

**KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

KİMYA ANABİLİM DALI

**BİR GIDA MADDESİ OLARAK KESTANE POLENİNİN KİMYASAL BİLEŞİMİ,
BİYOAKTİF ÖZELLİKLERİ VE KARACİĞER HASARINI ÖNLEMEDEKİ
ROLÜ**

DOKTORA TEZİ

Oktay YILDIZ

**ARALIK 2011
TRABZON**

KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KİMYA ANABİLİM DALI

**BİR GIDA MADDESİ OLARAK KESTANE POLENİNİN KİMYASAL BİLEŞİMİ,
BİYOAKTİF ÖZELLİKLERİ VE KARACİĞER HASARINI ÖNLEMEDEKİ
ROLÜ**

Gıda Yük. Müh. Oktay YILDIZ

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

**Tezin Enstitüye Verildiği Tarih : 04.11.2011
Tezin Savunma Tarihi : 05.12.2011**

Tez Danışmanı : Doç. Dr. Sevgi KOLAYLI

Trabzon 2011

Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü

Kimya Ana Bilim Dalında

Oktay YILDIZ Tarafından Hazırlanan

**BİR GIDA MADDESİ OLARAK KESTANE POLENİNİN KİMYASAL BİLEŞİMİ,
BİYOAKTİF ÖZELLİKLERİ VE KARACİĞER HASARINI ÖNLEMEDEKİ
ROLÜ**

**başlıklı bu çalışma, Enstitü Yönetim Kurulunun 15/ 11 / 2011 gün ve 1429/7 sayılı
kararıyla oluşturulan jüri tarafından yapılan sınavda**

DOKTORA TEZİ

olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri

Başkan : Prof. Dr. Orhan DEĞER

Üye : Prof. Dr. Ahmet ÇOLAK

Üye : Prof. Dr. İsmail KIRAN

Üye : Doç. Dr. Sevgi KOLAYLI

Üye : Doç. Dr. Sinan CANPOLAT

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

Prof. Dr. Sadettin KORKMAZ

Enstitü Müdürü

ÖNSÖZ

“Bir Gıda Maddesi Olarak Kestane Poleninin Kimyasal Bileşimi, Biyoaktif Özellikleri ve Karaciğer Hasarını Önlemedeki Rolü” 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 Doç. Dr. Sevgi KOLAYLI’ya teşekkür ederim.

Deneysel çalışmalarında yardımlarını esirgemeyen proje ekibimiz Arş. Gör. Hüseyin ŞAHİN, Doç. Dr. Sinan CANPOLAT, Yrd. Doç. Dr. Rezzan ALİYAZICIOĞLU, Doç. Dr. Esin YULUĞ, Doç. Dr. Ahmet ALVER, Öğr. Gör. Özlem TARHAN ile Doç. Dr. Murat KÜÇÜK, Doç. Dr. Sibel SİLİCİ ve Tıp Fakültesi, Deney Hayvanları Merkezi personeline teşekkür ederim.

Çalışmam esnasında beni yönlendiren ve katkıda bulunan tez izleme jüri üyelerim Prof. Dr. Orhan DEĞER ve Prof. Dr. Ahmet ÇOLAK hocalarıma teşekkürü borç bilirim.

Doktora çalışmam süresince BİDEB 2211-Yurt İçi Doktora Burs Programı kapsamında bursiyeri olduğum TÜBİTAK’a ve bu çalışmaya destek olan KTÜ BAP birimine (Proje No: 2009.111.002.5) teşekkür ederim....

Ekibimizin apiterapik çalışmalarında numune desteği veren ve çalışmalarımızı motive eden Trabzon ve Zonguldak Arı Yetiştiricileri Birlik başkanları Sn. Zekeriya AYDIN ve Selahattin GÜNEY ’e teşekkür ederim.

Ayrıca maddi ve manevi destekleri ile hep yanımda olan eşime, minicik kızım Meryem Mina’ya ve aileme sonsuz teşekkür ederim.

Oktay YILDIZ

Trabzon 2011

TEZ BEYANNAMESİ

Doktora Tezi olarak sunduğum “Bir Gıda Maddesi Olarak Kestane Poleninin Kimyasal Bileşimi, Biyoaktif Özellikleri ve Karaciğer Hasarını Önlemedeki Rolü” başlıklı bu çalışmayı baştan sona kadar danışmanım Doç. Dr. Sevgi KOLAYLI'nın sorumluluğunda tamamladığımı, verileri/örnekleri kendim topladığımı, deneyleri/analizleri ilgili laboratuvarlarda yaptığımı/yaptırdığımı, başka kaynaklardan aldığım bilgileri metinde ve kaynakçada eksiksiz olarak gösterdiğimi, çalışma sürecinde bilimsel araştırma ve etik kurallara uygun olarak davrandığımı ve aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal sonucu kabul ettiğimi beyan ederim. 02/11/2011

Oktay YILDIZ

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No</u>
ÖNSÖZ.....	III
TEZ BEYANNAMESİ.....	IV
İÇİNDEKİLER	V
ÖZET	IX
SUMMARY	X
ŞEKİLLER DİZİNİ	XI
TABLolar DİZİNİ.....	XIII
SEMBOLLER DİZİNİ	XV
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	4
2.1. Apiterapi	4
2.2. Polen	6
2.3. Biyoaktif Özellikler	13
2.3.1. Antioksidanlar	16
2.3.1.1. Antioksidanların Sınıflandırılması	17
2.3.1.1.1 Enzimatik Yapıdaki Antioksidanlar	18
2.3.1.1.1.1 Süperoksit Dismutaz	19
2.3.1.1.1.2. Katalaz	20
2.3.1.1.1.3 Glutasyon Peroksidaz	20
2.3.1.1.1.4 Glutasyon-S-Transferaz	23
2.3.1.1.1.5 Sitokrom Oksidaz	24
2.3.1.1.1.6 Glukoz 6-Fosfat Dehidrogenaz	24
2.3.1.1.2. Enzimatik Yapıda Olmayan Antioksidanlar	25
2.3.1.1.2.1 Vitamin E	25
2.3.1.1.2.2 Vitamin C	27
2.3.1.1.2.3 Vitamin A	28
2.3.1.1.2.4 Transferrin ve Ferritin	29
2.3.1.1.2.5 Hemoglobin ve Myoglobin	30
2.3.1.1.2.6 Bilirubin	30

2.3.1.1.2.7	Albumin	31
2.3.1.1.2.8	Glutasyon	31
2.3.2.	Diğer Antioksidan ve Antimikrobiyal Etkili Biyomoleküller	31
2.3.3.	Fenolik Bileşikler	32
2.4.	Serbest Radikaller ve Oksidatif Stres	36
2.4.1.	Serbest Radikaller	36
2.4.2.	Serbest Radikallerin Organizmadaki Biyolojik Etkileri.....	37
2.5.	CCl ₄ ve Metabolize Edilmesi	39
2.6.	Karaciğer ve Siroz	41
2.6.1.	Karaciğer Histolojisi	42
2.6.2.	Karaciğer Fonksiyonları	42
2.6.3.	Siroz	44
2.7.	Toksikoloji, Ksenobiyotikler ve Biyotransformasyonu	44
2.8.	Deneyel Hayvan Çalışmaları	46
3.	YAPILAN ÇALIŞMALAR.....	49
3.1.	Çalışmada Kullanılan Materyaller	49
3.1.1.	Cihazlar.....	49
3.1.2	Kimyasal Madde ve Malzemeler	50
3.1.3	Çözeltiler	52
3.1.4.	Deney Hayvanları	53
3.2.	Numunelerin Temini.....	54
3.3.	Polen Analizleri	54
3.3.1.	Su İçeriği	54
3.3.2	Kül Miktarı	54
3.3.3	Toplam Protein Miktarı	55
3.3.4	pH Tayini	55
3.3.5	Nişasta Tayini	56
3.3.6	Pektin Tayini.....	56
3.3.7.	Eter Ekstraktı (Ham Yağ) Tayini.....	57
3.3.8.	Toplam Fenolik Madde Tayini	57
3.3.9	Toplam Flavonol Tayini	58
3.3.10	Toplam Antosiyanin Tayini.....	59
3.3.11	Toplam Karotenoid Miktarı Tayini	61

3.3.12	Demir (III) İndirgeme/FRAP Yöntemi İle Antioksidan Tayini.....	61
3.3.13	HPLC ile Şeker Tayinleri	62
3.3.14	RP-HPLC-UV ile Fenolik Bileşiklerin Tayini	63
3.3.14.1	Standartlar ve Kalibrasyon	64
3.3.14.2	RP-HPLC-UV Koşulları.....	65
3.3.15.	Palinolojik Çalışmalar	66
3.3.15.1.	Gliserin-Jelatin Hazırlanması	66
3.3.15.2.	Preparat Hazırlanması.....	67
3.4.	DeneySEL Hayvan Çalışmaları	67
3.4.1.	Deney Grupları ve Uygulamalar.....	67
3.4.2.	Vücut Ağırlığı Takibi	68
3.4.3.	Dekapitasyon, Materyallerin Alınması ve Ön İşlemler	68
3.4.4.	Biyokimyasal İncelemeler	69
3.4.4.1.	Lipit Peroksidasyon Seviyesinin Ölçülmesi	69
3.4.4.1.1	Karaciğer Lipit Peroksidasyon Seviyesinin Ölçülmesi	69
3.4.4.1.2	Plazmada Lipit Peroksidasyon Seviyesinin Ölçülmesi	70
3.4.4.1.3	Eritrosit Paketlerinde Lipit Peroksidasyon Seviyesinin Ölçülmesi.....	71
3.4.4.2.	Karaciğer Homojenatlarında, Plazmalarda ve Eritrosit Paketlerinde Süperoksit Dismutaz Aktivitesinin Ölçülmesi	71
3.4.4.3.	Redükte Glutasyon Seviyelerinin Belirlenmesi	72
3.5.	İstatistiksel Analiz	73
4.	BULGULAR.....	74
4.1.	Kestane Poleninin Özellikleri.....	74
4.1.1.	Su İçerikleri	74
4.1.2.	Kül Miktarları	74
4.1.3	Protein Miktarları	75
4.1.4.	pH Değerleri	75
4.1.5.	Nişasta Miktarları	75
4.1.6.	Pektin Miktarları.....	76
4.1.7.	Ham Yağ Miktarları.....	76
4.1.8.	Toplam Fenolik Madde Miktarları	76
4.1.9	Toplam Flavonol Miktarları	78
4.1.10	Toplam Antosiyanin Miktarları.....	79

4.1.11.	Toplam Karotenoid Miktarları.....	81
4.1.12.	FRAP Antioksidan Kapasite.....	81
4.1.13.	Şeker Miktarları.....	83
4.1.14.	Fenolik Bileşikler	84
4.1.15.	Palinolojik Değerlendirmeler	85
4.2.	Sıçanlara Ait Sonuçlar	87
4.2.1.	Vücut Ağırlığı Takibi	87
4.2.2.	Biyokimyasal Bulgular	87
4.3.	Bulguların Korelasyonu	95
5.	TARTIŞMA	100
6.	SONUÇ VE ÖNERİLER.....	112
7.	KAYNAKLAR	115

ÖZGEÇMİŞ

Doktora Tezi

ÖZET

BİR GIDA MADDESİ OLARAK KESTANE POLENİNİN KİMYASAL BİLEŞİMİ,
BİYOAKTİF ÖZELLİKLERİ VE KARACİĞER HASARINI ÖNLEMEDEKİ ROLÜ

Oktay YILDIZ

Karadeniz Teknik Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Kimya Anabilim Dalı
Danışman: Doç. Dr. Sevgi KOLAYLI
2011, 135 Sayfa

Yapılan çalışmada, gıda maddesi olarak kullanılan Karadeniz bölgesi kestane polenlerinin botanik özellikleri, fiziksel ve kimyasal özellikleri ile karaciğer hasarını önlemedeki rolü araştırıldı. Polenlerin antioksidan kapasitesi toplam fenolik madde, toplam flavonoid, antosiyanin, karotenoid içeriği ve demir indirgeme/antioksidan güç (FRAP) testleri ile belirlendi. Polenin CCl₄ ile deneysel hasar oluşturulan sıçanlardaki tedavi edici etkisi araştırıldı ve sonuçlar pozitif kontrol olarak, Silibinin ile karşılaştırıldı.

Çalışma 49 adet Sprague Dawley cinsi erkek sıçan yedi gruba ayrılarak yapıldı. Yedi gün sonunda, sıçanlar dekapite edilip plazma, eritrosit ve karaciğer dokularında analizler yapıldı. Alanin aminotransaminaz ve aspartat aminotransaminaz, malondialdehit, süperoksit dismutaz ve glutatyon miktarları ölçüldü ve polen beslemesinin CCl₄ hasarını önemli ölçüde tedavi ettiği gözlemlendi. Çalışmada polenlerin % 14,03-% 16,87 su; % 17,67-% 23,67 protein; % 25,35-% 37,35 glukoz; % 37,72-% 54,21 fruktoz; 13,68-28,87 mgGAE/ g kuru polen fenolik madde içerdiği; antioksidan kapasitesinin 68,04-82,31 mM TEAC/g kuru polen olduğu ve fenolik asitlerden gallik asit, protokatekuik asit, *p*-hidroksibenzoik asit, klorojenik asit ve *p*-kumarik asidi içerdiği tespit edildi. Bulgular, yüksek biyolojik değere sahip polenin *in vivo* oksidatif stresi ve hasarı önlemede oldukça etkili olduğu ve düzenli tüketilmesi halinde insanlar için de faydalı olabileceğini gösterdi.

Anahtar Kelimeler: Polen, Kestane, CCl₄, Fenolik bileşikler, Palinoloji, Sıçan

PhD. Thesis

SUMMARY

CHEMICAL COMPOSITION, BIOACTIVE PROPERTIES OF CHESTNUT POLLEN
AS A FOOD AND IT'S PROTECTIVE ROLE ON THE LIVER INJURY

Oktay YILDIZ

Karadeniz Technical University
The Graduate School of Natural and Applied Sciences
Chemistry Graduate Program
Supervisor: Assoc. Prof. Sevgi KOLAYLI
2011, 135 Pages

The present study was undertaken to elucidate of botanical characteristics, physical, chemical composition of chestnut pollens, collected by honeybees and consumed as a food, and their protective roles against carbontetrachloride (CCl₄)–induced liver damage. Antioxidant capacity of pollens was determined by using total phenolic content, total flavonoid, anthocyanin, carotenoid content and ferric reducing/antioxidant power (FRAP). The pollen's therapeutic effect was monitored by plasma aspartate transaminase (AST), alanin transaminase (ALT) activities and some antioxidant parameters, and the result was compared with silibinin, as a positive control.

The study was conducted in 49 male Sprague dawley rat and seven groups were established. At the end of the seven days, blood and liver tissue were collected and analyzed. ALT, AST, malondialdehyde, superoxide dismutase, and glutathione were measured. It was inferred that the chestnut pollen exhibited good inhibitory effects on CCl₄-induced liver damage. The water content ranged from % 14,03 to % 16,87; total protein content ranged form % 25,35 to % 37,35; glucose content ranged from % 25,35 to % 37,35; fructose content ranged from % 37,72 to % 54,21; the total phenolics ranged from 13,68 to 28.87 mg GAE equivalents/ g pollen; the total antioxidant activity ranged from 68,04 to 82,31 mM of Trolox equivalents/g. The present findings indicate that in vivo pollen extract administration may be useful for the prevention of oxidative stress induced oxidative damage.

Key Words: Pollen, Chestnut, CCl₄, Phenolic compounds, Palynology, Rat

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa No

Şekil 1. Arılar tarafından toplanan çeşitli renkteki polenler	7
Şekil 2. Zambak çiçeği ve polenleri	7
Şekil 3. Arıların arka bacağı, elektron mikroskobu görünümü	8
Şekil 4. Değişik tipteki polenlerin mikroskopik görünümü	9
Şekil 5. Kestane poleninin mikroskopik görünümü	12
Şekil 6. Antioksidanların sınıflandırılması.....	18
Şekil 7. Glutasyon peroksidaz ve glutasyon redüktazın katalizlediği reaksiyon	22
Şekil 8. E Vitamini (α - tokoferol).....	26
Şekil 9. C Vitamini	28
Şekil 10. Flavonoidlerin temel yapısı ve bazı substituenleri.....	33
Şekil 11. Antosiyaninlerin pH 1 ve 4,5’de (UV-Vis) spektrumları.....	59
Şekil 12. Demir (III)’ün indirgenme reaksiyonu.....	61
Şekil 13. Çalışmaya ait 280 ve 315 nm’deki RP-HPLC-UV fenolik standartlar	65
Şekil 14. Gallik asit standardı kullanılarak hazırlanan standart çalışma grafiği	77
Şekil 15. Kuersetin standardı kullanılarak hazırlanan standart çalışma grafiği	79
Şekil 16. Troloks® konsantrasyonlarına karşılık absorbans grafiği	82
Şekil 17. Polenlerin HPLC kromatogramı.....	83
Şekil 18. Castanea sativa polenlerinin görüntüsü.....	86
Şekil 19. Castanea sativa poleninin görüntüsü	86
Şekil 20. Plazmalar için hazırlanan MDA standart eğrisi	88
Şekil 21. Karaciğer için hazırlanan MDA standart eğrisi	88
Şekil 22. Standart SOD grafiği.....	89
Şekil 23. Grupların plazma AST ve ALT değerleri	90
Şekil 24. Grupların plazma MDA düzeyleri.....	90
Şekil 25. Grupların plazma SOD düzeyleri	91
Şekil 26. Eritrositlerin GSH düzeyleri	92
Şekil 27. Eritrositlerin MDA düzeyleri	92

Şekil 28. Eritrositlerin SOD düzeyleri	93
Şekil 29. Grupların karaciğer MDA düzeyleri	93
Şekil 30. Grupların karaciğer SOD düzeyleri	94
Şekil 31. Sıçan parametrelerinin serpilme grafiği	99

TABLULAR DİZİNİ

	<u>Sayfa No</u>
Tablo 1. Flavonoidlerin genel karbon iskeletleri ve taşıdıkları substituentler	34
Tablo 2. HPLC analizlerinde kullanılan fenolik asitler ve formülleri.....	35
Tablo 3. En sık karşılaşılan serbest radikaller ve serbest radikal üreten türlerin bazı özellikleri.....	37
Tablo 4. Çalışmalarda kullanılan temel cihazlar	49
Tablo 5. Çalışmada kullanılan temel kimyasallar	50
Tablo 6. Çalışmalarda kullanılan bazı çözeltiler ve hazırlanışları	52
Tablo 7. Toplam fenolik madde tayininde yapılan pipetleme işlemleri	58
Tablo 8. Toplam flavonol tayininde yapılan pipetleme işlemleri.....	58
Tablo 9. FRAP tayininde yapılan pipetleme işlemleri	62
Tablo 10. Fruktoz, glukoz, sakkaroz standart çözeltilerinden hazırlanan kalibrasyon çözeltileri	63
Tablo 11. Geliştirilen LC-UV metodunun parametreleri	66
Tablo 12. Plazmada lipit peroksidasyon seviyesinin ölçülmesi için yapılan pipetleme işlemleri.....	70
Tablo 13. Kestane polenlerinin su içerikleri, kül miktarları ve protein içerikleri (%) ..	75
Tablo 14. Kestane polenlerinin pH değeri, nişasta, pektin ve ham yağ miktarları (%)	76
Tablo 15. Kestane polenlerinin toplam fenolik madde miktarları (TFMM)	78
Tablo 16. Polenlerin toplam flavonol miktarları	79
Tablo 17. Kestane polenlerinin toplam monomerik antosiyanin miktarları	80
Tablo 18. Kestane polenlerinin toplam karotenoid miktarları	81
Tablo 19. Kestane polenlerinin TEAC değerleri	82
Tablo 20. Polenlerin glukoz ve fruktoz içerikleri.....	84
Tablo 21. ZP1 polenlerindeki fenolik asit dağılımları	85
Tablo 22. Sıçanların ağırlık değişimleri	87
Tablo 23. Gruplara ait plazma parametreleri.....	89
Tablo 24. Grupların eritrosit paketlerine ait parametreler.....	91
Tablo 25. Gruplara ait karaciğer parametreleri	93

Tablo 26. Polen sonuçlarının korelasyonu	95
Tablo 27. Sıçanlara ait parametrelerin korelasyonu	97

SEMBOLLER DİZİNİ

HPLC	:Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi
AOAC	:Amerikan Resmi Analitik Kimyacılar Birliği
LOD	:Dedeksiyon limiti
LOQ	:Analitlerin belirlenme limiti
SOD	:Süperoksit dismutaz
MDA	:Malondialdehit
GSH	:Redükte glutatyon
GSH-Px	:Glutatyon peroksidaz
CCl ₄	:Karbontetraklorür
DPPH	:2,2-difenil-1-pikrilhidrazil
ATSDR	:Toksik Maddeler ve Hastalık Kayıt Ajansı
EPA	:Birleşik Devletler Çevre Koruma Dairesi
ALT	:Alanin aminotransferaz
AST	:Aspartat aminotranferaz
GİS	:Gastrointestinal sistem
i.p	:İntraperitoneal (karın içi boşluk)
SPSS	:Statistical Package for Social Sciences
NO.	:Azot monoksit radikali
O ₂	:Oksijen
O ₂ [·]	:Süperoksit radikali
ROO [·]	:Alkil perosit radikali
HO ₂ [·]	:Hidroperoksit radikali
Troloks [®]	:6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karboksilik asit

1.GİRİŞ

Polen, çiçekli bitkilerde, çiçeklerin erkek üreme organlarının (stamen) üst kısmında bulunan anterlerin içindeki keseciklerde yer alan, erkek hücre taşıyan buruşuk, dikenli, yağlı ve yapışkan yapıdaki, bal arısı tarafından toplanan kurutulmuş çiçek tozları olup bitkinin erkek gametini (bu nedenle erkek DNA) dişi gamete taşıyan bitkisel yapıdır (TSE, 1989). Sıkıştırılmış polen tozu binlerce mikroskobik (genellikle 15-100 mikron) polen tanesi içermektedir (Erdoğan ve Dodoloğlu, 2005).

