 1960. Studies on The in vitro Antitumor Activity of Fatty Acids. I. 10-Hydroxy-2decenoic Acid From Royal Jelly, Cancer Research, 20, 503–510.
- Townsend, D.M., Tew, K.D. ve Tapiero, H., 2003. The Importance Glutathione in Human Disease, Biomedicine and Pharmacotherapy, 57, 145-155.
- TÜİK, 2006. Başbakanlık Türkiye İstatistik Kurumu, Tarımsal Yapı, Ankara.
- Tüylü, A.Ö. ve Sorkun, K. 2006. Protein Analysis with Kjeldahl of Polen Grains Collected by *Apis mellifera* L. Mellifera, 6, 10-12.
- Ulicná, O., Greksák, M., Vancová, O., Zlatos, L., Galbavý, S., Bozek, P. ve Nakano, M. 2003. Hepatoprotective Effect of Rooibos Tea (*Aspalathus linearis*) on CCl₄-Induced Liver Damage in Rats, Physiol. Res., 52, 461-466.
- Ulusoy, E., 2005. Türkiye'nin Bazı Yörelerinden Kestane ve Çiçek Ballarının Antioksidan Aktiviteleri ve Mineral İçeriklerinin Karşılaştırılması, Yüksek Lisans Tezi, K.T.Ü., Fen Bilimleri Enstitüsü, Trabzon.

- Ulusoy, E., Kolaylı, S. ve Sarıkaya A.O., 2010, Antioxidant and Antimicrobial Activity of Different Floral Origin Honeys From Türkiye, Journal Of Food Biochemistry, 34, 321–335.
- Viuda-Martos, M., Ruiz-Navajas, Y., Fernandez-Lopez, J. ve Perez-Alvarez, J.A., 2008. Functional Properties of Honey, Propolis, and Royal Jelly, J. Food Sci., 73, 117– 124.
- Wan, X.Y., Luo, M., Li, X.D. ve He, P., 2009. Hepatoprotective and Antihepatocarcinogenic Effects of Glycyrrhizin and Martine, Chem. Biol. Interact., 181, 15–19.
- Wang, C.Y., Ma, F.L., Liu, J.T., Tian, J.W. ve Fu, F.H., 2007. Protective Effect of Salvianic Acid A on Acute Liver Injury Induced by Carbon Tetrachloride in Rats, Biol. Pharm. Bull, 30,1, 44-47.
- Wang, L., Mineshita, S., Ga, I., Shigematsu, T. ve Matsuno, T., 1993. Antiinflammatory Effect of Propolis, Japanese Journal of Pharmacological Therapeutics, 24, 223– 224.
- White, J.W. Subers, M.H. ve Schepartz, A.I. 1963. The Identification of Inhibine the Antibacterial Factor in Honey, as Hydrogen Peroxide and Its Origin in A Honey Glucose-oxidase System, Biochim. Biophys. Acta, 73, 57–70.
- White Jr., J.W., 1984. Honey, The Hive and Honey Bee (7 th ed) Dadant and Sons, Hamilton, IL, USA, 491-530.
- Wollgast, J. ve Anklam, E., 2000. Review on Polphemols in Theobroma Cacao, Changes in Composition During the Manufacture of Choconate and Methodology for Identification and Quantification, Food Res Int., 33, 423-447.
- Wongchai, V. ve Ratanavalachi, T. 2002. Seasonal Variation of Chemical Composition of Royal Jelly Produced in Thailand, Thammasat Int. J. Sc. Tech., 7, 2, 1-8.
- Woo, K.S. ve Park, J.S. 1997. Eucalyptus Propolis Beverages With Their Composition And Effects. In Bee Products Properties, Applications and Apitherapy. Ed. Mizrahi, A. ve Lensky, Y., New York Plenum Pres, 125-128.
- Yagi, K., 1994. Lipid Peroxides and Related Radicals in Clinical Medicine, in Free Radicals in Diagnostic Medicine, 1st edition, Plenum Press, New York.
- Yamaguchi, I. ve Tsuji, T., 2002. The Detection Of Bioactive Components of The Powder of Bee Polen, Bulletin of Tokyo Kasei University, 42, 111-114.
- Yatsunami, K., ve Echigo, T., 1985. Antibacterial Action of Royal Jelly, Bulletin of the Faculty of Agriculture of The Tamagawa University, 25, 13–22.
- Yeşiltaş, B., Çapanoğlu, E., Durmuş, E. F. ve Boyacıoğlu, D., 2012. İstanbul'dan Toplanan Polen Örneklerinin Antioksidan Kapasitesinin Belirlenmesi, 3. Gıda Güvenliği Kongresi, İstanbul.

- Yıldız, O., 2011. Bir Gıda Maddesi Olarak Kestane Poleninin Kimyasal Bileşimi, Biyoaktif Özellikleri Ve Karaciğer Hasarını Önlemedeki Rolü, Doktora Tezi, K.T.Ü., Fen Bilimleri Enstitüsü, Trabzon.
- Young, I.S. ve Woodside J.V., 2001. Antioxidants in Health and Disease, J. Clin. Pathol., 54, 3, 176-186.
- Yu, L., Haley, S., Perret, J., Harris, M., Wilson, J. ve Qian M., 2002. Free Radical Scavenging Properties of Wheat Extracts, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 50, 1619-1624.
- Zimmerman, H. J. ve Maddrey, W.C., 1987. Toxic and Drug-Induced Hepatitis, In “Diseases of the Liver”. Ed., Schiff, L. ve Schiff, E.R. , 591-668, J. B. Lippincott, Philadelphia.
- Zumla, A. ve Lulat, A., 1989. Honey-aremedy Rediscovered, Journal of the Royal Society of Medicine, 82, 384-385.

ÖZGEÇMİŞ

1984 yılında Trabzon'da doğdu. 2001 yılında Trabzon Lisesinden mezun oldu. Aynı yıl KTÜ Fen Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümünü kazandı. 2006 yılında bu bölümden Kimyager ünvanı ile mezun oldu. 2008 yılında KTÜ Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisans Programından mezun oldu. Eylül 2008'de KTÜ Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı'nda Doktora Programı'na başladı. 2009 yılından itibaren Artvin Çoruh Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü'nde öğretim görevlisi olarak görev yapmaktadır. Yabancı dili İngilizce'dir.