Kimyasal ve biyolojik açıdan herhangi bir zararlı reaksiyon ya da organizma üzerinde kontrol edici etki gösteren, onu zararsızlaştıran veya yok eden etkilerin hepsine biyolojik etkinlik, biyolojik açıdan etkin maddelere de biyolojik aktif maddeler veya biyoaktif maddeler denir. Arı ürünlerinin tamamı oldukça yüksek biyoaktif özellik gösteren bileşikler bünyesinde bulundurmaktadır (Küçük vd., 2007; Eraslan vd., 2008; Sarıkaya vd., 2009). Bal, polen, propolis, arı sütü, balmumu ve arı zehri temel arı ürünlerinden olup her birinin ayrı ayrı biyolojik önemi bulunmaktadır. Bal ve propolis, üzerinde birçok çalışma yapılan arı ürünlerinden olup polenin biyolojik değeri yeterince aydınlatılmamıştır.

Antioksidanlar, organizmadaki bileşiklerin değişik yollardan oksidasyonlarını engelleyen ve/veya önleyen biyoaktif bileşiklerdir. Son yüzyılda insanların doğal antioksidanlara olan ilgisi artmıştır. Bilhassa yapay antioksidanların karsinogenik ve potansiyel bazı zararlı etkilerinin olduğunun düşünülmesi bu ilgiyi artırmıştır. Doğal antioksidanların büyük çoğunluğu bitkisel kaynaklı olup daha çok polifenoller ve flavonoidler halinde bulunurlar (Rice-Evans, 1997). Doğal antioksidanlar, doğal olarak tüketilen gıdalarla günlük diyetle veya takviye edici gıdalarla vücuda alınmaktadır. Bitkisel kaynaklarda bulunan antioksidanların canlı organizmaların savunma sistemine olan etkileri dışında gıda sanayinde de önemli derecede yararlılıkları bulunmaktadır. Bu amaçla besinlerin bozulmasını önlemek, raf ömrünü artırmak, lipitlerin ve vitaminlerin parçalanmasını engellemek ve besin rengini korumak için kullanılan antioksidanlar önemli katkı maddeleridir.

Bir canlının büyüyüp gelişebilmesi için günlük alınması gereken aminoasitleri, vitaminleri ve mineral maddeleri yeterli miktarlarda ve denge içinde bulunduran yegâne doğal bir besin maddesi olan polenin yapısında bulunan fenolik bileşenlerin ve

flavonoidlerin birer potansiyel antioksidan olduğu bilinmektedir (Silva vd., 2006). Bu ajanların kanser ve çeşitli hastalıkların oluşumunda rol alan oksidan yapıları yok ederek, antioksidan enzimlerin aktivitelerini stimüle ederek, intraselluler oksidatif stresi azaltarak, nitrik oksit ve peroksit radikalleri de direkt olarak temizleyerek etkili olabilmektedirler (Moreira vd., 2008; Eraslan vd., 2008; Jo Bright vd., 2008).

Karaciğer hemen hemen tüm metabolik yolların, biyosentez reaksiyonlarının ve tüm zehirsizleştirme (detoksifikasyon) mekanizmalarının cereyan ettiği çok önemli bir organ olup anatomik lokalizasyonu, fizyolojik ve biyokimyasal rolü nedeniyle toksik madde ve ilaçlara sıkça maruz kalmaktadır. Karaciğer’de hasar dahil, çeşitli patolojik tablolara yol açan 600’den fazla maddeden biri de karbon tetraklorür (CCl₄)’dür (Vural, 1984; Van vd., 1993; Yao vd., 1994; Güven vd., 2003; Wu and Cederbaum, 2003; Wang vd., 2005; Üstündağ, 2005). Vücuda alınan hemen hemen tüm kimyasal ajanının zehirsizleştirildiği yegane organ olan karaciğer dokusunun çeşitli nedenlerden dolayı hasarını tedavi edecek herhangi bir ilaç bulunmamaktadır. Sentetik ajanlardan farklı olarak doğal ürünlerle tedaviye cevap verdiğiinden dolayı karaciğer hasarının engellenmesinde doğal ürünler üzerine çalışmalar yoğunlaşmıştır. Bu nedenle bazı bitkisel ekstraktların hasarı önlemede rol oynadığı bilinmektedir.

Apolar karaktere sahip CCl₄ deneysel olarak karaciğer doku hasarı oluşturulmasında yaygın olarak kullanılır ve mitokondriyal monooksijenaz (P450-2E1) sistemince metabolize edilir. CCl₄’e bağlı karaciğer hasarında meydana gelen lipid peroksidasyonu oldukça önemlidir (Parola vd., 1996; Nordberg ve Arner, 2001; Necas vd., 2005), çünkü bu hasara bağlı olarak ilerleyen süreç sonunda karaciğer fibrozisi ve siroz oluşabilir. Siroz; karaciğerin anatomik yapısının fibrozis ve nodülleşme sonucu bozulmasıdır ve ilerleyici bir kronik karaciğer hastalığıdır (Sherlack ve Dooley, 1987). Siroz, çoğunlukla kronik alkolden kaynaklanır, ancak CCl₄ zehirlenmesi, enfeksiyöz hepatit gibi virüs hastalıkları ve safra kanallarının enfeksiyonu gibi durumları takiben de siroz görülebilir (Güzel, 1996).

Arı ürünleri genellikle elde edildikleri bitki florasına bağlı olarak gruplandırılırlar ve biyolojik aktiviteleri üretildikleri bitki florasına bağlı olarak değişim gösterirler. Kestane balının, ülkemizde ve dünyada biyolojik değeri yüksek ballardan biri olduğu bilimsel olarak bildirilmektedir. Bu nedenle kestane balının üretilmesinde etkin olan kestane polenin de yüksek biyolojik değere sahip olabileceği düşünülmektedir. Kestane (*Castania sativa*) poleni kestane ağaçlarının yoğun olarak bulunduğu bölgelerde, arıların topladığı polenlerdir. Aynı ismi taşıyan balların polifenol içeriği bakımından diğer

ballardan ayırt edici oranda yüksek bulunması (Al-Mamary vd., 2002; Aljadi ve Kamaruddin 2004; Beratta vd., 2005; K  c  k vd., 2007; Sarıkaya vd., 2009) nedeniyle biyoaktif özelliklerinin yüksek olması beklenen kestane poleni çalışma dokusunun temel materyalini oluşturmuştur. Bununla birlikte çalışmada kullanılacak karışık arı polenlerinin palinolojik değerlendirmesi yapılarak baskın poleni de belirlenecektir.

Çalışmanın ilk aşamasında kestane polenin kimyasal özellikleri ve biyoaktif özellikleri ortaya çıkarılacaktır. Devamında taşımış olduğu fenolik bileşikler ve diğer biyoaktif özellikleri göz önüne alınarak deneysel karaciğer sirozu oluşturulmuş sıçanlarda besleme süresinde iyileştirme etkisi (*in vivo* olarak) incelenecektir. Ayrıca sıçanlara karaciğer hasarında etkili olduğu bildirilen eksojen antioksidanlardan silibinin de verilerek iyileştirme etkileri birbiri ile karşılaştırılacaktır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Apiterapi

Arıcılık ürünlerinin tedavi amacıyla kullanılması olarak adlandırılan “apiterapi” çok eski zamanlardan beri kullanılmakla birlikte, bu konuda araştırmaların yapılması ve apiterapi merkezlerinin kurulmasıyla günümüzde de önemini korumuştur. Son yıllarda dünyada özellikle Çin’de apiterapik yöntemlerin kullanımı hızlı bir gelişme göstermiştir. Bal, polen, propolis, arı sütü, arı zehri ve balmumu birer arı ürünleri olup, kullanma yöntemleri yöresel ve alışlagelmiş şekillerde uygulanmaktadır. Yüksek besin değerine sahip olan balın, çeşitli enfeksiyonlardan ileri gelen yaraların ve yanıkların tedavisinde önceden beri kullanıldığı bildirilmektedir. Kovanların korunması amacıyla arıların doğadan topladıkları propolisin kuvvetli antibiyotik özellik taşıdığı ve bu amaçla ağız yaralarından çeşitli eklem ağrılarına kadar pek çok şekilde kullanıldığı bildirilmektedir. Ülkemizde ise arı ürünlerinin sağlığa faydalı olduğu konusunda son yıllarda hızlı bir şekilde farkındalık oluşmakla beraber, bu ürünlerin kimyasal özellikleriyle tıbbi özellikleri arasındaki ilişkiyi ortaya çıkarmaya yönelik çalışmalar yeterli seviyeye ulaşamamıştır.

Arıcılık ürünlerinden bal, bal arılarının çiçek nektarlarını, bitkilerin veya bitkiler üzerinde yaşayan bazı canlıların salgılarını topladıktan sonra, kendine özgü maddelerle karıştırarak değişikliğe uğratarak, bal peteklerine depoladıkları tatlı madde olup (Türk Gıda Kodeksi Bal Tebliği, 2000) apiterapide kan dolaşımını kolaylaştırıcı, uykusuzluk ve sinirlilik durumlarında sakinleştirici, bakteriyel hastalıklara, yara ve yanıklara (Al-Ammary, vd., 2002; Orhan, vd., 2003), sindirim sistemi hastalıklarına (White, 1979; Al Somai vd., 1994; Schmidt 1997; Molan 1997; Şahinler, 2000) ve üst solunum yolu enfeksiyonlarına karşı tedavi edici olarak kullanılmaktadır.

Polen (çiçek tozu), bitkinin erkek gametini dişi gamete taşıyan bir yapıdır (Erdoğan ve Dodoloğlu, 2005). Apiterapide polen enfeksiyon hastalıkları ve mide kanaması gibi birçok hastalığın tedavisinde (Williams, 1994) ve yüksek rakıma bağlı kusma sendromunun önlenmesinde tıbben kullanılmaktadır (Linskens ve Jorde, 1997).

Polen, polen alerjisi olan kişilerin tedavisinde ve tıpta prostat hastalıklarının tedavisinde kullanılmaktadır (Mizrahi 1997; Campos vd. 1997; Schmidt, 1997).

Propolis (arı zankı) bal arılarının bitki tomurcuk ve filizlerinden topladığı reçinemi maddenin genel ismidir. Propolis ismi yunanca savunma anlamına gelmekte olup arıların ve kovanın korunmasından sorumludur. Kovan girişinde bulunan propolis arıların ayaklarının temizlenmesinde bir çeşit dezenfektan olarak, kovan tahtalarının aralarında bulunan propolis ise kovanın ısısının korunmasında rol oynar. Ham propolisin tam bileşimi kaynağa göre değişir (Chemid, 1996). Propolis tarafından iyileştirilebilen hastalıklar arasında nefes darlığı, egzema, göz enfeksiyonları, boğaz enfeksiyonları, ülser ve böbrek enfeksiyonları yer alır (Hill, 1977). Propolisin antibiyotik, antifungal, antiviralözelliklerinin olduğu ve bol miktarda flavanoid içerdiği için antioksidan etkisinin baldan ve BHT den 2 kat daha fazla olduğu bildirilmiştir (Russo, 2004). Biyolojik etkinliğinin yüksek olması nedeniyle, propolisli ürünlerin üretiminde bir hayli artış vardır. Propolisli pastiller, diş macunları, güneş koruyucuları, çiklet ve çikolatalar bu ürünlerin birkaçıdır (Sarıkaya vd., 2009).

Arı sütü, 5 ila 15 günlük işçi arıların alt çene (mandibular) ve boğaz (hypopharyngeal) bezlerinin salgılarından birisi olup ana arı gözlerine asılan larvaların beslenmesine yarayan, ancak ana arı gözlerine aşılama yapıldıktan sonra 36-48 saat zarfında toplanan pelte kıvamında, kemik renginde, kendine has bir kokuya ve yakıcı bir tada sahip bir gıda (TSE, Arı sütü, 1989) olup farmakolojik olarak kan damarlarını genişletici ve kan basıncını düşürücü (Matsui vd., 2002; Shimoda vd., 1978), yangı giderici (Fujii vd., 1990), tümör önleyici (Tamura vd., 1987), yorgunluk giderici (Kamakura vd., 2001), antialerjik (Kataoka vd., 2001), antioksidatif (Nagai vd., 2001), antibakteriyel (Yatsunami ve Echigo, 1985) ve bağışıklık sistemini uyarıcı (Heidrick, 1984) gibi birçok etkiye sahiptir. Ayrıca, arı sütü gelişme ve büyümeyi hızlandırıcı, hormonal düzenleyici, cinsel gücü ve döl verimini artırıcı olarak da kullanılmaktadır (Nagai vd., 2001). Arı zehri, arıların zehir torbasında oluşan ve içerisinde başlıca mellitin, apamin, MCD- peptidi, histamin, hyaluronidaz, fosfolipaz- A2 bulunan, keskin kokulu, acı tada, sarımtırak renkte, sıvı, hava ile temasında çabuk kuruyup kristalize olan bir maddedir (TSE, Arı zehiri tasarısı, 1989). Arı zehri romatizmal, gribal, ortopedik hastalıkların tedavisinde, bunların yanında mafsallı iltihabı, deri kanseri ve ekzemaya karşı kullanılmaktadır (Schmidt, 1997; Cherbuliez, 1997; Şahinler, 2000).

Balmumu, arıların peteklerini yapmak için karın halkalarında (segmentlerde) bulunan balmumu bezlerinden salgıladıkları yumuşak sarı veya daha koyu madde olup apiterapide

bazı merhem türü ilaçların yapımında, kozmetikte krem ve dudak boyası yapımında ve dişçilik alanında kullanılmaktadır (Krell, 1996; Schmidt, 1997).

İçinde bulunduğumuz asır doğala yönelimin, doğal yaşam ve doğal beslenmenin ön planda olduğu bir dönemdir. İnsanlar beslenme faaliyetini artık çok yönlü olarak dikkate almakta bazı hastalıklardan korunmak ve/veya tedavi amaçla yerine getirmektedir. Arı ürünleri olan bal, bal mumu, polen, propolis, arı sütü ve arı zehri gibi ürünlerin çeşitli tedavi edici özellikleri yıllardır bilinmekle birlikte ayırma ve analiz tekniklerinin gelişmesi ile apiterapik yönleri daha da açığa çıkmaktadır.

2.2. Polen

Polenler çiçekli bitkilerin erkek organlarında meydana gelen üreme üniteleri olup (Krell,1996) bitkinin erkek gametini (bu nedenle erkek DNA) dişi gamete taşıyan bir yapıdır (Şekil 1) ve mükemmel bir gıda olarak da kabul edilmektedir (Krell,1996). Polenler bu taşıma sırasında erkek gametini çok iyi korumuş, sıkıştırılmış binlerce mikroskobik polen taneleri (genellikle 15-100 mikron) içermektedir. Bal arılarının larva sonrası yavru yetiştirmesinde ve gençlik dönemlerinde dokularının, kaslarının, salgı bezlerinin ve diğer organlarının yeterince gelişmesi için gerekli olan protein, lipit, sterol, vitamin ve minareleri sağlayan en önemli besin maddesidir (Konar, 2010; Erdoğan ve Dodoloğlu, 2005; Schimidt,1997; Pernal ve Currie,2001; Calderone ve Johnson, 2002; Dobson ve Peng,1997). Polenler arılar tarafından bitkilerden toplandığı zaman genellikle bir miktar nektar ile veya kusarak çıkardıkları bal ile karıştırılarak yapışkanlık kazandırılır ve pelet (topak) halini alması sağlanır. Polenlerin kısmen tatlı olması da bu sebepten kaynaklanır. Bazı polen tipleri yapılarında nektar ve bal bulunmaksızın zengin yağ içeriğine de sahiptir. Yiyecek toplayan bir balırsı 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 (Şekil 1, Şekil 2).



Şekil 1. Arılar tarafından toplanan çeşitli renkteki polenler
(Foto: F. Intoppa; Krell, 1996)

Arılar tarafından peteklerde saklanan ve arı ekmeği, arı yemeği olarak da adlandırılan kısmen fermente olmuş polen karışımı farklı bir kompozisyona ve besinsel içeriğe sahip olup bal arısı larvalarına veya arı sütü üreten işçi arılara verilen bir gıdadır.

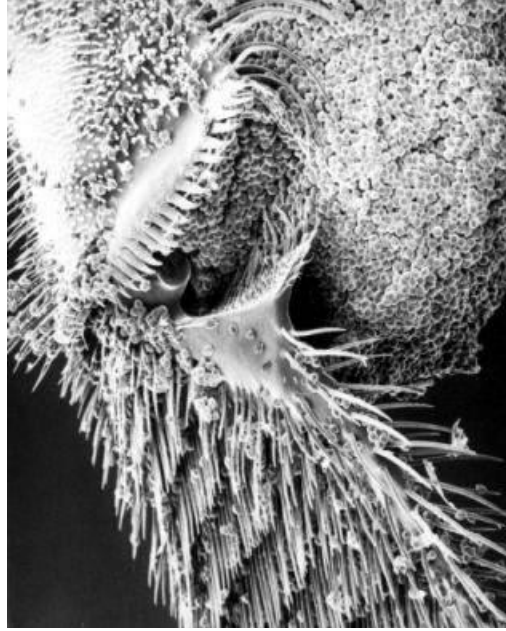
Gıda olarak kullanılan polenler arıcılar tarafından kovanlara ilave edilen polen tuzakları ile toplanmaktadır. Bu polenler arıcılar tarafından kurutularak veya dondurularak muhafaza edilir, yerine göre satılarak, yerine göre de mevsim dışında arıların beslenmesinde ve kek üretiminde kullanılmaktadır.



Şekil 2. Zambak çiçeği ve polenleri (Krell, 1996)

Polenlerin insanlar tarafından yüzyıllardır gıda olarak tüketildikleri bilinmektedir. Bu anlamda Babillerin kutsal kitabında, diğer dini kitaplarda ve Çin yapıtlarında bu konuya dair bilgiler bulunmaktadır (Elkins, 1996).

Polen tuzakları tarladan dönen arıların güçlükle geçebildikleri bir elekten oluşan, kovan girişine veya altına yerleştirilen plastik veya metalden yapılmış düzeneklerdir. Bir arı iki ayağında iki polen peleti (topak) taşıyabilir. Vücudunda polen taşıyan arıların arka bacaklarındaki (Şekil 3) polen tanelerinin bir kısmı arılar kovana girebilmek için levhadaki deliklerden geçerken bırakılmak zorunda kalır ve arıcalar bu şekilde polenleri toplarlar (Akyol ve Korkmaz, 2006; Çakmak vd., 2002).

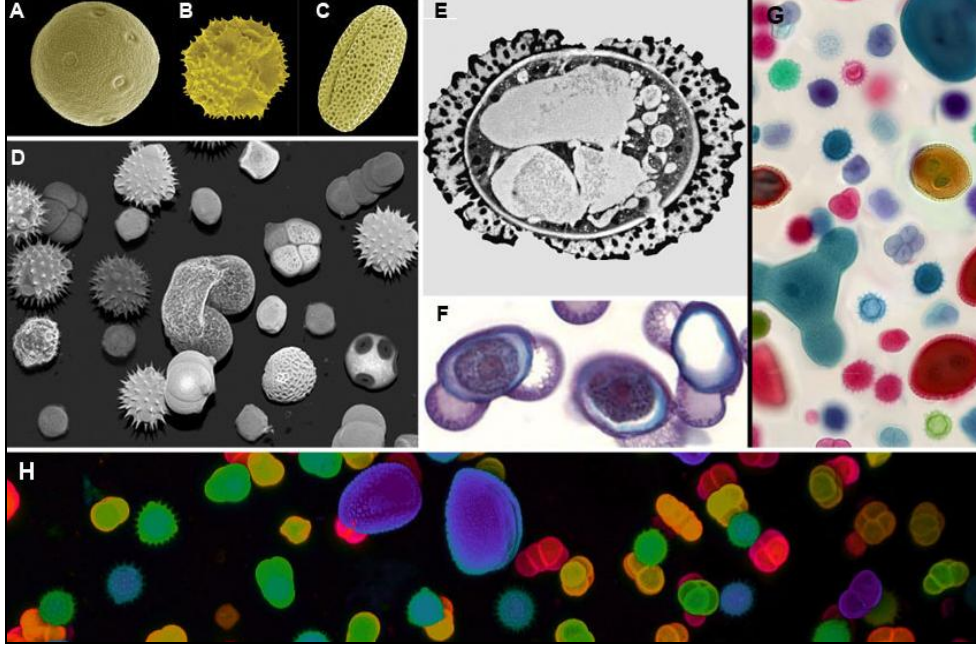


Şekil 3. Arıların arka bacağı, elektron mikroskobu görünümü (Fotoğraf: R.C. Davis; Krell, 1996)

Polenler doğrudan tüketildiği gibi bal, arı sütü, süt gibi gıdalarla karıştırılmak suretiyle de tüketilmektedir.

Polen taneciklerinin mikroskopik görünümü ve kimyasal yapısı bitki florasına bağlı olarak değişim gösterdiği için bal ve diğer arı ürünlerinin hangi flora'ya sahip olduğunu anlamak için bir marker olarak da kullanılırlar (Talpay, 1985; Bogdanov vd., 1987; Persano ve Piro, 2004). Aynı zamanda bu orjinden kaynaklanan fark polenin bileşiminin de

farklı olması sonucunu doğurur. Şekil 4'de farklı bitki kaynaklı bazı polenlerin mikroskopik görünümü verilmiştir (URL-2).



A: Sinirliot (*Plantago lanceolata*); B: Dandelion çiçeği (*Taraxacum* sp.); C, E: Taksokutu (*Arabidopsis thaliana*); D, G, H :Karışık Polenler; F: Sarıçam (*Pinus sylvestris*)

Şekil 4. Değişik tipteki polenlerin mikroskopik görünümü

Literatürde polenin içeriğine ait bazı parametrelerin ortalama değerlerine dair veriler verilmiş olmasına rağmen, polenin fizikokimyasal özellikleri ve biyoaktif özellikleri orjinine bağlı olarak oldukça farklılıklar göstermektedir. Bu nedenle polenin standart bir bileşiminin ortaya çıkartılması oldukça zordur. Bununla birlikte polende temel amino asitler, 10 farklı mineral madde, B grubu vitaminlerinin tümüne ek olarak C, D, E vitaminleri, doğal hormon, enzim, koenzim, pigment, karbohidrat ve fermentler bulunduğu bildirilmiştir (Ötleş, 1995; Stanley ve Linskens, 1985; Karataş vd., 2000; Orzáez Villanueva vd., 2002).

Şimdiye kadar çeşitli polen türleri üzerine bazı bilimsel çalışmalar bulunmaktadır. Bu çalışmaların bir kısmı kimyasal içeriği üzerine bir kısmı mikroskopik şekilleri üzerine ve bitki florasını gösteren sistematik üzerine analizler olup (Krell, 1996; Talpay, 1985; Bogdanov vd., 1987; Persano Oddo ve Piro, 2004; Ötleş, 1995; Stanley ve Linskens, 1985; Karataş vd., 2000; Orzáez Villanueva vd., 2002), bir kısmı da *in vitro* antioksidan aktivite çalışmalarıdır. Krell (1996) yaptığı çalışmada arıların topladıkları polenlerin

ortalama %7,5-40 protein, %15-50 karbohidrat ve %15 -50 arasında değişen ve oldukça yüksek miktarda nişasta ihtiva ettiğini ifade etmiştir. Basim vd. (2006) de yaptıkları *in vitro* çalışmada polen ve propolis metanolik ekstraktlarının pek çok patojenik bakteriye karşı antibakteriyal aktivite gösterdiklerini rapor etmiştir. Yine Medeiros vd. (2008) de sıçanlarda fenolik polen ekstraktlarının anti alerjenik etkisinden bahsetmişlerdir. Almaraz-Abarca vd. (2007) de yaptıkları çalışmada Meksika florasına ait etanolik polen ekstraktlarının lipid peroksidasyonu inhibe edici ve polen ekstraktlarının HPLC analizinde bir flavanoid türeviden olan kalkonlarca zengin olduğunu göstermiştir. Polenin *in vitro* olarak lipid peroksidasyonunu engellediği, oksidan özelliğe sahip ve kanserojen olduğu bilinen pek çok serbest oksijen radikalini temizlediği (Silva vd., 2006; Šarić vd., 2008), yine *in vitro* bakteri çalışmalarında bakterileri öldürdüğü veya gelişimini engellediği (Basim vd., 2006) yapılan araştırmalarda belirtilmiştir. Ötleş (1995) çalışmasında arılar için toksik etkiye sahip bileşikler taşıyan polenlerin de bulunduğunu, bu toksin ve alkaloidlerden kendilerini korumak için polenlerin karışımını tüketme yoluna gittiğini ifade etmiştir. Bunların dışında literatürde polenlerle ilgili olarak antioksidan aktivitelerini ortaya çıkaran araştırmalara (LeBlanc vd., 2009) ek olarak, balların orijinlerini belirlemek üzere yapılan polen araştırmaları (Valencia-Barrera, 2000; Arvanitoyannis vd., 2005; Ouchemoukh, 2007; Cuevas-Glory vd., 2007) ve polenlerin aminoasit analizlerinin tespitine yönelik (Gonza'lez Parama's vd., 2006) çalışmalar mevcuttur. Son yıllarda kestane balı üzerine yapılan çalışmalar oldukça artış göstermektedir. Bunun önemli bir sebebi kestane balının polifenol içeriğinin diğer ballardan ayrıştırıcı oranda yüksek bulunmasından kaynaklanmaktadır (Kucuk vd., 2007; Sarıkaya vd. 2009; Al-Mamary vd., 2002; Aljadi ve Kamaruddin, 2004; Beratta vd., 2005; Nasuti vd., 2006).

Polen ekstraktlarının yapısında bulunan fenolik asitler ve flavonoidler, potansiyel antioksidan olarak, superoksit anyonları ve lipid peroksit radikallerini temizledikleri ve serbest radikaller ile ilişkili olaylarda hidrojenasyon veya kompleks yapılar oluşturarak okside edici ajanları stabilize edebildikleri gösterilmiştir (Silva vd., 2006). Polen, kanser ve çeşitli hastalıkların oluşumunda rol alan oksidan yapıları yok ederek, antioksidan enzimlerin aktivitelerini stimüle ederek, intrasellüler oksidatif stresi azaltarak, nitrik oksit ve peroksit radikalleri de direkt olarak temizleyerek etkili olabilmektedirler (Moreira vd., 2008; Eraslan vd., 2008; Jo Bright vd., 2008).

Değişik bitki çiçeklerinin tozları olan polenler suda ve yağda çözünen vitaminlerin tümüne yakınına içerirler (Karataş vd., 2000). Ticari arı polenlerinin B grubu vitaminleri

içeriğini tespit etmeye yönelik yapılan bir araştırma (Konar vd., 2010) tiamin klorür (B1), riboflavin (B2), nikotinik asit (B3), pridoksin klorür (B6), folik asit ve siyanokobalamin (B12) vitaminlerinin miktarları yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) ile tespit edilmiş ve arı polenlerindeki B1, B2, B3, B6, folik asit ve B12 vitaminlerinin miktarları $36,24 \pm 4,06 - 72,24 \pm 6,86 \mu\text{g.g}^{-1}$, $77,34 \pm 6,19 - 110,11 \pm 9,72 \mu\text{g.g}^{-1}$, $85,95 \pm 8,12 - 158,22 \pm 12,84 \mu\text{g.g}^{-1}$, $27,24 \pm 4,39 - 87,54 \pm 7,38 \mu\text{g.g}^{-1}$, $107,99 \pm 10,86 - 225,67 \pm 20,82 \mu\text{g.g}^{-1}$ ve $0,220 \pm 0,016 - 0,517 \pm 0,038 \mu\text{g.g}^{-1}$ arasında değiştiği gözlenmiştir. Ayrıca polen besin değeri bakımından, diğer tarımsal ürünlerle karşılaştırıldığında; domates, kabak, fasulye, elma, ekmeke ve ete göre daha fazla oranda protein, demir, tiamin, riboflavin, niasin içerdiği bildirilmiştir (Schmidt, 1997). Yapılan araştırma sonuçları polenlerin farklı vitamin içeriklerinin polenin toplandığı bitkinin türü, yetiştirme ortamı ile polenin toplanma ve ambalajlanmasındaki itinaya ve raf ömrüne göre farklı bulunduğu sonucunu ortaya çıkarmıştır (Karataş vd., 2000).

Apiterapide yoğun bir şekilde kullanılmasına rağmen polen tüketiminde bazen alerji, iştahsızlık, baş ağrısı, bulantı, kusma, karın ağrısı, ishal, kaşıntı gibi reaksiyonlar görüldüğü ve bazen anafilaktik şokun da görülebildiği bildirilmiştir.

Polenin insan ve hayvanları X ışınlarının zararlı etkilerinden koruduğuna dair verilere bilimsel çalışmalarda rastlanmaktadır (Schmidt ve Buchmann, 1992).

Polenin atletlerin kondüsyonu için gerekli gıdalar arasında önemli bir potansiyele sahip olduğuna dair yapılan çalışmalar (Linskens ve Jorde, 1997; Mahan, 1990; Erdemir vd., 2005) polenlerin organizmada metabolik etkilere sahip hormonları da bünyesinde bulundurduğunu göstermiştir.

Yine Karataş ve Şerbetçi (2008) çalışmalarında arı polenlerindeki adrenalin ve noradrenalin miktarlarını HPLC ile tespit etmiş; insan ve hayvanların metabolizmalarında sentezlenen adrenalin ve noradrenalinin birçok bitki hormonuna ek olarak arı poleninde de bulunduğunu göstermişlerdir.

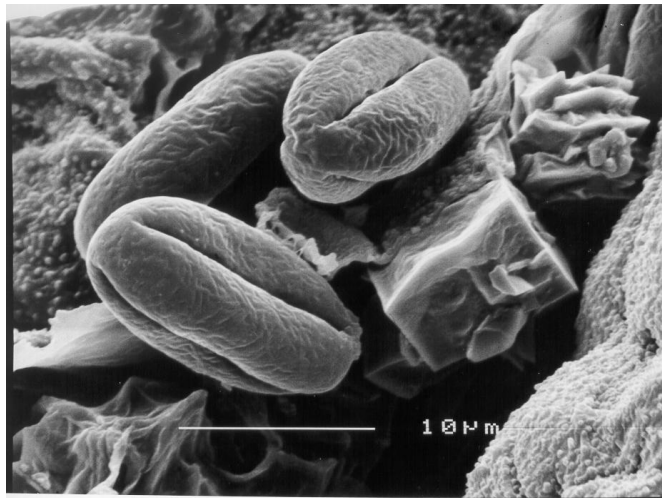
Polenler antimikrobiyal (antibakteriyel, antifungal, antiviral) özellikleri nedeniyle de ön plana çıkmaktadır. Bununla birlikte polenler sınırlı tür ve seviyelerde mikroorganizma içerebilir. Bunların bir kısmı bitki kaynaklı iken bir kısmı dışarıdan (elden, topraktan, kovandan, havadan, ambalajdan vs...) bulaşma kaynaklıdır. Polenlerin *Escherichia coli*, *Proteus*, *Salmonella* ve diğer koliform türlerine karşı etkili oldukları tespit edilmiştir. Polenlerin bu antimikrobiyal özelliği yapısında bulunan Quercetin, Mirisetin, Kaempferol

gibi bileşiklerden kaynaklanmaktadır (Bayrak, 2005; Liebelt vd., 1996; Snowdon ve Clier, 1996).

Bugün polenler antimikrobiyal etkileri nedeniyle birçok hastalığın tedavisinde işlenmemiş ham polen halinde kullanılabilirdiği gibi arı sütü, bal, soya ve vitamin E ilave edilerek elde edilen preparatları halinde kullanılmaktadır.

Özcan vd.(1999), *Alternaria alternata* ve *Fusarium oxysporium f. sp. Melonis*'in misel gelişimi üzerine arı polenin % 2 ve % 5 konsantrasyonlarındaki metanol ekstraktlarının inhibitör etkilerini araştırmış ve % 2'lik konsantrasyonun fungus gelişimine az, % 5'lik konsantrasyonunun ise dha çok etkili olduğunu rapor etmiştir (Özcan vd., 2003).

Kestane (*Castanea sativa*) kışın yaprağını döken geniş yapraklı ağaç türlerinden biridir. Türkiye'de yaygın olarak Karadeniz sahil kusağı boyunca yayılış gösterir. Ancak dar alanlı olarak son derece seyrek ve dağınık bir şekilde Batı ve iç Batı Anadolu bölümlerinde de bulunur. Kestane ağaçlarının yoğun şekilde bulunduğu bölgelerde yapılan arıcılıkta elde edilen arıcılık ürünleri (bal, polen, propolis vb...) kestane bal, polen ve propolisi olarak adlandırılır. Literatür araştırmalarında kestane (*Castanea sativa*) bal ve propolisi ile ilgili değişik çalışmalara rastlanmakta iken kestane poleni ile ilgili yapılmış detaylı çalışmaya rastlanmamıştır (Küçük vd. 2007; Sarıkaya vd. 2009; Al-Mamary vd., 2002; Aljadi ve Kamaruddin 2004; Beratta vd., 2005; Ulusoy vd., 2007; Sarıkaya vd., 2007; Bonaga ve Giumanini, 1986). Yapılan çalışmaların bir kısmı kestane polenin mikroskopik görünümüne dairdir (Şekil 5).



Şekil 5. Kestane polenin mikroskopik görünümü (URL-3)

2.3. Biyoaktif Özellikler

Gerek *in vivo* gerekse *in vitro* şartlar altında kimyasal ve biyolojik açıdan zararlı herhangi bir reaksiyon ya da organizma üzerinde kontrol edici etki gösteren, onu zararsızlaştıran/zararlı etkisini azaltan veya yok eden etkilerin hepsine biyolojik etkinlik, biyolojik açıdan etkin maddelere de biyolojik aktif maddeler veya biyoaktif maddeler denir. Doğada birçok biyoaktif özellik gösteren bileşik mevcuttur. Bu bileşiklerin büyük çoğunluğu bitkiler tarafından ikincil metabolizma ürünü olarak sentezlenmektedir. Bu metabolitlerin bir kısmı eczacılık endüstrisinde kullanılan etkin maddeler olan droglar haline dönüştürülüp tedavi amaçlı olarak kullanılmaktadır. Bitkisel kökenli droglar çok eski devirlerden beri hastalıklara karşı kullanılırken bitkilerde bulunan etkin bileşikler ve etki mekanizmaları hakkındaki bilgiler 19. yüzyılın ortasından sonra araştırılmaya başlanmıştır.

Bitkiler farmakolojik etkiye sahip sınırsız aromatik ve alifatik madde sentezleyebilme kabiliyetine sahip olup bunların çoğu fenolik bileşikler veya bunların oksijen ile substitüye olmuş halleridir. Çoğu durumda bu maddeler bitkilerin reaktif oksijen türlerine karşı savunma mekanizmasında, moleküler hasar oluşumuna karşı ve mikroorganizmalar, böcekler ve diğer zararlılar tarafından oluşturulacak hasara karşı görevlidir (Vaja vd., 1997). En iyi bilinen antioksidan madde olan askorbik asit bitkisel dokulardaki en önemli molekül olup, fotosentez ve aerobik proseslerin oksidan metabolitlerinden kaynaklanan oksidatif hasarlara karşı bitkileri korur (Smirnoff, 1996; Kolaylı vd., 2003). Ayrıca bitkilerce sentezlenen diğer biyoaktif özellik gösteren farmakolojik bileşiklerden bazıları glikozitler, organik asitler, tanenler, alkaloidler, sabit yağlar, uçucu yağlar, reçineli bileşikler, vitaminler ve antibiyotiklerdir (Ahıskalıoğlu, 2007).

Organik asitler; karbohidratların oksidasyonu ile oluşan organik moleküllerdir. Bitkilerde serbest veya tuzları halinde bulunup bitkiye ekşi tadı ile birlikte ve bitkinin, meyvenin tipik aromasını kazandırır. Meyve türlerinin kendilerine özgüllüklerinin bir indikatörüdür. Aynı zamanda gıdalarda doğal olarak bulunan organik asitlere ek olarak mikrobiyal yolla da organik asitler üretilir ve gıdalarda bulunurlar. Gıda fermentasyonunda kullanılan pek çok starter kültür bakterileri farklı karbohidratları laktik, asetik ve propiyonik asitlere ve çeşitli diğer yan ürünlere dönüştürürler. Bu yan ürünler sadece istenen lezzeti ya da gıdanın yapısını oluşturmaz. Pek çoğu özellikle zayıf organik asitler, istenmeyen mikroorganizmaların gelişimini engelleyerek stabilizasyon sağlarlar. Başlatıcı

(starter) kültür bakterileri tarafından üretilen organik asitler uygun gıdalarda mikrobiyal bozulma kontrolünde ve gıda güvenliğini artırmada önemli bir bariyer oluştururlar (Ray ve Daeschel, 1992; Sorrells vd., 1989).

Glikozitler; kimyasal olarak bir şeker molekülü ve buna ester bağı ile bağlanmış genin ya da aglikon adındaki bir molekülden oluşurlar ve enzim etkisi ile veya seyreltik asitlerin etkisiyle bileşenlerine ayrılırlar (Baydar, 2005). Bazı glikozitler farmakolojik etkiye sahip olup bu gün birçok ilacın etken maddesini oluşturmaktadır. Bazı glikozitlerin etkisi, hayvanların sindirim sistemindeki enzimlerin bu maddeleri hidrolize etmesi sonucu ortaya çıkmaktadır. Glikozitler hidrolize olunca toksik siyanidli bileşiklere dönüşmektedir (Çelik ve Bulur, 1996).

Uçucu yağlar, bitkilerden veya bitkisel droglardan, su veya su buharı destilasyonu ile elde edilen, oda sıcaklığında sıvı halde olan, fakat bazen donabilen, uçucu, kuvvetli kokulu ve yağimsı karışımlardır. Açıkta bırakıldıklarında, oda sıcaklığında bile buharlaşabildiklerinden "uçucu yağ", eter gibi uçtuklarından "eterik yağ"; güzel kokulu olmaları ve parfümeride kullanılmaları nedeniyle "esans" gibi isimlerle anılırlar. Uçucu yağlar, genel olarak üç yöntemle üretilirler. Bunlar, yağın kimyasal bileşimini ve tıbbi değerini etkilemektedir. Uçucu yağları elde etmede kullanılan başlıca yöntemler; destilasyon, süperkritik akışkan ekstraksiyonu ve presyondur. Bitkiye koku ve tat verirken, bazıları kinonlar ve tanenler gibi bitki pigmentlerini oluştururlar. Daha çok su buharı destilasyonu ve ekstraksiyon ile elde edilirler (Çalikoğlu vd., 2006).

Tanenler; bitki aleminde en yaygın olarak karşımıza çıkan, polifenol yapısında ikincil metabolitler olup yüksek yapılı bitkilerin pek çoğunda bulunan suda çözünebilen bileşiklerdir. Tıp, eczacılık, deri sanayinde yaygın olarak kullanılmaktadırlar. Tanenler; ellagitanenler, gallotanenler, kompleks tanenler ve kondense tanenler olmak üzere dört temel gruba ayrılırlar. Molekül ağırlıkları 500-20000 Dalton arasında değişmekte olup çok sayıda hidroksil grubu ve fonksiyonel grup içermekte ayrıca protein ve diğer makro moleküllerle birlikte çapraz bağlar oluşturabilmektedir. Tanenler; proteinler, mineraller, nişasta ve sindirim enzimleriyle kompleks oluşturarak gıdaların besleyici değerinde azalmaya neden olmaktadır (Ergezer ve Çam, 2008; Chung vd., 1998a; Chung vd., 1998b; Khanbabaee ve Ree, 2001). Ayrıca, polifenol oksidaz enziminin neden olduğu esmerleşme reaksiyonları nedeniyle gıda teknolojisi açısından da arzu edilmezler. Vitamin ve minerallerin yararlılığını olumsuz yönde etkilemektedirler. Tanen varlığında A ve B12 vitaminlerinin, ayrıca iki değerli demir iyonu ile kompleks oluşturarak da demirin

emilimlerini azaltmaktadır (Suschetet, 1975; Carrera vd., 1973). Tanenler, özellikle kondense tanenler, yaşamsal açıdan önem arz eden sindirim enzimlerinden pektinaz, amilaz, lipaz, proteolitik enzimler, β -galaktozidaz, selülaz ve tahılları fermente eden mikrobiyal enzimleri inhibe ederler. Gastrointestinal bölgede ise etkilerini proteinleri daha az sindirilebilir komplekslere dönüştürerek gösterirler. 1 mol tanenin 12 mol proteini bağlayabilme kapasitesi vardır. Tanen içeriği yüksek bazı gıdaların çok fazla tüketilmesinin bazı kanser türlerini tetiklediğine ilişkin çalışmalar mevcuttur (Chung vd., 1998). Ancak bu durumun yanı sıra belli oranlarda tanen içeriğine sahip pek çok bitkisel gıda kan basıncını düşürme, kanın pıhtılaşmasını hızlandırma ve serum lipit düzeyini düşürme gibi fizyolojik özellikler göstermektedir. Bahsedilen olumlu ve olumsuz bütün özelliklerin sergilenmesi tanenlerin cinsi ve dozajı ile alakalıdır. Tanenlerin antikanserojen, antimutajenik, antimikrobiyal ve antiviral özelliklere sahip olduğunu belirten pek çok bilimsel yayın mevcuttur (Ergezer ve Çam, 2008; Kono vd., 1998; Lee, 1992; Scalbert, 1991).

Alkoloitler; yapılarında azotlu bileşikler içeren, katı ve genellikle kokusuz, renksiz ve kristalize bileşiklerdir. Alkoloitler, bitkilerde bulunan metabolit ürünlerden olup bazik yapıdadır. Özellikle acı bakla gibi bitkilerde bulunurlar. Morfin, kodein, kafein, kokain ve atropin bu tür maddelerdir. Oksijen taşımayan alkoloitler (koniin, nikotin gibi) düşük sıcaklıkta sıvıdırlar. Pek az renkli alkoloit bilinmektedir. Bazı halde alkoloitler suda çözünmez (efedrin, koniin ve nikotin gibi bazı alkoloitler dışında) ancak polar olmayan organik çözücülerde (eter, kloroform, benzen v.s.) kolaylıkla çözünürler. Buna karşılık alkoloit tuzları suda kolaylıkla çözünürler, polar olmayan organik çözücülerde çözünmezler. Çok az bazı haldeki alkoloitler suda, alkoloit tuzları da organik çözücülerde çözünürler. Alkoloitler daha çok bitkinin özel bir kısmında (kök, kabuk, meyve, yaprak v.s.) toplanmıştır (Aksu, 1971; Baytop, 1974).

Vitaminler vücutta bir oranda sentezlenmeyen, yaşam için gerekli, çok küçük miktarlarıyla hücre metabolizmasında önemli tepkimeleri uyaran organik bileşiklerdir. Suda çözünen ve suda çözünmeyen vitaminler olarak iki sınıfa ayrılırlar. Daha çok koenzim olarak ve antioksidan aktivite için gerekli moleküller olup insan sağlığının korunması için elzemdir. Suda çözünen vitaminler: askorbik asit ile B vitaminleri olup; organik çözücülerde ve yağda çözünenler A vitamini, D vitamini, E vitamini ve K vitamindir (Samur, 2006; Akkuş, 1995).

Bitkilerdeki hastalıkları tedavi edici özellik taşıyan etken maddeler bitkilerin, çiçek, yaprak, tohum, meyve, kök, gövde, kabuk gibi bölümlerine bulunabilir. Bitkilerin tozları olan polenlerde önemli miktarda bu biyolojik aktif maddelerden içerirler.

Bitkisel tıbbın önemli oranda kullanıldığı günümüzde bitkisel ekstrelerin aynı zamanda gıda olarak kullanımı da yaygındır. Bitkisel ilaçların kullanımı daha çok uzak doğuda, Hindistan, Çin ve Japonya da yaygın olup, Avrupa’da bitkisel ilaçları araştırma ve destekleme amacıyla kurulmuş “European Societies Cooperation of Phtotherapy (ESCOP) birliği mevcuttur. Dünyada son yıllarda bitkisel amaçlı yapılan çalışmaların yayımlandığı bilimsel dergilerin sayısı da hızla artmaktadır (Baytop, 1999; Baytop, 2001).

Bir bitkisel ekstrenin veya aktif bileşiğin biyolojik etkinlik testleri antioksidan aktivite, serbest radikal giderici aktivite, antitümoral, antikanserojen, antifungal, antibakteriyal, antiviral, antiinflatuar, antiherbisit ve anti-insektisit gibi etkilerine bakılarak yapılır (Russell, 2007; Bakkali, 2008).

Yukarıda özet halinde bahsi geçen biyoaktif bileşiklere ilave olarak aşağıda biyoaktif özellik gösteren temel madelere de değinilmiştir.

2.3.1. Antioksidanlar

Antioksidanlar, serbest radikalleri nötralize ederek oksidatif hasarı engelleyen, yavaşlatan veya durduran savunma sistemleri ve bileşiklerdir. Antioksidanlar endojen (organizma tarafından sentezlenen) ve eksojen (dışarıdan besinlerle alınan) kaynaklı olmak üzere başlıca iki ana gruba ayrılabilirdiği gibi; serbest radikalın meydana gelişini önleyenler ve mevcut olanları etkisiz hale getirenler şeklinde de sınıflandırılırlar (Halliwell, 1990; Halliwell vd., 1992). Hücre dışında ve hücrede farklı organellerde yerleşerek savunma mekanizmasında rol oynayan antioksidanlar; enzimatik yapıda olabilecekleri gibi non-enzimatik yapıda da olabilirler (Jerry vd., 2000).

Sentezlendiği organizmada etki gösteren antioksidanlara endojen antioksidanlar adı verilir. Enzimatik antioksidanlar, hücrenin çeşitli organellerinde etki gösteren süperoksitdismutaz, katalaz, glutatyon peroksidaz, glutatyon redüktaz, Glukoz-6-fosfat dehidrogenaz gibi enzimlerden oluşurlar. Çeşitli metal iyonlarını bağlama, serbest radikalleri yakalama, hapsedme ve süpürme gibi etkilere sahip glutatyon, bilirubin, ferritin, seruloplazmin ve ürik asit gibi enzimatik olmayan antioksidanlar da mevcuttur. Eksojen antioksidan ise daha çok bitkiler tarafından sentezlenen çeşitli vitamin ve fenolik maddeler

olup dışarıdan organizmaya alınıp etkinlik göstermektedirler (Jerry vd., 2000; Kolaylı vd., 2003, Kolaylı ve Keha, 1999).

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

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

Antioksidan ajanlar, oksidan moleküllere karşı etkilerini dört yolla göstermektedirler (Boyunağa ve Çelik, 1996):

1) Süpürücü etki göstererek: Oluşturdukları etki ile yeni radikal oluşumunu engelleyip; oluşmuş olan radikalleri daha az zararlı hale getirirler. Bu gruba örnek olarak süperoksit dismutaz, glutatyon peroksidaz, katalaz gibi enzimler; ferritin, serüloplazmin ve metallotionein gibi metal bağlayıcı proteinler verilebilir.

2) Giderici etki göstererek: Oksidanlarla etkileşip onlara bir hidrojen aktararak aktivitelerini inhibe eden bileşiklerdir. β -karoten, vitamin C ve vitamin E bu tür etkiye örnektir.

3) Zincir kırıcı etki göstererek: Zincirleme olarak devam eden reaksiyonları belli yerlerinden kırarak, oksidan etkiyi durdururlar. Bunlara örnek olarak bazı vitaminler, mineraller, hemoglobin, ürik asit, bilirubin ve albümin verilebilir.

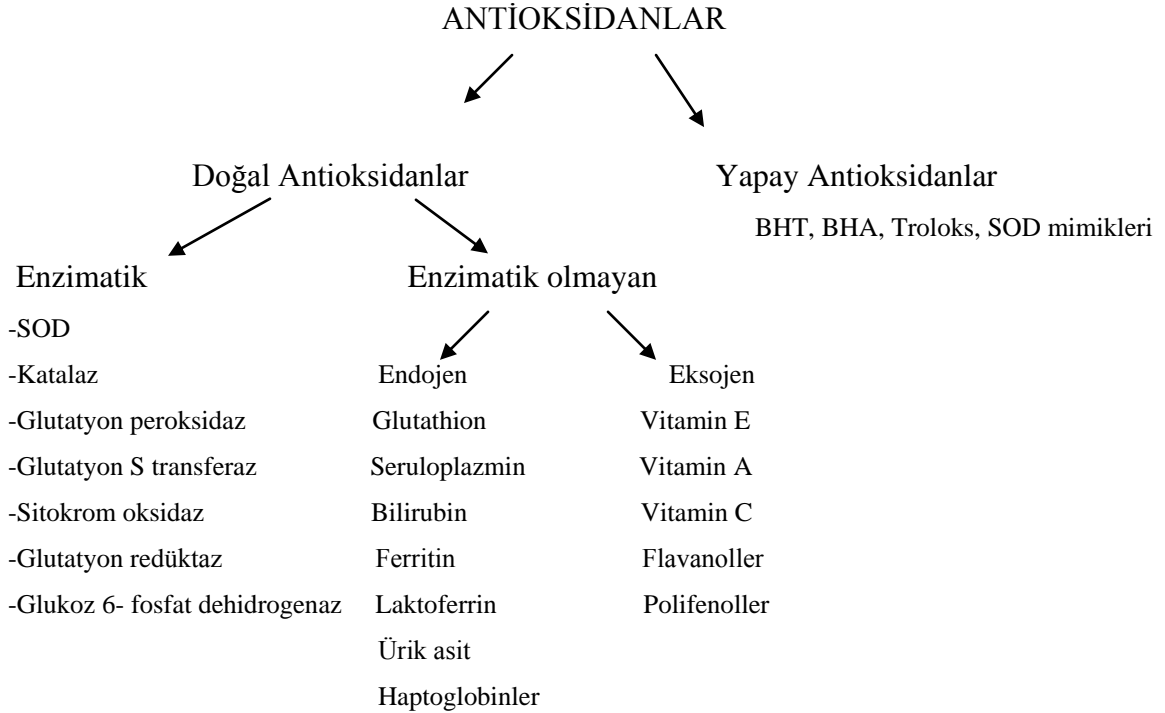
4) Onarıcı etki göstererek: Bu gruba örnek olarak DNA tamir enzimleri ve metiyonin sülfoksit redüktaz verilebilir.

2.3.1.1. Antioksidanların Sınıflandırılması

Şekil 6'de antioksidanların toplu olarak sınıflandırılması görülmektedir. Antioksidanlar, endojen kaynaklı ve eksojen kaynaklı antioksidanlar olmak üzere başlıca 2 gruba ayrılır Aerobik organizmalarda serbest oksijen radikallerinin yapmış olduğu hasarı önlemeye yardım eden enzimatik ve nonenzimatik savunma sistemleri vardır.

Vücuttaki fizyolojik aktivitenin doğal ürünü olan serbest radikalleri, organizma doğuştan kazandığı çok hassas bir donanımla oksidan-antioksidan denge olarak tanımlayabilecek bir çizgide tutmaya çalışır. Oksidanlar ve antioksidanlar arasındaki bu dengenin özellikle oksidanlar lehine bozulması membran lipitleri, proteinler ve DNA gibi hücrenin önemli yaşamsal yapılarında bütünlüğün bozulmasına ve canlıda patolojik olayların gelişmesine yol açar.

Antioksidan savunma; radikal metabolit üretiminin önlenmesi, üretilmiş radikallerin temizlenmesi, oluşan hücre deformasyonunun onarılması, sekonder radikal üreten zincir reaksiyonlarının durdurulması ve endojen antioksidan kapasitenin artırılması olarak tanımlanan beş değişik şekilde yürür (Akkuş, 1995).



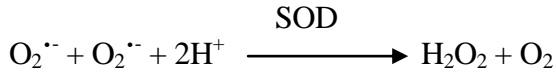
Şekil 6. Antioksidanların sınıflandırılması

2.3.1.1.1. Enzimatik Yapıdaki Antioksidanlar

Süperoksit dismutaz (SOD), Katalaz (KAT), Glutasyon peroksidaz (GSH-Px), Glutasyon redüktaz ve Glukoz 6- fosfat dehidrogenaz bu savunma sistemlerinin başlıcalarıdır (Groot,1994).

2.3.1.1.1. Süperoksit Dismutaz (SOD; EC 1.15.1.1)

Süperoksit dismutaz 1968 yılında oksijenli solunum yapan canlılarda Mc. Cord ve Fridovich tarafından belirlenmiştir. Bu enzim; süperoksitin, hidrojen peroksit ve moleküler oksijene dönüşümünü katalizler. Hidrojen peroksit daha sonra glutatyon peroksidaz ve katalaz enzimi aracılığı ile etkisiz hale getirilmektedir. Hücre bölünmelerindeki süperoksit düzeylerini kontrol etmede önemli rol oynayan bir metalloenzimdir (Fridovich, 1983).



İnsanda SOD'nin iki tipi bulunmaktadır. Bunlar, sitozolde bulunan dimerik, Cu ve Zn ihtiva eden izomer (Cu-Zn SOD) ile mitokondride bulunan tetramerik Mn ihtiva eden izomerlerdir (Mn SOD). Genel olarak hücrede bol bulunan izomer sitozolik Cu-Zn SOD' dir (Helle vd., 1997).

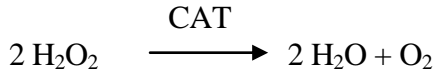
İki reaktif oksijen türünü, radikal olmayan moleküllere dönüştürmesi nedeniyle antioksidan sistemin önemli öğelerinden birisidir. Oksijen kullanımı yüksek olan dokularda SOD aktivitesi fazladır ve doku pO₂ artışıyla artar. Buna karşılık hücre dışı sıvılarda SOD aktivitesi çok düşüktür. Katalaz ve Glutatyon Peroksidaz'dan farklı olarak serbest radikali substrat olarak kullanır. pH'nın sitozolik ve mitokondriyal SOD'ın aktiviteleri üzerine olan etkisi farklıdır. pH 7'de her ikisi de aktiftir. Fakat Cu-Zn SOD'ın aktivitesi pH 5.5-10 aralığında değişmezken; Mn-SOD pH 7'nin üzerine çıktığında aktivitesini kaybeder (Harris,1992; McCotd ve Fridovich, 1978; Masaki vd., 1988).

SOD gerçekte detoksifiye edici bir enzim değildir. Çünkü ürünü olan H₂O₂ toksik bir ajandır. Ancak bu reaksiyon reaktif oksijen radikallerinin detoksifikasyonuna giden yolun ilk basamağıdır. İkinci basamak katalaz ve glutatyon peroksidaz enzimleri tarafından H₂O₂ 'in suya dönüşmesini katalizler (Harris, 1992).

Süperoksit, hücre zarlarının hidrofobik ortamlarında daha uzun ömürlü ve çözünürlüğü daha fazladır. Zar fosfolipidleri nedeniyle hücre zarı yüzeyleri daha asidiktir ve süperoksit burada daha kolayca bir proton alarak hidroperoksit radikalini (HO₂') oluşturur. Bu radikal de çok reaktif olup, hücre zarlarında lipid peroksidasyonunu başlatabilir ve tokoferol gibi antioksidanları oksitleyebilir.

2.3.1.1.1.2. Katalaz (CAT: E.C 1.11.1.6)

Sumer ve Dounce tarafından 1937'de kristalize halde saflaştırılmıştır. Çok yaygın bir şekilde hayvan, bitki ve mikroorganizmalarda mevcuttur. Biyolojik ve biyokimyasal sistemlerde katalaz antioksidan etkiye sahip bir enzim olup toksik ve yükseltgen etkiye sahip hidrojen peroksidi hücrelerden uzaklaştırmada önemli rol oynar (Aydemir ve Kuru, 2003). Katalaz 4 tane hem grubu bulunduran hemoproteindir. Her alt birim ayrıca bir molekül NADPH içerir. Bu molekül enzimin kararlılığında rol oynamaktadır. Enzim sitokrom sistemi içeren tüm oksijenli solunum yapan hücrelerde mevcuttur. Katalaz esas olarak peroksizomlarda olmak üzere endoplazmik retikulum ve sitozolde yoğundur. Aktivitesi; karaciğer, böbrek, miyokard, çizgili kaslar ve eritrositlerde yüksektir. Glutatyon peroksidazın H_2O_2 'e karşı Km değeri katalaza göre daha düşüktür. Yani düşük konsantrasyonlarda H_2O_2 'i glutatyon peroksidaz parçalar, yüksek konsantrasyonlarda ise katalaz aktivite kazanır. Görevi, hidrojen peroksiti oksijen ve suya parçalamaktır. Peroksidaz aktivitesine sahip oluşuna ek olarak; bu enzim bir molekül hidrojen peroksiti elektron verici bir substrat olarak, diğerini de oksidan veya elektron alıcısı olarak kullanabilir (Akkuş, 1995).

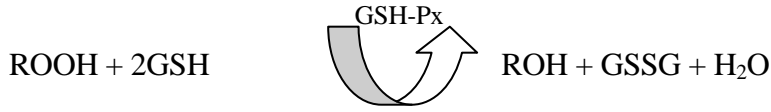


Katalazın indirgeyici aktivitesi hidrojen peroksit ve metil, etil hidroperoksitleri gibi küçük moleküllere karşıdır. Büyük moleküllü lipid hidroperoksitlerine etki etmez (Jenkins ve Tengi, 1981).

2.3.1.1.1.3. Glutatyon Peroksidaz (GSH-Px; EC.1.11.1.9) ve Glutatyon Redüktaz (GR; EC.1.6.4.2)

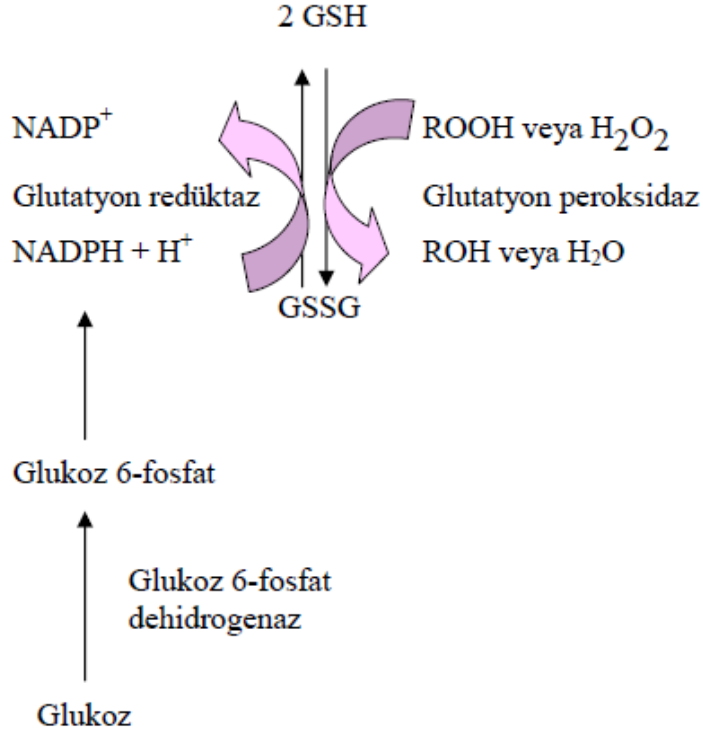
GSH-Px, hücrede H_2O_2 'nin temizlenmesinden sorumlu iki enzimden birisidir. H_2O_2 'in H_2O 'ya redüksiyonunu katalizler, aynı zamanda organik hidroperoksitleride parçalar. Hücre içi ortamın en önemli antioksidan molekülü olan redükte glutatyonun antioksidan savunma sisteminde görev almaktan başka ksenobiyotiklerin zehirsizleştirilmesi, aminoasitlerin transportu, proteinlerdeki sülfidril gruplarının redükte halde tutulması, bazı enzimatik reaksiyonlarda koenzim görevi görmesi gibi birçok fizyolojik fonksiyonu da vardır (Aktaş, 2005; Sözmen, 2002;

Esterbauer vd., 1992; Arrick ve Nathan, 1984). Lipid peroksidlerini daha az toksik olan yağ asitlerine indirgerken, glutatyonu da kofaktör olarak kullanır. Bu nedenle aktif merkezinde selenosistein bulunan GSH-Px aktivitesinin devamı için Glutatyon'un belli düzeyde olması gerekir (Devay, 2008; Akkuş,1995; Basaga, 1990; Fantone ve Ward, 1985).



Glutatyon disülfid (GSSG), NADPH'a bağımlı glutatyon redüktazın kalizlediği bir reaksiyonla, tekrar iki molekül GSH'ya dönüşür. NADPH, esas olarak pentoz fosfat yolundan sentezlenir. GSH-Px, bir çift H_2O_2 molekülüne etki eden katalazdan farklı olarak, tek molekül H_2O_2 'nin ortadan kaldırılmasını sağlar (Devay, 2008; Frei, 1994; Akkuş, 1995).

Glutatyon peroksidaz, E vitamini yetersiz olursa membranı peroksidasyona karşı korur. Eritrositlerde en kuvvetli antioksidandır. Glutatyon peroksidaz yetersizliği selenyum eksikliği sonucu olabilir. Çünkü selenyum bu enzimin bir integral parçasıdır (Young ve Woodside, 2001; Chao vd., 2002; Steinberg ve Chait, 1998; Jialal ve Grundy, 1993).



Şekil 7. Glutatyon peroksidaz ve glutatyon redüktazın katalizlediği reaksiyon

Genel olarak GSH-Px'in H₂O₂'e karşı en belirgin savunma sistemi olduğu düşünülmektedir. Tetramerik yapıda olan enzim en çok karaciğer ve eritrositte aktif olarak bulunmaktadır. Kalp, akciğer ve beyinde orta, kasta ise düşük aktivitede bulunur. % 60-75'i stoplazmada, % 25-40'ı mitokondride yer alır (Fantone ve Ward, 1985; Michiels vd., 1994).

Selenyuma bağımlı ve bağımsız iki tipi mevcuttur. Selenyuma bağımlı olan GSH-Px (Se-GSH-Px) sitozol ve mitokondride bulunmaktadır. Hem H₂O₂ hem de lipid hidroperoksitleri metabolize eder. Selenyumdan bağımsız olan GSH-Px (non-Se GSH-Px) ise sadece lipid hidroperoksitleri metabolize eder. Bu fonksiyonu ile lipid peroksidasyonunun başlamasını ve ilerlemesini önlemektedir (Michiels vd., 1994).

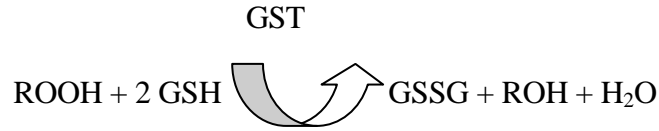
Glutatyon redüktaz; hücrel GSH redox siklusundan sorumlu olup endojen peroksitlerin detoksifikasyonu için önemlidir (Dringen, 2005). GSH-Px peroksitleri temizlemek için hidrojen donörü olarak GSH'a ihtiyaç duymaktadır. Okside formu olan GSSG, glutatyon redüktaz ile yeniden glutatyona dönüşmektedir. Gerekli olan NADPH pentoz fosfat yolundan sağlanmaktadır (Devay, 2008; Halliwell ve Gutteridge, 2000).

2.3.1.1.1.4. Glutatyon-S-Transferaz (GST; EC 2.5.1.18)

GST'lar doğada bakteriler, maya, küf, yumuşakçalar, kabuklular, solucanlar, kurbağalar, böcekler, bitkiler, balıklar, kuşlar ve memelilerde bulunur. En çok sıçanlarda ve insanlarda çalışılmıştır (Hayes ve Pulford, 1995). GST genleri tarafından kodlanan glutatyon-s-transferaz enzimleri, çevresel kaynaklı kimyasallar ve doğal olarak oluşan birçok metabolitin detoksifikasyonundan sorumludurlar (Board vd., 1990; Sipes vd., 1997; Whalen ve Boyer,1998).

GST'lar membrana bağlı ve sitosolik olmak üzere iki grupta incelenmektedirler. Vertabralılarda yedi sınıf sitosolik GST tespit edilmiştir: alfa, mü, kappa, pi, sigma, theta ve zeta. Bu sınıf ayrımları yapısal farklılıklara dayanılarak yapılmaktadır. Bir sınıf içinde farklı GST'lar en az % 40, sınıflar arası ise en az % 30 aminoasit benzerlikleri gösterirler. Türlerle göre özel sınıflara dayandırılarak yapılan insanlar ve diğer memeliler için sınıflandırma belirtilmiştir (Hayes ve Pulford, 1995; Whalen ve Boyer,1998).

Başta araşidonik asit ve linoleat hidroperoksitleri olmak üzere lipid hidroperoksitlere karşı GST'ler, selenyumdan bağımsız GSH-Px aktivitesi gösterirler.



cGST'lar (Sitoplazmik GST) iki aynı alt üniteden homodimerler veya farklı alt üniteden heterodimerlerden oluşmuşlardır. Kullanılan bir sınıflandırmada türlerin belirtilmesi için bir önek (örneğin, insan için h) kullanılırken, A, P, M, S veya T harfleri sırasıyla alfa, pi, mü, sigma ve detayı işaret etmektedir. (Ketterer vd., 1992).

GST'ler, glutatyonun reaktif metabolitlerle konjugasyonunu sağlayarak organizmadan uzaklaşmasını sağlamaktadır (Listowsky, 1988). GST enzimleri; katalitik ve katalitik olmayan çok sayıda fonksiyona sahiptir. Hem detoksifikasyon yaparlar hem de hücre içi bağlayıcı ve taşıyıcı rolleri vardır. Katalitik olarak yabancı maddeleri glutatyondaki sisteine ait -SH grubu ile bağlayarak onların elektrofilik bölgelerini nötralize ederler. Ürünün daha fazla suda çözünür hale gelmesini sağlarlar. Oluşan bu GSH konjugatları böylece organizmadan atılabilir. GSH'dan glutamat ve glisinin koparılmasından sonra sisteinin serbest amino grubu asetillenerek merkaptürik

asitlere dönüştürülür. Ksenobiyotiklerin klasik atılım ürünleri olan merkaptürik asitler (N-asetil sisteinin S-alkile olmuş türevleri) daha sonra safra ile atılırlar. Bu yol GST'lerin kanserojen, mutajen ve diğer zararlı kimyasalların hücre içi detoksifikasyonunda rolleri olduğunu göstermektedir. Metabolize edilmeyen lipofilik-hidrofilik pek çok bileşiği bağlamaları bu enzimlerin hücre içinde sınırlı çözünürlüğe sahip moleküller için depo ve taşıma rolü üstlendiğini gösterir. Böylelikle GST'ler ksenobiyotiklerin biyotransformasyonunda da önemli rol oynarlar (Canuto vd., 1993; Uchida, 2000).

2.3.1.1.1.5. Sitokrom Oksidaz

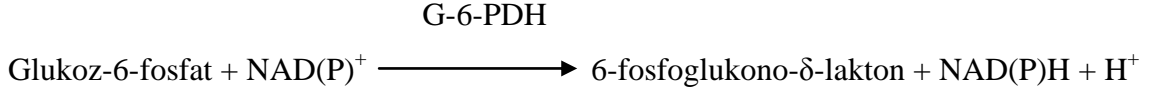
Mitokondrilerde solunum zincirinin en son basamağında yer alan ve bakır içeren bir enzimdir. Solunum zincirindeki görevini sürdürürken süperoksit radikalının H_2O 'ya dönüşümünü sağlar. Ancak süperoksit radikallerinin oluşumu çoğu kez enzimin kapasitesini aşar ve diğer enzimlerin devreye girmesi ile O_2 'in zararlı etkileri önlenir (Yalçın, 1998).

2.3.1.1.1.6. Glukoz 6- fosfat dehidrogenaz (G6PDH, EC 1.1.1.49)

Glukoz-6-fosfat dehidrogenaz enzimi pentoz fosfat yolunun ilk ve hız sınırlayıcı enzimidir. Pentoz fosfat yolu oksidatif ve nonoksidatif olmak üzere iki kısma ayrılır. Hücrede RNA, DNA ve nükleotid sentezi için gerekli riboz-5-fosfat ve redüktif biyosentezlerde indirgeyici güç olan NADPH'ları sentezlemek gibi başlıca iki fonksiyonu vardır (Krebs ve Eggleston, 1978). Ayrıca, aromatik aminoasit ve vitamin sentezinde gerekli eritroz- 4-fosfat, bakteri hücre duvarının bir bileşeni sedoheptuloz-7-fosfat gibi fosforile karbohidratlardan sentezlenmektedir (Wood, 1986).

G6PDH enziminin aktif formunun moleküler ağırlığı 59,2 kDa olup 2 veya 4 alt birim içerir (Tandoğan ve Ulusu, 2005; Yalın vd., 2002; Yıldız vd., 2010; Mehta vd., 2000). Bununla birlikte enzim genellikle aktif olarak dimerik yapı da gösterir. Enzimin dimerik ya da tetramerik formunu sıcaklık, enzim, $NADP^+$, NADPH konsantrasyonu gibi çeşitli faktörler etkilemektedir. Yüksek pH ve iyonik kuvvet dimer, düşük pH ve iyonik kuvvet ise tetramer oluşumuna neden olur (Levy, 1979).

G-6-PDH çoğunlukla sitoplazmada ayrıca peroksizom, endoplazmik retikulum, lizozom, kloroplast ve mitokondri gibi çeşitli organellerde de bulunmaktadır (Antonenkov, 1989; Bublitz ve Steavenson, 1988; Oeser vd., 1973; Zaheer vd., 1967). Birçok mikroorganizma, bitki ve hayvan hücrelerinde bulunan enzim, aşağıdaki tepkimeyi katalizler (Scott, 1975).



G-6-PDH ile katalizlenen reaksiyon termodinamik açıdan geri dönüşümlü olmasına rağmen, D-G-6-P oksidasyonunun ürünü olan D-glukonolaktonun hızlı bir şekilde hidroliziyle geri dönüşümsüz hale gelmektedir. Bu hidroliz pH bağımlıdır, pH 6,4 ve 28°C'de laktonun yarı ömrü 24 dakika, pH 7,4'te ise yaklaşık 1.5 dakikadır (Levy, 1979).

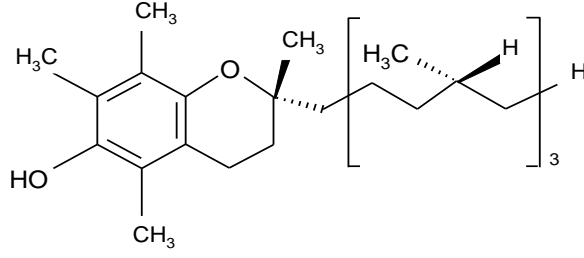
G6PDH eksikliği; oksidan ajanların detoksifiye edilememesi sonucu oluşan hemolitik anemi ile karakterize bir hastalıktır. İnsanlarda hastalığa neden olan en sık görülen enzim anomalisidir (Felix vd., 2002).

2.3.1.1.2. Enzimatik Yapıda Olmayan (Nonenzimatik) Antioksidanlar

Non-enzimatik antioksidanlar endojen veya eksojen kaynaklı olmak üzere iki grup altında incelenirler. Vitamin E, vitamin C, vitamin A (β -karoten) eksojen kaynaklı antioksidanlar iken transferin, laktoferrin, hemoglobin, ferritin, miyoglobin, ürik asit, bilirubin, melatonin, askorbik asit, albumin ve glutatyon endojen kaynaklı antioksidanlardır (Halliwell, 2007; Evans ve Cooke, 2004; Halliwell ve Aruoma, 1991).

2.3.1.1.2.1. Vitamin E

İlk olarak Evans tarafından 1938 yılında bulunmuştur. Yağda çözünen vitamin olduğu için hem sellüler hem de subsellüler membranlarda ve lipoproteinlerde bulunur (Memişoğulları, 2005).

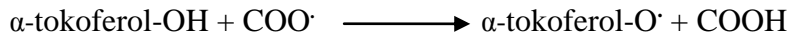


Şekil 8. Vitamin E (α - tokoferol)

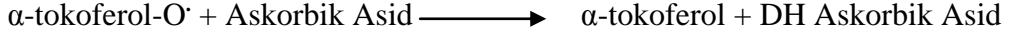
Vitamin E sekiz farklı formu (α -, β -, γ -, δ - tokoferoller ve –tokotrienoller) bulunan, yağda eriyen bileşiklerin genel ismidir. α -Tokoferol formundaki vitamin E'nin yağda eriyebilen, biyolojik olarak en aktif antioksidan olduğu bildirilmektedir. Hayvan dokularında en fazla bulunan vitamin E formu α - tokoferoldür. Vitamin E antioksidan özelliği ile hücre membranlarındaki doymamış yağ asitlerinin oksidasyondan korunmasında görevlidir (Meglia, 2006; Slater, 1984; Yao vd., 1994).

Tokoferolün diyetdeki yağda çözülmüş olması ve yağ sindirimi sırasında serbestleşip emilmesi nedeniyle yağ emilimindeki bozukluk E vitamini eksikliğine neden olur (Seven ve Candan, 1996). Molekülün aktif kısmını yapısındaki fenolik hidroksil grubuna sahip aromatik halka oluşturur ve moleküle antioksidan özellik kazandırır (Halliwell, 1996). Vitamin serbest oksijen radikallerinde (SOR) bulunan yüksek enerjili elektronları yapılarına alarak SOR'nin meydana getireceği oksidatif hasarın azaltılmasına katkıda bulunurlar (Aslan, 1985; Jain ve Levine, 1995).

α - Tokoferol zincir kırıcı antioksidan olarak fonksiyon görür. Hidrofobik kısmına hidrojenini kolaylıkla verebilen –OH grubu bağlıdır. Bu yüzden lipid peroksidasyonu sırasında oluşan peroksil ve alkoksil radikalleri yağ asidi yerine α -tokoferolle birleşerek reaksiyon zinciri kırılmış olur.



Böylece α -tokoferol yeni bir radikal olan α -tokoferol-O $^{\cdot}$ 'e dönüştürülmüş olur. Bu radikalın ise başka bir yağ asidiyle birleşebilme aktivitesi düşüktür. Sonuçta zincir reaksiyonunu durdurur. Oluşan bu tokoferoksil radikali membran yüzeyinde askorbik asitle (C vitamini) reaksiyona girerek tekrar tokoferole dönüşmektedir (Chao vd., 2002; Steinberg, 1998; Jialal ve Grundy, 1993; Van Haafte vd., 2001; Singh ve Jialal, 2004).



Özellikle yer fıstığı, kuruyemiş, lifli yeşil besinler, badem, pamuk gibi bitkilerin yağlarında ve keten tohumlarında bol bulunan E vitaminin antioksidan özelliğinin yanı sıra hücrede sinyal iletim mekanizmasındaki bazı basamaklar üzerinden hücre çoğalmasını etkilemektedir. E vitamininin kalp hastalığı oluşma riskini azalttığı bir çok araştırma ile gösterilmiştir (Chen vd., 1988).

2.3.1.1.2.2. Vitamin C

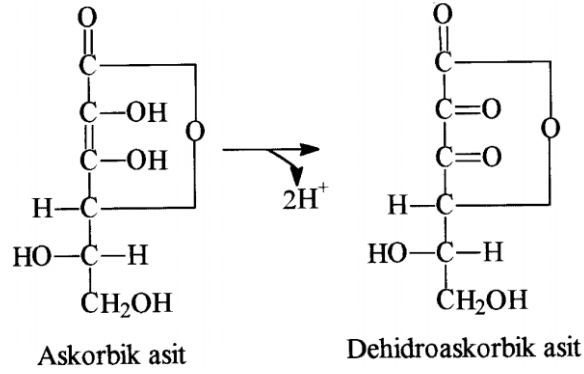
C vitamini, askorbik asit olarak da bilinen suda eritilebilen ve birçok görevi olan bir vitamindir. Çoğu hayvanlar ve bitkiler, kendi C vitaminlerini glukozdan üretebilirler. İnsanlar, bazı meyve yarasaları, hint domuzu ve insan benzeri primatlar C vitamini üretmediklerinden bunu besinlerden almak zorundadırlar. C vitamini en çok yeşil meyve sebze ve turunçgillerde bulunur.

Askorbik asit üzerinde ilk bilimsel araştırmalar 1907'de Holst ve Frolich tarafından yapılan deneylerle başlamıştır. Araştırmalarını sürdüren Holst ve Frolich birçok besin maddesinin ve bu arada özellikle yeşil sebze ve meyvelerin skorbüt hastalığını önleyici etkileri olduğunu bulmuşlardır. C. Funk 1912'de skorbüt hastalığının besinlerde bulunan bir faktörün eksikliği sonucu oluştuğu düşüncesini ortaya koymuş ve bu maddeye antiskorbutik vitamin adını vermiştir. Daha sonra Drummond 1920'de antiskorbutik vitamin için Vitamin C adını kullanmıştır.

Askorbik asit; moleküler oksijen, nitrat, sitokrom a ve c gibi bileşiklerin indirgenmesine neden olan ve sulu ortamlarda serbest radikallerle reaksiyona girebilme kabiliyetinde olan, kollagen, karnitin ve nörotransmitterlerin biyosentezi için gerekli suda çözünebilen önemli vitaminlerden biridir. Diyetle alınan askorbik asit kalp hastalıklarından dolayı olabilecek ölüm insidansını azaltmaktadır (Naidu, 2003). Plazmada oksidan ajanlara karşı ilk antioksidan defansı oluşturur. LDL kolesterolün oksidasyonunu önleyerek ateroskleroza karşı korunmada yardımcı olur. Süperoksid ve hidroksil radikalleriyle reaksiyona girip onları temizleyen bir antioksidan olmasının yanı sıra tokoferoksil radikalinin tekrar tokoferole dönüşmesini sağlar. Bu esnada kendisi de dehidroaskorbata okside olur. C vitamini yetersizliği durumlarında oluşan tokoferoksil radikalleri tokoferole

dönüşmesi için GSH ile reaksiyona girecek ve böylece hücredeki GSH miktarını azaltacaktır.

Kuvvetli bir indirgeyici olan askorbik asit semidehidroaskorbat radikal ara ürünü üzerinden kolaylıkla dehidroaskorbik aside okside olur ve bu reaksiyon fizyolojik şartlarda geri dönüşümlüdür.



Şekil 9. C Vitamini

Yine plazma C vitamini düşük (0,2 mmol/L'den düşük) olduğu zaman oksidan etki de gösterebilir. Süperoksit dışında Fe^{+3} 'ü Fe^{+2} 'ye indirgeyen başka bir ajandır. Bu şekilde demiri Fenton reaksiyonuna girmeye uygun hale getirir. Böylece plazma düzeyleri düşük olduğu zaman süperoksit üretimine katkıda bulunur (Cherubini vd., 2005; Chao vd., 2002; Steinberg ve Chait, 1998; Jialal ve Grundy, 1993).

2.3.1.1.2.3. Vitamin A

A Vitaminleri görme, üreme, büyüme ve epitel dokusunun sağlamlığı için gerekli olan bir grup bileşiktir. Diyetteki retinolün oksidasyonu sonucu oluşan retinoik asit, retinoidlerin görme dışında diğer etkilerinin çoğuna aracılık eder. α -tokoferolle karşılaştırıldığında oldukça zayıf bir antioksidandır (Cherubini, 2005). A vitamini aktivitesi gösteren birçok bileşik mevcuttur. Karotenoidler, bilinen çok iyi radikal tutucu, zincir reaksiyonlarını bozucu ve lipid peroksitlerin oluşmasını engelleyici ve yok edici bir bitki antioksidan pigment molekülüdür (Polyakov vd., 2001). Oksijenin toksik etkisini ve serbest radikalleri yok edici olarak bilinen en iyi antioksidan madde olup aktivitesi, ortam

oksijen konsantrasyonuna bağlı olarak değişir. Özellikle havuta ve ıspanakta bol bulunan bu antioksidan moleköl, izoprenoid bir sisteme ve hidrofobik bir yapıya sahiptir. β -karoten ince bağırsakta parçalanır ve iki moleköl retinal oluşturur. İnsanlarda bu dönüşüm etkin değildir. β -karotenin A vitamini aktivitesi retinolün altıda biri kadardır. Diyetlerinde bol miktarda β -karoten bulunan toplumlarda akciğer kanseri, deri kanseri ve kalp hastalığı görölme sıklığı daha azdır. β -karoten bakımından zengin gıdaların tüketilmesi katarak riskini de azaltır. β -karoten, antioksidan özelliğinden dolayı ve bağışıklık fonksiyonunu artırması nedeniyle koruyucu etkiye sahiptir. Görmede en önemli madde retinol olup, memeliler bu maddeyi tam olarak sentezleyemezler. Dolayısıyla etkin bir görme olayı için bu organizmalar, dışarıdan A vitamini alınımına ihtiyaç duyarlar. Hücrelerde A vitamini, oksidoretüktaer tarafından redoks reaksiyonları ile bitkilerde provitamin olan β -karotenden üretilebilir (Edge vd., 1997).

2.3.1.1.2.4. Transferrin ve Ferritin

Transferrin insan vücudunda demiri taşıyan bir proteindir. İyonize demir kanda transferrine bağlanarak taşınır. Her transferrin molekölü, iki demir iyonunu taşıyabilir. 1 g transferrin 1,4 mg demir taşıma kapasitesine sahiptir.

Ferritin, demiri hücrelerin kullanımına hazır bir şekilde depolayan ve sonra da vücut gereksinimlerine göre demiri kontrollü bir şekilde salan bir hücre içi demir depo molekölüdür. Böylece ferritin, vücutta demir yetersizliği olduğunda daha fazla demir salarak ya da bir düzeye kadar, kan ve vücut dokularında aşırı demir yükü olduğunda demir fazlalığını depolayarak demir depolama problemleri için bir “tampon” rolü oynar (Harrison ve Arosio, 1996). Ferritin molekölü, sayısı 4.500’e varan ferrik (Fe^{+3}) demir atomunu tutma kapasiteli boş bir küre şeklindedir (Harrison, 1977). Ferritin, kanda serum ferritin olarak ölçülebilir miktarlarda bulunur, ancak büyük çoğunlukla retikuloendotelial makrofaj ve hepatositlerde yer alır. Diğer hücrelerin çoğunun da ferritini sentezlediği varsayılmaktadır.

Hidroksil radikali en toksik ürünlerden birisidir. Normal şartlar altında dolaşımdaki demirin hemen hepsi transferrin ve ferritin gibi proteinlere bağlı ise de, depolardan demirin salgılanması inflamasyon ve hasarlı dokulardan olabilir. Buda peroksidasyonu stimüle eder. Yapılan alışmalar demir düzeyinin koroner arter hastalığı (KAH) gelişiminde pozitif bir etkiye sahip olduğunu ortaya koymuştur (Magnusson vd., 1994).

Transferrin, 2 molekül ferrik (Fe^{+3}) iyonu bağlayarak antioksidan aktivite gösterir. Fe^{+2} gibi metal iyonları serbest O_2 radikal oluşumunu artırdığından, bu iyonları bağlayan maddeler antioksidan özellik taşırlar (Sullivan, 1989).

2.3.1.1.2.5. Hemoglobin ve Myoglobin

Hemoglobin ve myoglobin; seruloplazmin, albumin, α -globulin, ferritin ve laktoferin gibi plazma ve eritrosit proteinleri Fe, Cu gibi serbest metal iyonlarını bağlayabilme kabiliyetlerinden dolayı, Fenton reaksiyonu ve diğer radikal oluşturan reaksiyonların oluşumunu engellediği için iyi birer antioksidan rol oynarlar (Dündar ve Aslan, 2000).

Myoglobin ve hemoglobin esas olarak aynı reaksiyonları yaparlarsa da farklı bir yapıya sahip renk pigmentleridir. Bu iki pigment globin olarak bilinen bir protein ile protein olmayan ve demir ihtiva eden bir bileşiğin birleşmesiyle oluşan protein kompleksidir. Molekülün demir ihtiva eden kısmı “hem” olarak adlandırılmaktadır ve iki kısımdan oluşmaktadır. Bu kısımlar demir atomu ve protoporfirin olarak isimlendirilen planar halkasıdır. Hem gruplarının demir çekirdeğinden globin ile birleşmesi sonucu myoglobin veya hemoglobinden biri oluşur. Myoglobin, hemoglobinde olduğu gibi Fe^{+2} - protoporfirin (hem) gibi bazı renk komponentleri bağlanabilir. Kompleks bir kas proteini olan myoglobin kandaki hemoglobin gibi hayvansal organizmada oksijen taşıyıcısı olarak da görev yapar. Hemoglobinin görevi, bir molekül oksijen ile geçici olarak birleşerek, organizmada akciğerden dokulara oksijen taşımaktır. Oksijen taşıyıcısı olan hemoglobin, kas gibi oksijen kısmi basıncının (PO_2) düşük olduğu ortamlarda oksijeni myoglobine verir. Myoglobine oksijenin bağlanması ortamın pH değerine bağlıdır. Düşük pH değerindeki ortamlarda oksijenin bağlanması artar (Davies, 1990).

2.3.1.1.2.6. Bilirubin

Etçil hayvanların safirasındaki boya maddesi olan bilirubin alyuvarların dalakta yıkımı sırasında hemoglobin moleküllerinin parçalanmasıyla oluşur. Karaciğere gelir ve safra olarak dışa verilir. Kansızlık durumlarında ya da safra yollarının tıkanmasında kanda bilirubin seviyesi yükselir. Karaciğerin yangılı hastalıklarında görülen sarılık, bilirubin artışına bağlıdır. Bilirubin vücuttan bağırsaklar ve idrar yoluyla atılır. Bilirubin, insan

safrasının esas pigmentini oluşturur ve altın sarısı rengini verir. Büyük oranda parçalanmış eritrositlerin hemoglobinlerinden kaynaklanır (%75) (Stolc vd., 1983).

2.3.1.1.2.7. Albumin

Albumin karaciğerde sentezlenen bir protein türevidir. Sağlıklı yetişkin karaciğerinde günde 12-14 gram kadar albumin sentezi yapılır. Sağlıklı kişilerde rutin olarak albumin bakılmasına gerek yoktur. Sağlıklı bir kişide albumin düzeyinin biraz yüksek ya da düşük çıkması da klinik bir önem taşımaz. Kan albumin düzeyi ölçümü özellikle ödemi olan, karaciğer hastalığı bulunan veya beslenme bozukluğu düşünülen kişilerde önem taşır (Ingenbleek ve Carpentier, 1985; Gudehithlu vd., 2004).

2.3.1.1.2.8. Glutasyon

GSH vücudun birçok hücresinde bulunan ve hücrenin fonksiyonel proteinlerini oksidan ajanlara karşı koruyan bir tripeptittir (Champe ve Harvey,1997). Hücre içerisinde indirgen formda (GSH) bulunur. Endojen üretilen peroksidlere karşı okside olarak onları indirger. Glutasyon peroksidaz bu reaksiyonu katalizler. Glutasyon etkin olarak hücreyi koruyabilmesi için büyük kısmı redükte halde tutulmalıdır. Bu reaksiyonu da glutasyon redüktaz katalizler. Glutasyonun glutasyon redüktazla indirgenmesi reaksiyonu NADPH'a ihtiyaç duyduğu için heksoz monofosfat yoluyla bağlantılıdır (Vincent vd., 2004; Memisogullari vd., 2003; Cherubini vd., 2005; Sözmen, 2002). Yapılan çalışmalarda diyabette GSH düzeylerinin sağlıklı kişilerden anlamlı şekilde düşük olduğu rapor edilmektedir (Abou-Seif ve Youssef, 2004).

2.3.2. Diğer Antioksidan ve Antimikrobiyal Etkili Biyomoleküller

Bitkiler tarafından sentezlenen ve sekonder metabolitler olarak adlandırılan pek çok biyomolekül; bitkilerde sinyalizasyon (mesajcı), antioksidan, antimikrobiyal, insektisit, herbisitlere gibi koruyucu rollere sahiptir. Bu nedenle (karbohidratlar, proteinler ve yağların sentezinden sonra) bunlar "ikincil bitki ürünleri" veya "fitokimyasallar" diye adlandırılırlar. Bitkiler sınırsız aromatik madde sentezleyebilme kabiliyetine sahip olduğu için bunların çoğu fenolik bileşikler veya bunların oksijen ile substitüye olmuş halleridir.

Fenolik bileşikler veya polifenoller bitkilerde en fazla bulunan yapılardan biri olup bitki aleminde 6.000'den daha fazla fenolik yapının bulunduğu belirtilmektedir (Bravo, 1998). Polifenollerin antioksidan etkilerinden başka, divalent katyon bağlayıcılar, DNA topolojizomeras II aktivitesinin inhibisyonu, protein kinaz C ve protein tirozin kinazların inhibisyonu, hepatik elektrofilik mekanizmada rol oynayan enzimlerin ve sitokrom P450 gibi sistemlerin aktivasyonu, nitrik oksit sentaz, siklo-oksijenaz ve lipo-oksijenaz enzimlerinin modülatörü etkisi gösterilmiştir (Wollgast ve Anklam, 2000). Bu bileşiklerin bazıları terpenoidler gibi olup bitkiye koku ve tat verirken, bazıları kinonlar ve tanenler gibi bitki pigmentlerini oluştururlar. Pek çok bileşik, bitkinin tadından sorumlu olup (acı biberden terpenoid capsaicin) bunlardan bazıları gıda ve bazıları ise tıbbi amaçlar için kullanılmaktadır.

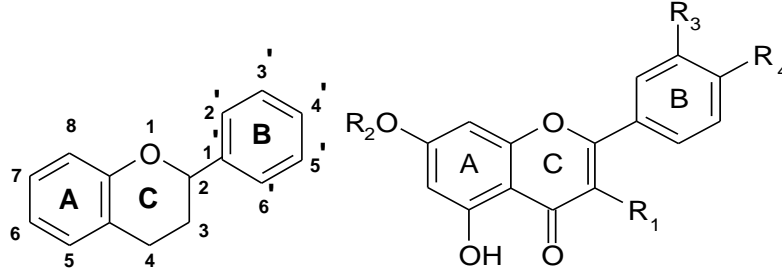
Genel olarak bakteri ve mantar türlerini öldüren veya üremelerini önleyen bileşiklere antimikrobiyal maddeler adı verilir. Mikroorganizmaları öldürücü maddelere mikrobisid etkili maddeler ve mikroorganizmaların üremesini durdurucu etki gösterirler maddelere ise mikrobiyostatik etki adı verilir. Antibiyotiklerle benzer özelliklere sahip olan, tümüyle sentetik (kimyasal yolla sentez edilen) olan maddelere de kemoterapötik maddeler denir. Bakteriler prokaryot canlılar, memeli hücreleri ise ökaryotik canlılardır. Prokaryot hücrede var olan, ancak ökaryot hücrede bulunmayan bir molekülü hedefleyen antimikrobiyal maddeler (örneğin; penisilinler, sefalosporinler, sülfonamidler) yüksek derecede seçici toksisiteye sahiptirler.

2.3.3. Fenolik Bileşikler

Bitkilerde normal metabolizma sırasında ve herhangi bir stres durumunda (yaralanma, enfeksiyon, UV radyasyon) sekonder metabolitler de denilen fenolik bileşikler üretilirler. Tıbbi bitkilerde temel olarak bulunan fenolik asitler, flavonoidler, taninler, kumarinler, ligninler, kinonlar, stilbenler ve kurkuminoidler onların medikal özelliklerinden sorumlu ajanlardır. Aromatik yapıya sahip bu fenolik bileşikler basit fenoller, fenolik asitler (benzoik asit, sinamik asit türevleri), kumarinler, flavonoidler, stilbenler, hidrolizlenebilen kondanse taninler ve ligninler üretilir.

Fenoller, oksijenli aromatik bileşiklerden olup, bir veya daha fazla hidroksil (OH) grubu taşıyan en az bir aromatik halkaya sahip organik ve kristal yapıdaki maddelerdir. Renksizdir ancak hava ile temas ettiklerinde kırmızı renk gösterirler. Suda orta derecede,

organik çözücülerde (alkol, eter vb.) iyi çözünür. Doğada 5.000 in üzerinde flavanoid bitkilerden karakterize edilmiştir. Fenolik bileşiklerin çoğunluğunun potansiyel olarak antioksidan, antikarsinogenik, antimutagenik, anti bakteriyel, antiviral ve antiinflatuar özelliğe sahip olduğu yapılan çalışmalarla ortaya konulmuştur. Ayrıca bitkilerde koku, tat ve renk oluşturlar (Bravo, 1998; Alasalvar vd., 2003; Chung vd., 1998; Cassidy vd., 2000; Tapiero vd., 2002; Cai vd., 2006). Bu biyolojik özellikleri yapılarından ileri gelmektedir (Shahidi ve Nacz, 1995; Rice-Evans vd., 1996). Flavonoidler ve fenolik asitler ana fenolik bileşikler olup onların sulu ve lipolitik ortamlardaki yapıları ile antioksidan ilişkileri üzerine oldukça çok çalışma yapılmıştır (Rice- Evans vd., 1996; Cao vd., 1997; Arora vd., 1998; Lien vd., 1999; Burda ve Oleszek, 2001; Nenadis vd., 2004). Genel olarak antioksidan aktivite hidroksil gruplarının sayısına ve pozisyonuna ile substituent ve flavonoid moleküllerin glikolizasyonuna bağlı olarak değişmektedir. Flavonoid yapıdaki bazı hidroksil gruplarının varlığı antioksidan aktiviteyi artırmaktadır.



Şekil 10. Flavonoidlerin temel yapısı ve bazı substituenleri

A ve B halkasındaki substitüent ve doymamış bağlar oxo- grubu ve substitüentler arasındaki çeşitli sterik etkileşimler bileşiğin antioksidan gücünü radikallere karşı scavenging aktivitesini ortaya koymaktadır. Glikolizasyon antioksidan aktiviteyi aglikon maddeye göre azaltmaktadır. Tıbbi bitkilerde yapılan bir çalışmada *orto*-dihidroksi gruplarının varlığının fenolik bileşiğin antioksidan gücünün artmasına neden olduğu bildirilmektedir (Cai vd., 2006). Yapılan çalışmalarda yapısı aydınlatılmış ve üzerinde en çok çalışılan fenolik ajanlar; gallik asit, *p*-hidroksisinnamik asit, *trans*-sinnamik asit 3,4-dehidroksibenzoik asit, vanillik asit, syringic acid, *p*-kumarik asit, *o*-kumarik asit, kaffeik asit, ferulik asit, klorojenik asit, rosmarinik asit, absisik asit. Bazı flavonoidlerin genel iskelet yapısı ve taşıdıkları substituentleri Tablo 1' de gösterilmiştir.

Tablo 1. Flavonoidlerin genel karbon iskeletleri ve taşıdıkları substituentler

Flavonoid	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
Luteonil	H	H	OH	OH
Luteonil-7-O-glukozit	H	glc	OH	OH
Kamferol-3-O-soforozit	O-soph	H	H	OH
Küersetin-3-O-galokozit	O-gal	H	OH	OH
Galaegin	OH	H	H	H
Kuersetin-4'-O-glukozit	OH	H	OH	O-Glc
Kamferol	OH	H	H	OH
Kuersetin	OH	H	OH	OH

Basit fenoller ve fenolik bileşikler, tek bir fenolik halka içeren biyoaktif bileşikler olup sinnamik ve kafeik asitler bu gruptandır. Katekol ve piragallol ise hidroksillenmiş fenollerdir. Tablo 2’de bazı fenolik asitlerin formülleri verilmektedir.

Tablo 2. HPLC analizlerinde kullanılan bazı fenolik asitler ve formülleri

Gallik asit	Prokatekik asit	<i>p</i> -Hidroksibenzoik asit	Vanilik asit	Epikateşin
Şiringik asit	<i>p</i> -Kumarik asit	Ferulik asit	<i>o</i> -Kumarik asit	<i>trans</i> -Sinnamik asit
Benzoik asit	Kateşin	Klorojenik asit	<i>cis, trans</i> -Absisik asit	
Rutin	Kaffeik asit	Kuersetin	Propil paraben	

2.4. Serbest Radikaller ve Oksidatif Stres

2.4.1. Serbest Radikaller

Serbest radikaller, bir veya daha fazla ortaklanmamış elektron içeren atom veya moleküllerdir. Kuantum kimyasına göre bir bağda ancak iki elektron yer alabilir ve bu elektronların zıt spinde (ters dönüş doğrultusunda) olması gerekir. Bir bağ koptuğunda elektronlar ya birlikte kalır (ikisi de bir atoma katılır) ya da ayrılırlar (biri bir atoma, diğeri diğere). Eğer birlikte kalırlarsa oluşan atom bir iyon olur, eğer ayrılırlarsa da serbest radikaller oluşur. Bu eşleşmemiş elektronlar yüksek enerjilidir ve eşleşmiş elektronları ayırıp işlerine engel olurlar. Bu işlem serbest radikalleri hem tehlikeli hem kullanışlı yapar.

Yaşam için gerekli olan serbest radikaller elektron transferi, enerji üretimi ve pek çok diğer metabolik işlevde temel oluşturur. Ama eğer zincir reaksiyonu kontrolsüz bir davranış gösterirse hücrede hasarlara neden olur. Bu atom veya moleküller en dış elektron kabuğundan bir elektron kaybetmiş olduklarından bu elektron açığını kapatabilmek için başka atomların elektronlarını paylaşma eğilimindedirler. Sonuçta serbest radikal kendine bir çift elektron alarak elektron çifti haline geçer, diğer elektron serbest radikal olur (URL-1, 2007). Serbest radikallerin normal metabolizmaya ait bir ürün olduğu sonradan anlaşılmıştır. Serbest radikal oluşturan kaynaklar radyasyon, virüsler, UV-ışınları, X-ışınları, ozon kozmik ışınlar, hava kirliliğini yaratan fosil kökenli yakıtların yanma sonundaki ürünleri, sigara dumanı, otomobil egzoz gazları, sanayi atıkları, enfeksiyonlar, stres, hücre metabolizmasının toksik ürünleri, bazı tahrip edici kimyasallar, haşere kontrol ilaçları ve birçok başka etkenlerdir. Hatta egzersizler de oksijen kullanımındaki artışla beraber serbest radikal oluşumuna neden olur.

Radikal tepkimeleri biyoloji ve tıpta yaşamsal bir öneme sahiptir ve yaşayan her canlıda her an oluşmakta ve kaybolmaktadır. Çünkü radikaller, metabolizmanın normal işleyişi sırasında sürekli olarak üretilmektedir. Moleküler oksijenin (O_2), kendisi de bir radikaldir. Temel haldeki moleküler oksijen, oksijen atomlarının her ikisinde de birer ortaklanmamış elektron bulundurur. Her iki atom denge halinde olduğundan bu oksijen molekülünün reaktif özelliği yoktur. Bu özelliğinden dolayı oksijen, diğer serbest radikallerle kolayca reaksiyona girer. Radikal olmayan maddelerle ise daha yavaş reaksiyona girer. Oksijen en son suya indirgenir. Mitokondriyal elektron transport zinciri tarafından gerçekleştirilen bu süreçte, % 1–2 oranında moleküler oksijen kaçağı meydana

gelir. Bu oksijenin redüksiyonu ile süperoksit anyonu, hidrojen peroksit ve hidroksil radikali gibi reaktif ürünler açığa çıkar. Bu radikaller oksijenin toksik etkisinin gerçek nedenini oluştururlar (Bast vd., 1991; Cheeseman ve Slater, 1993).

Radikaller, oksijen içerip içermediğine göre iki kısımda toplanırlar. Oksijen içeren radikaller serbest oksijen radikalleri (SOR) olarak adlandırılırlar. Biyolojik sistemlerde sıklıkla kullanılan ve serbest oksijen radikalleri Tablo 3’de verilmektedir (Sies, 1991).

Tablo 3. En sık karşılaşılan serbest radikaller ve serbest radikal üreten türlerin bazı özellikleri

Adı	Simge	Etkisi
Hidrojen radikali	H [•]	Bilinen en basit radikal
Süperoksit radikali	O ₂ ^{•-}	Oksijen metabolizmasının ilk ara ürünü
Hidroksil radikali	OH [•]	En toksik (reaktif) oksijen metaboliti radikali
Hidrojen peroksit	H ₂ O ₂	Reaktivitesi çok düşük, moleküler hasar yeteneği zayıf
Singlet oksijen	O ₂	Yarılma ömrü kısa, güçlü oksidatif form
Perhidroksi radikali	HO ₂ [•]	Lipidlerde hızlı çözünerek lipid peroksidasyonunu artırır
Peroksil radikali	ROO [•]	Perhidroksile oranla daha zayıf etkili, lipidlere lokalize olur
Triklorometil radikali	CCl ₃ [•]	CCl ₄ metabolizması ürünü, karaciğerde üretilen bir radikal
Tiyil radikali	RS [•]	Sülfürlü ve çiftlenmemiş elektron içeren türlerin genel adı
Alkoksil radikali	RO [•]	Organik peroksitlerin yıkımı ile üretilen oksijen metaboliti
Azot monoksit	NO	L – argininden <i>in vivo</i> üretilir
Azot dioksit	NO ₂	NO'in oksijen ile reaksiyonundan üretilir

2.4.2. Serbest Radikallerin Organizmadaki Biyolojik Etkileri

Organizmada serbest oksijen radikallerinin oluşturduğu reaksiyonlar radikalın bir diğer radikal ile veya radikal olmayan ajanlar ile karşılaşması ile oluşur. Serbest radikaller birbiri ile karşılaştığında kovalent bir molekül oluşturacak şekilde reaksiyona girerler. Serbest radikaller organizmada radikal olmayan birçok hücre bileşeni ile de reaksiyona girebilir ve bu bileşenlerin yapı ve işlevlerini değiştirir. Böylece serbest radikaller

organizmada moleküler düzeyde aşağıdaki birçok biyolojik etkiye neden olur (Busaua, 1990; Şimşek, 1999):

1. DNA yıkımı
2. Proteinlerin yıkımı ve enzim aktivitelerinde değişiklik
3. Hücre membran lipitleri ve hücre organellerinin yıkımı
4. Lipolusin pigmentlerin yıkımı

Organizmada normalde oksidatif olaylara karşı korunma mekanizmaları olmasına karşın endojen superoksit radikal yapımında artış, metal komplekslerinin (hem proteinleri ve metalloproteinler gibi) ayrılması ve radikallere karşı savunmalarda eksiklik olması durumunda dokuda artmış oksidatif yıkım görülebilir (Şimşek, 1999).

Organizmanın yaşam sürecinde karşılaştığı radikal türlerinin çeşitli olması nedeniyle, serbest radikallerin biyolojik etkilerini genellemek zordur. Oluşan serbest radikaller, ortamdaki uzaklaştırılmadığı takdirde pekçok yolla metabolik bozukluklara, hücre hasarına ve hatta ölüme yol açarlar (Boyunağa ve Çelik, 1996). Serbest radikaller, kimyasal modifikasyonlarla protein, lipid, karbonhidrat ve DNA'da hasar oluştururlar.

Lipidler; reaktif oksijen türlerinin yıkıcı etkilerine en fazla maruz kalan biyolojik moleküllerdir. Hücre membranı serbest oksijen radikalleri ile hızla reaksiyona girebilen çoklu doymamış yağ asitlerinden oldukça zengindir. Bu yağ asitlerinin doymamış bağları serbest radikallerle reaksiyona girip peroksidasyona neden olur. Membran akışkanlığı, membran lipidlerinin yan zincirlerinde bulunan doymamış yağ asitleri ile sağlanır. Doymamış yağ asitlerinin hasarı, membran akışkanlığını azaltıcı etki gösterir.

Lipid peroksidasyonu, oksijen türevi serbest radikaller tarafından tetiklenen oksidatif stresin en önemli organik göstergelerinden birisidir. Üç karbonlu bir ketoaldehid olan malondialdehid (MDA) normal metabolik şartlarda, önce asetat veya malonata kadar okside olur, daha sonra krebs siklusu ile CO₂'e indirgenerek atılır. Fakat aşırı lipid peroksidasyonunda MDA konsantrasyonu artar ve dokulara hasar verir (Ulus vd., 2003; Devay, 2008).

Biyolojik sistemlerdeki oksidatif stresin ölçülmesinde günümüzde en yaygın metot MDA ölçümüdür. MDA, proteinlerin lizin rezidüleriyle ve fosfolipidlerin amin gruplarıyla reaksiyona girer (Uchida, 2003; Devay, 2008). MDA, kolaylıkla diffüze olabildiğinden, DNA bazlarıyla da reaksiyona girerek hasara neden olabilir.

Protein oksidasyonu; hem ROS ile direkt hem de oksidatif stresin sekonder ara ürünlerinin reaksiyonlarıyla indüklenen proteinlerin kovalent modifikasyonu

olarak tanımlanmaktadır. Proteinlerde *in vivo* olarak meydana gelen oksidatif değişiklikler, proteinlerin rol oynadığı çeşitli hücrel fonksiyonları etkiler. Reseptörlerin, sinyal ileti mekanizmalarının, yapısal proteinlerin, transport sistemlerinin ve enzimlerin rol oynadığı hücrel olaylar oksidatif protein hasarından etkilenirler.

Oksidatif protein modifikasyonlarının biyokimyasal sonuçları; yan zincir gruplarının oksidasyonu, kırılmalar, çapraz bağlanmalar, yanlış katlanmalar, hidrofobik yapıda değişiklikler ve proteolitik enzimlerde aktivite kaybı olarak sıralanabilir. ROS'un proteinlerle etkileşimi sonucunda histidin, prolin, arjinin ve lizin gibi çok sayıda aminoasit kalıntısında ve/veya peptid omurgasında meydana gelen hasar sonucunda protein karbonilleri (PCO) ürünleri meydana gelir. (Hawkins ve Davies, 2001; Evans vd., 1999; Devay, 2008).

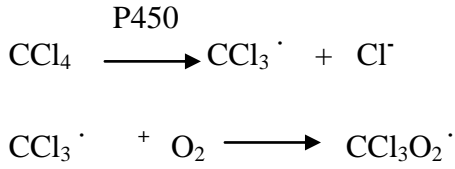
2.5. CCl₄ ve Metabolize Edilmesi

Karbon tetraklorür (CCl₄) renksiz, berrak, uçucu bir sıvıdır (ATSDR, 2005). Yoğun, alev almayan, iletken olmayan bir kimyasaldır. Kesif bir buhar veren karbon tetraklorürün kendisine has bir kokusu vardır. -23°C'de katılaştır ve 77°C'de kaynar. Yoğunluğu, 1,585 g/cm³tür. Molekül yapısı düzgün tetrahedrol olup, merkezinde karbon atomu bulunur. Apolar yapıya sahiptir. Suda çözünmez, fakat alkol gibi apolar çözücülerde çözünür. Karbon tetraklorür zehirli olup, hava yoluyla buharı zehirlenmeye yeterlidir. Deriden içeriye girebilir. Karaciğer, beyin, böbrek, kaslar, yağ dokusu ve kanda daha yüksek konsantrasyonlarda olmak üzere tüm vücuda dağılır (ATSDR, 2005). Aşırı miktarda buharını teneffüs etmek veya sıvı ile temas etmek mide bulantısı meydana getirir. Uzun süre temas edilirse karaciğer veya böbrekler harap olur ve ölüme götürür.

Önceleri kuru temizleme, yangın söndürme, tahıl dezenfeksiyonu ve böceklerle mücadelede yararlanılan bu kimyasal bileşik; günümüzde petrol ürünleri, çeşitli yağlar, vernik, cila, reçine çözücüsü ve organik bileşiklerin imalatında kullanılmaktadır. Çevreden insan vücuduna günlük ortalama 0,1 µg CCl₄ girişi olduğu tahmin edilmektedir. İnsanlarda CCl₄'ün toksik dozu solunum yolu ile alındığında 65 ppm; ağızdan alındığında ise 4 ml'dir. Birleşik Devletler Çevre Koruma Dairesi (EPA) hayvan deneylerinden elde edilen sonuçlara dayanarak, CCl₄'ü insan için olası kanserojen (grup B2) sınıfına dahil etmiştir (ATSDR, 2005; Weber vd., 2003; Thrall vd., 2000; Ögetürk vd., 2009).

CCl_4 nedenli zehirlenme vücuda alınmayı takiben ortaya çıkar ve sinir sisteminin baskılanması ile kendini gösterir. Buna bağlı olarak görülen başlıca belirtiler; baş ağrısı, baş dönmesi, halsizlik, ataksi, görme bulanıklığı, uyuma hali ve bilinç kaybıdır. CCl_4 'ün emilimden birkaç gün sonra karaciğer yağlanması ve hasarı ile ilgili belirtiler ortaya çıkar. Karaciğer hücrelerinin nekrozu sonucu aspartat aminotransferaz (AST) ve aldolaz enzim düzeyleri artar (Wang vd., 2005).

CCl_4 mitokondriyal monooksijenaz (P450 2E1) sistemince metabolize edilir. Toksin bir serbest radikale dönüştürülür. Metabolizma esnasında öncelikle başlangıç metaboliti triklorometil ($\text{CCl}_3\cdot$) serbest radikali oluştuktan sonra lipidler ve proteinler ile kovalent bağlar oluşturarak triklorometil peroksit ($\text{CCl}_3\text{O}_2\cdot$) veya hidrojen atomlarını kaybetmiş olan kloroform formuna dönüşür (Altınışık, 2011).



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). CCl_4 'e bağlı olarak gelişen karaciğer hasarında lipit peroksidasyonu son derece önemlidir (Nadkarni ve Souza, 1988; Parola, 1996). Çünkü bu hasara bağlı olarak ilerleyen süreçte karaciğer fibrozu ve siroz oluşabilir. Karaciğer fibrozu, ekstrasellüler matriks komponentlerinin artması ile karakterizedir. Aynı zamanda diğer organlarda da dejenerasyon meydana getirir.

Ekstrasellüler matriksin yapımı ve yıkımı arasındaki denge; oluşan toksik oksijen radikallerine bağlı olarak, potent profibrojenik mediatörlerin de aktive olması ile sürekli matriks yapımı yönünde bozulmaktadır (Lee, 1994). Yapılmış olan birçok çalışmada karaciğer hastalıklarında oksidatif stres ve buna bağlı olarak ortaya çıkan karaciğer hasarı ile fibrozis arasında ilişki olduğu gösterilmiştir (Shimizu, 2001; Shimizu, 2003). Karbontetraklorür (CCl_4), selektif bir hepatotoksik faaliyete sahip olduğu bildirilen ve birçok araştırmacı tarafından akut ve kronik toksisite oluşturmasında kullanılan prooksidan

aktiviteye sahip toksik bir ajandır ve deneysel hayvan çalışmalarında yoğun şekilde kullanılır (Dashti vd., 1989; Mikhail vd., 1978; Yüksek vd., 2005).

2.6. Karaciğer ve Siroz

Karaciğer gastrointestinal sistem (GİS) 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. Sağ ve sol olmak üzere iki anatomik loba ayrılmıştır. Bu anatomik lokalizasyon yanında, fizyolojik ve biyokimyasal rolü nedeni ile karaciğer gerek oral gerekse parenteral yolla alınan hemen tüm ilaçlar ve toksik maddelerle ve mikrobik ajanlarla karşılaşan ve onların zedeleyici etkilerine maruz kalan bir organdır. Bu ajanlarla sürekli olarak karşılaşan karaciğer, onları detoksifiye eder veya onların oluşturduğu hasara rejenerasyon yeteneğiyle karşılık verir. Karaciğerde hasar oluşturan ve bir kısmı yaygın olarak gözlenen çok sayıda sebep bulunmaktadır (Akşit vd., 1998; Zimmerman ve Maddrey, 1987; Crawford, 2002) Bu değişik sebeplerle oluşan karaciğer hasarı önemli bir sağlık sorunu oluşturur. Dolayısıyla, mortalite ve morbiditeyi önemli oranda düşürmesi, sağkalım oranlarını olumlu yönde etkilemesi ve yüklü tedavi maliyetlerinin azaltılması sebebiyle hepatoprotektif yani karaciğeri koruyucu etkisi olan ajanların kullanımı önem arz etmektedir.

Yumuşak ve esnek olup karın boşluğunun üst kısmında, diyafragmanın hemen altında yerleşiktir. Karaciğerin büyük kısmı kemik ve kıkırdak kaburgaların altında bulunur ve diyafragma karaciğeri plevra, akciğerler, perikard ve kalpten ayırır. Karaciğer yetişkinlerde 1400-1600 g ağırlığında olup, vücut ağırlığının yaklaşık 1/50' si kadardır. Sağ ve sol olmak üzere iki lobdan oluşur. Ayrıca sağ lobun alt yüzünde iki küçük lob daha bulunur (Akşit vd., 1998; Sherlock ve Dooley, 1997; Bismuth, 1982; Erten, 2009).

Karaciğer lobuli hepatitislerden meydana gelir. Lobuli hepatitis'lerin arasındaki boşluklarda portal kanallar vardır. Bunlar arteria hepatica propria'nın dalları, vena porta hepatitis'in dalları ve safra kanalının bir dalını içerir (portal triad). Arteryel ve venöz kan, sinüzoidler aracılığıyla karaciğer hücrelerinin arasına ilerler ve vena sentralis'e dökülür. Karaciğere kan taşıyan damarlar arteria hepatica propria (%30) ve vena porta hepatitis (%70)'tir. Vena porta hepatitis, gastrointestinal (Gİ) kanaldan emilen sindirim ürünlerinden zengin venöz kan getirirken, arteria hepatica propria karaciğere

oksijenlenmiş kan getirir. Arteryel ve venöz kan, karaciğer sinüzoidleri aracılığıyla her bir lobülü hepatis'in vena sentralis'ine iletir. Terminal vasküler dallara yakın hepatositler (zon 1), oksijen ve sindirim ürünlerinden zengin bir kanla beslenirler. Bu hepatositler çabuk rejenere olurlar ve hücre ölümüne dayanıklıdırlar. Zon 2 ve zon 3 ise vasküler yapılardan gittikçe uzaklaşırlar, daha az oksijen alırlar ve daha az sindirim ürünlerini içeren bir kanla beslenirler. Zon 3 en az kanlanan bölümdür. Bu zonlarda metabolik ve enzimatik farklılıklar da söz konusudur. Örneğin sitokrom P450 en yüksek yoğunlukta zon 3'te bulunur (Akşit vd., 1998; Sherlock ve Dooley, 1997; Bismuth, 1982; Erten, 2009).

2.6.1. Karaciğerin Histolojisi

Karaciğer histolojik olarak hepatosit kordonlarının meydana getirdiği lobüllerden oluşur (Aksoy, 1977). Karaciğerin temel yapı elemanı karaciğer hücresi ya da hepatositir. Bu epitelyal hücreler birbirleriyle bağlantılı plaklar halinde gruplaşmışlardır. Işık mikroskobu kesitlerinde, karaciğer lobülü olarak isimlendirilen yapısal birimler görülebilir. Karaciğer lobülü 0,7x2 mm boyutlarında poligonal bir doku kitlesidir. Karaciğer lobülü içindeki hepatositler ışınsal olarak dizilmiş ve bir duvarın tuğlalarına benzer biçimde düzenlenmiştir (Aytekin ve Solakoğlu, 2006).

Hepatositler altı veya daha fazla yüzeyli, polihedral, yaklaşık 20-30 mikron çapta hücrelerdir. Genellikle bir, bazende iki nükleuslu, soluk pembe sitoplazmalıdır. Sitoplazmalarında lobülün orta kısmında daha belirgin olmak üzere ince kahverengi granüller halinde lipofüsin pigmenti ve seyrek olarak yağ vakoulleri bulunabilir. Hematoksinle eozinle (H.E) boyanmış kesitlerde; çok sayıda mitokondri (her bir hepatosit yaklaşık 2.000 mitokondri) bulunmaktadır. Hepatosit sıklıkla glikojen içerir. Bu polisakkarit elektron mikroskobunda, genellikle sitozolde düz endoplazma retikulumu yakınında toplanmış, kaba, elektron- yoğun granüller halinde görülür. (Aytekin ve Solakoğlu, 2006).

2.6.2. Karaciğer Fonksiyonları

Hepatosit muhtemelen vücudun çok yönlü özelliği en fazla olan hücresidir. Bu hücreler hem iç hem de dış salgılama işlevlidir; bazı maddelerin sentezini yapar ve

biriktirir, bazılarını detoksifiye eder, bazılarını da taşır (İnci, 1996; Güzel, 1996; Aytekin ve Solakoğlu, 2006; Erten, 2009).

Karaciğer; yaşam için gerekli birçok farklı fonksiyona sahiptir. Hepatosit, kendisi için gerekli proteinlere ek olarak, salgılamak üzere çeşitli plazma proteinlerini de (albumin, protrombin, fibrinojen ve lipoproteinler) sentezler. Ayrıca aminoasitleri, karbohidratları, lipidleri, vitaminleri, mineralleri alır, işler ve depolar. Albumin, α ve β globulinler, pıhtılaşma faktörleri ve transport proteinleri dâhil olmak üzere birçok plazma proteini karaciğer tarafından sentezlenmektedir (Aslan, 2005).

Karaciğerin diğer bir önemli fonksiyonu da normal düzeyi 600-1.200 ml/kg olan safra salgısı salgılamaktır. Safra salgılanması, hepatositlerin kandaki maddeleri alıp, dönüştürerek safra kanalikülleri içine salgılamaları nedeniyle bir anlamda ekzokrin bir fonksiyondur. Safra, su ve elektrolitlere ek olarak birkaç ana bileşene daha sahiptir; bunlar safra asitleri, fosfolipitler, kolesterol ve bilirubindir. Karaciğer; safra asitlerinin kolesterolden sentezi ve safraya sekresyonu; böylece kolesterol metabolizmasının düzenlenmesi ve diyetsel yağların absorpsiyonunun kolaylaştırılmasından da sorumludur (İnci, 1996).

Karaciğer önemli bir fonksiyonu da depo olarak görev almasıdır. Lipitler ve karbohidratlar, karaciğerde trigliserid ve glikojen şeklinde depolanır. Bu metabolit depolama kapasitesi, vücudun öğünler arasındaki enerji gereksinimini karşıladığı için önemlidir. Karaciğer, vitaminler (özellikle A, D ve B12 vitamini) için de en büyük depolanma yeridir (İnci, 1996; Güzel, 1996; Aytekin ve Solakoğlu, 2006; Erten, 2009).

Karaciğer; ilaçlar ve toksinler gibi ekzojen bileşiklerin detoksifikasyonunda primer organdır. Çeşitli ilaçlar ve maddeler oksidasyon, metilasyon ve birleşmeyle etkisiz kılınabilir. Bu olaylara katılan enzimler başlıca düz endoplazma retikulumunda bulunur. Glukuronik asidi bilirubine birleştirilen bir enzim olan glukuronil transferaz, steroidler, barbitüratlar, antihistaminikler ve antikonvülzanlar gibi başka bileşiklerin de beraberliğini sağlar. Belli koşullarda, karaciğerde etkisizleşen ilaçlar hepatositte bulunan düz endoplazma retikulumunda artışa yol açarak organın zehirden arındırma kapasitesini artırır (Aytekin ve Solakoğlu, 2006).

Aynı zamanda karaciğer; tiroid, steroid ve diğer hormonların başlıca katabolizma yeridir ve plazma hormon düzeylerinin düzenlenmesinde rol oynamaktadır (Diler, 2005). Bunların dışında karaciğerin kanın pıhtılaşmasında, karbohidrat, yağ ve protein metabolizmasında önemli rolleri de vardır (Erten, 2009).

2.6.3. Siroz

Karaciğerde inflamasyona ya da direkt toksik hasara cevap olarak fibrotik doku oluşur. Zamanla fibröz bandlar karaciğerin çeşitli bölgelerini birleştirir (portalportal, portal-santral, santral-santral). Bu olay köprüleşme fibrozisi olarak adlandırılır. Geri dönüşümü mümkün olan diğer bütün lezyonlardan farklı olarak fibrozis, genelde hepatik hasarın geri dönüşü olmayan sonucudur.

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. İlerleyici ve kronik bir karaciğer hastalığıdır.

Devam eden fibrozis ve parankimal hasar ile karaciğer, rejenere hepatositlerden oluşan ve skar dokusu ile çevrelenmiş nodüllere ayrılır. Bu şekilde siroz oluşur. Karaciğerin çok büyük fonksiyonel rezervi vardır. Fulminan hepatit dışında diğer bütün hastalıklarda rejenerasyon gerçekleşebilir. Normal bir bireyde, karaciğerin %75'inin cerrahi olarak alınması, minimal bir hepatik yetmezlik oluşturur. Siroz, ilaca bağlı hasarın nadir bir sonucudur. Birçoğu kronik karaciğer hastalığının ilerlemesi ile ortaya çıkar. Rejenerasyon sayesinde karaciğer hacmi bir iki hafta içinde yenilenir. Masif hepatosellüler nekroz meydana geldiğinde eğer bağ dokusu çatısı sağlam kalmışsa; hemen hemen kusursuz bir onarım sağlanır (Crawford, 2002)

2.7. Toksikoloji, Ksenobiyotikler ve Biyotransformasyon

Ağız yoluyla alındığında veya herhangi bir yolla emildiğinde biyolojik sistemlerde hasar veya ölüm oluşturan maddelere "toksin" veya "zehir", toksinlerin etkilerini inceleyen bilim dalına da "toksikoloji" denir. Bununla birlikte toksikoloji, kimyasallar ile biyolojik sistem arasındaki etkileşimleri zararlı sonuçları yönünden inceleyen bilim dalı olarak veya kimyasalların zararsızlık limitlerini belirleyen bilim dalı olarak da tanımlanmaktadır. Ancak toksikolojinin, tanımlayıcı toksikoloji, klinik toksikoloji, çevre toksikolojisi, endüstri toksikolojisi, adli toksikoloji, analitik toksikoloji ve ekotoksikoloji gibi alt dalları düşünüldüğünde her dalın işlevine göre ayrı ayrı tanımlar getirilmesinin gerekliliği ortaya çıkmaktadır. 16. yüzyılda Paracelsus'un (1493-1541) zehiri tanımlarken kullandığı "her madde zehirdir, zehir olmayan madde yoktur; zehir ile ilacı ayıran dozdur" şeklindeki ifade, bugünkü modern toksikolojinin de çıkış

noktasıdır. Her kimyasalın doza bağımlı olarak toksik etki gösterebilmesi gerçeği toksikolojinin uğraş konusunu ilaç, kozmetik, tarım ilacı, gıda katkı maddeleri, ev temizlik malzemesi ve endüstriyel kimyasallar olarak çok geniş bir alana yaymaktadır. Bütün bu kimyasallara, organizmaya yabancı anlamına gelen “ksenobiyotik” adı da verilmektedir. Genel ifade ile canlı sistemlere yabancı olan ilaç, böcek öldürücü, petrol ürünleri gibi maddeler ya da bunların kısımları ksenobiyotik olarak adlandırılmaktadır.

Bu yüzyılın başına kadar kullanılan kimyasalların sayısı birkaç bin ile sınırlı idi. Bu kimyasalların büyük bölümünü de bitkisel, hayvansal ve mineral kaynaklı doğal maddeler oluşturuyordu. 20. yüzyılda organik kimya biliminde dolayısıyla kimya endüstrisindeki hızlı gelişme, kullanılan kimyasalların sayısını hızla arttırmıştır. Günümüzde büyük bölümü sentetik olmak üzere 80.000'in üzerinde kimyasal madde çeşitli amaçlar için kullanılmaktadır. Bu kimyasalların başlıcaları; ilaç aktif maddesi (4.000), ilaç yardımcı maddesi (2.000), kozmetik (3.000), gıda katkı maddesi (2.600), tarım ilacı (1.500) ve endüstriyel kimyasal (48.000) olarak dağılım göstermektedir (Tunçok, 2003).

Vücuda deri, sindirim sistemi, akciğer, injeksiyon gibi yollarla giren ksenobiyotikler vücut sıvılarında dağılıbilir, plazma proteinlerine bağlanabilir veya organlarda birikebilir. Bu ksenobiyotiklerin vücuttan atılımı değişik şekillerle gerçekleşir. Bu yollardan biri böbrekler ve idrardır. İkinci yol karaciğerdir. Safraya geçen bir madde barsağa geçtikten sonra ya dışkı ile atılır, ya da barsakta yeniden absorbe olur ve tekrar karaciğere gelir. Bu dolaşım defalarca devam eder ve sonuçta karaciğerdeki muhtemel toksik etki artar. Üçüncü atılım yolu akciğerdir. Vücut sıcaklığında gaz halinde bulunan maddeler kandan alveollere geçer ve oradan atılır. Dördüncü atılım yolu ise minör atılım yoludur. Ter, tükürük, sperm, süt, gözyaşı en temel minör atım yollarıdır.

Organizmaya giren ksenobiyotiklerin kimyasal değişimleri metabolizma olarak adlandırılabilirse bile biyotransformasyon teriminin kullanılması daha yerinde olur. Biyotransformasyon sonucu ana üründen şekillenen ürünlere metabolit denir. Yabancı maddelerin biyotransformasyonunu katalize eden başlıca enzimler karaciğerde bulunur. Bu yüzden karaciğerin kan dolaşımı ile kendine gelen kimyasal maddeleri depolama, dağılım ve safra gibi atılmadan önce metabolize etme kapasitesi oldukça yüksektir. Ayrıca biyotransformasyon karaciğerde başlar, daha sınırlı olmak üzere akciğer, böbrek

ve barsakta, daha da sınırlı olmak üzere deri, testis, plasenta ve adrenal bezde de gerçekleşir (Vural, 2005).

Ksenobiyotiklerin biyotransformasyonu için Faz I ve Faz II reaksiyonları olmak üzere iki ayrı reaksiyon kullanılır. Faz I'e katılan temel reaksiyon, monooksijenazlar veya sitokrom P-450 olarak adlandırılan enzimlerce katalizlenen hidroksilasyondur. Faz I'in diğer reaksiyonları redüksiyon ve hidrolizdir. Faz I'de oluşan hidroksile bileşikler Faz II'de çeşitli polar metabolitlere dönüştürülmektedir.

Ksenobiyotik metabolizmasındaki bu iki fazın baştan sona amacı, ksenobiyotiklerin sudaki çözünürlüklerini (polarite) artırmak ve bu şekilde vücuttan atılmalarını kolaylaştırmaktır (Board vd., 1990).

Ksenobiyotikler sitokrom P-450 metabolizmasıyla aktifleştikten sonra Faz II reaksiyonları olarak bildiğimiz glukoronidasyon, sulfasyon, metilasyon, asetilasyon ve glutatyon ile konjugasyon reaksiyonlarından biriyle metabolize edilmektedir. Böylece aktive maddeler reaktif olmayan ve suda çözünebilir ürünler olarak safra ya da idrarla atılmak üzere organizmadan uzaklaştırılır. Faz I ve Faz II enzim aktiviteleri arasındaki denge ksenobiyotiklerin organizma cevabında önemlidir (Sinnat vd., 2000).

2.8. Deneysel Hayvan Çalışmaları

Biyolojik etkinlik testleri *in vivo* ve *in vitro* olarak yapılmaktadır. *In vitro* çalışmalar laboratuvar ortamında ya da yapay ortamlarda gerçekleştirilir. Biyoaktif bileşiklerin nitel ve nicel analizleri laboratuvar koşullarında (*in vitro*) oldukça düşük konsantrasyonlarda bile yapılmaktadır. Yapay ortamda hazırlanmış doku örnekleri ya da bakteri kültürleri üzerinde denenen herhangi bir ilacın etkisi, antioksidan testler *in vitro* çalışmalara örnek olarak verilebilir. Çalışma canlı organizmada bizzat yapılırsa bu tip çalışmalar *in vivo* çalışmalar olarak adlandırılır. Bir maddenin biyolojik etkinlik testleri ilk olarak *in vitro* yürütülür ve biyolojik etki potansiyeli ölçülür. Daha sonra *in vivo* çalışmalara geçilir. Çünkü *in vivo* çalışmalar oldukça sorumluluk gerektiren, etik kurul kararına bağlı olarak yapılan çalışmalardır.

Ülkemizde hayvanlar kullanılarak yapılacak deneylere ait Resmi Gazetede 06.07.2006 tarih ve 26220 sayılı "Hayvan Deneyleri Etik Kurullarının Çalışma Usul ve Esaslarına Dair Yönetmelik" ile yapılacak *in vivo* çalışmalar belli kurallara bağlanmıştır.

Bu yönetmeliğin amacı, deney hayvanları ile yapılacak olan bilimsel araştırma, test, sağlık hizmetleri uygulamaları, eğitim-öğretim ve yayın gibi temel etkinliklerde kullanılan yöntem ve materyaller ile ilgili minimum etik standartları belirlemek, etik ilkeler doğrultusunda görüş bildirmek ve araştırma önerilerini bu açıdan incelemek üzere oluşturulacak Hayvan Deneyleri Merkezi Etik Kurulu ve hayvan deneyleri yerel etik kurullarının kuruluş ve çalışma esaslarına, yapılması planlanan işlemlerin sunulmasına, araştırma ve çalışma önerilerinin incelenmesine, izin verilmesine, uygulamalara, uygulamaların izlenmesine, deney hayvanları üzerinde yapılan bütün işlemlerin kayıt altına alınmalarına ve bu işlemlerin anında ya da geriye doğru izlenebilmelerine, ilgili bütün işlemlerin denetlenebilirliğinin sağlanmasına ve ilgili işlemlerin gerektiğinde sonlandırılmalarına ilişkin esasları belirlemektir.

Deney hayvanı kullanan Sağlık, Tarım ve Köyişleri, Çevre ve Orman ve Milli Eğitim Bakanlıklarına bağlı araştırma ve hizmet veren kurum ve kuruluşlar ile yüksek öğretim kurumları hayvan deneyleri yapabilmek için ilgili etik kurulları kurmak zorundadır. Bu çalışmaları yapacak araştırma gruplarının da bu kuruldan izin alma zorunluluğu vardır.

Literatürde yapılan çalışmalarda hayvan deneylerinde istatistik metodu olarak yoğun şekilde SPSS'in kullanıldığı, Microsoft Exel programından yararlanıldığı görülmüştür.

Deneyisel sonuçların gruplandırıldığı önemli bir istatistik metodu olan diskriminant analizi birimleri en az hata ile ait oldukları kitlelere ayırmak için yapılan işlemler topluluğu olarak tanımlanmaktadır. Çok değişkenli analizde sıklıkla karşılaşılan problemlerden birisi sınıflandırma problemidir. Araştırmacının ilgilendiği bireyler farklı yığımlardan (gruplardan) geliyor olabilir. Araştırmacı, bir bireyin p sayıda özelliğini ölçtüğünde, elindeki bireyin hangi gruptan geldiğini merak edebilir. Bu durumda sınıflandırma problemi, bireyin p sayıda özelliğini inceleyerek hangi gruptan (grup sayısı g olmak üzere) geldiğine karar verme problemi olarak nitelendirilebilir. Anderson'un (2003) belirttiği gibi bu grupların p değişkenli olasılık dağılımlarına sahip oldukları varsayılır. Bu durumda herhangi bir bireyin bu gruplardan gelen bir rassal örnek olduğu söylenebilir. İşte sınıflandırma problemindeki temel soru; "p tane değişkene ilişkin gözlem değerleri bilinen bireyin hangi olasılık dağılımından geldiği"dir. Bu yönüyle çalışmamızda bu ayırım metodu da kullanılmıştır.

Arı ürünleri ile ilgili olarak literatürde bazı *in vivo* çalışma örneklerine rastlanmaktadır. Basim vd. (2007) polen ve propolis metanolik ekstraktlarının antibakteriyal aktivite gösterdiklerini; Medeiros vd. (2008) sıçanlarda fenolik polen ekstraktlarının anti-alerjenik etki gösterdiğini; Almaraz- Abarca vd. (2007) Meksika florasına ait etanolik polen ekstraktlarının lipid peroksidasyonu inhibe edici etki gösterdiğini; Silva vd. (2006) ile Šarić vd. (2008) arı ürünlerinin lipid peroksidasyonu engellediğini, oksidan özelliğe sahip ve kanserojen olduğu bilinen pek çok serbest oksijen radikalini temizlediğini; Nasuti vd. (2006) gastrik lezyonları önlediğini, Eraslan vd. (2008) ise bazı biyokimyasal parametrelere etkisini yaptıkları hayvan çalışmaları ile ortaya koymuştur.

3. YAPILAN ÇALIŞMALAR

3.1. Çalışmada Kullanılan Materyaller

3.1.1.Cihazlar

Çalışmalarımızda kullanılan temel cihazlar marka/model/menşei ülke olarak Tablo 4’de verilmiştir.

Tablo 4. Çalışmalarda kullanılan cihazlar

Cihaz Adı	Marka/Model/Menşei ülke
HPLC	Shimadzu LC-UV, Kyoto, Japan
UV-vis spektrofotometre	Shimadzu UV-2450, Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan
Mikroskop	Nikon Eclipse E400, Made in Japon.
pH metre	Hanna pH 213, Romanya
Santrifüj	Hettich, 1406 Type, Universal 320R, Germany
Dondurucu	Joun sa Deep Freezer VXE490, Czech Republic
Homojenizatör	Ika-Werke, Ultra Turrax [®] T25 Basic, Germany
Otoanalizör	Roche, Cobas 6000, Made in Germany
Vorteks karıştırıcı	Heidolph, Reaxtop Vorteks Karıştırıcı
Su banyosu	Nüve, ST 402
Etüv	Nüve, FN 300
Magnetik karıştırıcı	Nüve, MK 418
Kül Fırını	Nüve, MF 120
Yarı otomatik makro Kjeldahl düzeneği	Gerhardt, Turbotherm, Germany
Rotary evaporatör	IKA, China
Sıçan terazisi	Kern-Sohn-GmbH, PCB-800-1, Germany
Yarı otomatik pipetler	Scorex
Mikro plate okuyucu	Tunable, Versa Max, Microplate reader, USA

3.1.2. Kimyasal Madde ve Malzemeler

Çalışmalarımızda kullanılan temel kimyasal madde ve malzemeler Tablo 5’de verilmiştir.

Tablo 5. Çalışmada kullanılan temel kimyasallar

Kullanılan Kimyasal	Satın Alındığı Firma
Silibinin	Sigma Aldrich, Germany
Karbontetraklorür	Merck, Germany
Etil Alkol	Merck, Germany
Zeytin Yağı	Komili, Sızma
Folin-Ciocalteu’s phenol reaktifi	Merck, Germany
Trolox [®] (6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametil kroman-2-karboksilik asit)	Appllichem (Darmstadt, Germany)
Hegzan	Merck, Germany
Fosfor wolfram asidi	Merck, Germany
HCl	Merck, Germany
Sodyum karbonat (Na ₂ CO ₃)	Merck, Germany
KCl	Merck, Germany
Sodyum asetat (CH ₃ COONa.3H ₂ O)	Merck, Germany
H ₂ SO ₄	Merck, Germany
Metanol	Sigma-Aldrich Co. USA
2-metil-3-heptanon	Sigma-Aldrich Co. USA
TPTZ	Merck, Germany
Gallik asit	Sigma Aldrich, Germany
Protokatekuik asit	Sigma Aldrich, Germany
Kateşin	Sigma Aldrich, Germany
<i>p</i> -hidroksi benzoik asit	Sigma Aldrich, Germany
Klorogenik asit	Sigma Aldrich, Germany
Vanilik asit	Sigma Aldrich, Germany
Kafeik asit	Sigma Aldrich, Germany

Tablo 5'in devamı

Siringik asit	Sigma Aldrich, Germany
Epikateşin	Sigma Aldrich, Germany
<i>p</i> -kumarik asit	Sigma Aldrich, Germany
Benzoik asit	Sigma Aldrich, Germany
<i>o</i> -kumarik asit	Sigma Aldrich, Germany
<i>cis,trans</i> -absisik asit	Sigma Aldrich, Germany
<i>trans</i> -sinnamic asit	Sigma Aldrich, Germany
Rutin	Sigma Aldrich, Germany
Ferulik asit	Sigma Aldrich, Germany
Kuersetin	Sigma Aldrich, Germany
Asetonitril	Sigma Aldrich, Germany
Metanol	Sigma Aldrich, Germany
Etanol	Sigma Aldrich, Germany
Asetik Asit	Sigma Aldrich, Germany
NaOH	Sigma Aldrich, Germany
Fosfotungustik asit	Sigma, St Louis, MO, USA
Tiyobarbitürik asit (TBA)	Sigma Aldrich, Germany
NaHPO ₄	Sigma Aldrich, Germany
1,1,3,3-Tetrametoksipropan	Sigma Aldrich, Germany
NaH ₂ PO ₄	Sigma Aldrich, Germany
Trikloroasetikasit (TCA)	Sigma, St Louis, MO, USA

3.1.3. Çözeltiler

Çalışmalarımızda kullanılan temel kimyasal çözeltiler ve hazırlanışları Tablo 6’da verilmiştir.

Tablo 6. Çalışmalarda kullanılan bazı çözeltiler ve hazırlanışları

Çözelti	Hazırlanışı
0,2 N Folin-Ciocalteu	2 N Folin reaktifinden 1:10 oranında distile su ile seyreltilerek kullanılır.
Doymuş Na ₂ CO ₃	35 g susuz Na ₂ CO ₃ üzerine 100 mL su eklendikten sonra, 70-80°C’ye ısıtılarak çözündürülür, bir gece soğumaya bırakılır, bu şekilde doymuş çözeltiliye birkaç Na ₂ CO ₃ .10 H ₂ O kristali atılıp, kristalizasyon başlatılır. Kristalizasyon bitince cam pamuktan filtre edilir.
0,025 M KCl Tamponu (pH:1,0)	1,86 g KCl üzerine 980 mL su eklenip, yoğun HCl ile pH değeri 1,0’a ayarlanır. 1 litrelik balona aktarılır ve balon hacim çizgisine kadar suyla tamamlanır.
0,4 M Sodyum asetat Tamponu pH: 4,5	54,43 g CH ₃ COONa.3H ₂ O tartılır, üzerine yaklaşık 960 mL su eklenip karıştırılır. pH derişik HCl ile 4,5’e ayarlanıp, saf suyla 1 litreye tamamlanır.
Trolox [®] (100 µM) FRAP	12,65 mg Trolox [®] 50 ml’ye etanolle tamamlanır. 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 galsiyel asetik asit ilave edilir.750 ml’ye saf suyla tamamlanır.
HCl (40 mM)	%37’lik HCl’den 340 µL alınır, son hacmi 100 mL’ye suyla seyreltilir.
FeCl ₃	324,4 mg FeCl ₃ destile suyla 100 mL’ye tamamlanır.
3 N H ₂ SO ₄	8,328 mL derişik H ₂ SO ₄ ’den (% 96, d:1,84) alınır ve 100 mL’ye tamamlanır.
%80’lik Asetonitril	800 mL Asetonitril balon jodede saf su ile 1000 mL’ye tamamlanır.
% 2’lik Asetik Asit	20 mL Glasiyal asetik asit balon jodede saf su ile 1000 mL’ye tamamlanır.
0,084 N H ₂ SO ₄	570 µL H ₂ SO ₄ % 98’lik orjinal şişesinden alınır. İçinde bir miktar deiyonize su bulunan 250 mL’lik balon jodaye 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, 4,5 mL deiyonize suda çözülür.
0,8 mM CuCl ₂	0,00866 g CuCl ₂ tartılır 80 mL deiyonize suda çözülür. Tartım litre bazında hazırlanıp, seyreltilmiştir.

Tablo 6'nın devamı

Tiyobarbütirik asit (TBA) reaktifi-Plazma için	0,335 g TBA tartılır. Bir miktar suda ısıtarak manyetik karıştırıcı ile çözüldükten sonra hacim 50 ml'ye tamamlanır. Sonra 50 mL asetik asit ile karıştırılır (Günlük hazırlanır.).
Tiyobarbitirik asit (TBA) reaktifi-Eritrosit paketi için	500 µL 1N NaOH çözeltisine 0,1 g TBA eklenir, 4 mL'ye saf suyla tamamlanır. Isıtılır ve soğutulur. Son hacim saf suyla 10 mL'ye tamamlanır.
100 nmol/ml'lik 1,1,3,3-Tetrametoksipropan (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 suyla seyreltilme yoluyla istenilen konsantrasyonlar elde edilir.
0,01 M Fosfat Tamponu (PBS)	0,2417 g NaH ₂ PO ₄ . 2H ₂ O ve 0,135 g NaHPO ₄ alınır. 200 mL suda çözülür, NaOH ile pH 7,0'ye ayarlanır ve son hacim 250 mL'ye tamamlanır.
Sodyum azidli PBS (0,4 M)	0,026 g sodyum azid (Na-N ₃) 1 mL suda çözülür ve 100 mL'ye PBS ile tamamlanır.
Trikloroasetikasit (TCA) 2 M (NH ₄) ₂ SO ₄	14 g TCA alınır, 50 mL'ye suyla seyreltilir. 1,053 g tartılıp 4 mL buzlu suda çözülür.
Fosfat Tamponu pH 7,06; 50 mM	81 g KH ₂ PO ₄ , 1 L ve 8.90 g Na ₂ HPO ₄ .2H ₂ O, 1 L deiyonize suda çözülür. Bu çözeltiler sırasıyla 1:1,5 oranında karıştırılır. Gerekliğinde asit- baz ilavesiyle pH 7,0'ye ayarlanabilir.
30 mM H ₂ O ₂	0,34 mL % 30'luk H ₂ O ₂ alınarak hacim fosfat tamponu ile 100 mL'ye tamamlanır. Taze hazırlanır.
Tamponlanmış H ₂ O ₂ çözeltisi	% 30'luk H ₂ O ₂ 'den 340 µL alınıp 100 mL'ye 50 mM'lık fosfat tamponu ile (pH 7,0) tamamlanır.
32,4 mM Amonyum molibdat	3,7 g amonyum molibdat tartılıp, 100 mL'ye saf suyla tamamlanır.

3.1.4. Deney Hayvanları

Çalışmanın planlanması aşamasında Karadeniz Teknik Üniversitesi, Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kuruluna başvuruldu, alınan etik kurul kararı doğrultusunda çalışma planlandı. Devam eden süreçte etik kuruldan alınan izine binaen çalışmanın bazı kısımları revize edildi ve son şekli verildi.

Bu çalışmanın deneysel hayvan çalışmaları kısmı; Karadeniz Teknik Üniversitesi, Cerrahi Araştırmalar Merkezi'nde gerçekleştirildi. Deneylerde bu merkezden temin edilmiş, ağırlıkları 250–350 g arasında olan 49 adet sprague dawley tipi erkek 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.

3.2. Numunelerin Temini

Müstahsillerimiz Karadeniz bölgesi arıcıları olup polenlerin temininde ZAYBİR ve TRAYBİR (Zonguldak ve Trabzon Arı Yetiştiricileri Birliği) başta olmak üzere diğer arıcılık birlikleri ile ortak çalışıldı. 2009 sezonuna ait 4 farklı kestane poleni çalışmada materyal olarak kullanıldı. İki polen örneği Zonguldak bölgesinden (ZP1 ve ZP2), birer polen örneği de Trabzon bölgesinden (TP) ve Giresun bölgesinden (GP) temin edildi.

Polenler arı kovanlarından arıcılar tarafından polen tuzakları takılmak suretiyle alındı, güneşte 4-5 saat kurutuldu, ışık geçirgenliğini önlemek için etrafı alüminyum folyo ile sarılı, cam kavanozlar içerisinde buzdolabında saklandı. Daha sonra polietilen ambalajlar içerisinde vakumlanarak dondurucu içerisinde çalışma zamanına kadar muhafaza edildi.

3.3. Polenlerin Analizleri

3.3.1. Su içeriği (%)

Polenler, içerisinde silikajel bulunan etüv içerisinde, 45°C'de numuneler sabit ağırlığa gelinceye kadar bekletildi ve su miktarı güneşte kurutulan polenlerin % ağırlığı cinsinden ifade edildi (AOAC, 2000; Human ve Nicolson, 2006). Literatürde (Crane, 1990; Codex standart for honey, 1981; Krell, 1996) polenlerin su miktarı tayinleri benzer şekilde vakumlu kurutucuda 45 mm Hg'da 65°C'da veya 40-45°C'da yapılmış olup, çalışmamızda yöntem modifiye edilerek kullanıldı.

3.3.2. Kül Miktarı (%)

Numunelerin kül miktarları, AOAC (2000)'e göre kül fırınında 600°C'de numune içerisinde hiçbir siyah nokta kalmayınca kadar yakılarak bulundu. Yakılan numune kül

fırından çıkarılıp, desikatörde soğutuldu ve zaman kaybedilmeden tartıldı. Sonuçlar kuru maddede % kül olarak hesaplandı.

3.3.3. Toplam Protein Miktarı (%)

Polen örneklerinin toplam protein miktarları yarı otomatik Kjeldahl yakma ünitesi kullanılarak Kjeldahl metoduna göre, protein miktarı bütün azotların protein kaynaklı olduğu varsayılarak ($N \times 6.25$), hesaplama yoluyla bulundu (AOAC, 2000; Krell, 1996). Metodun esasları 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 5 g polen örneği Kjeldahl tüpüne konuldu. Örnek üzerine 15 g potasyum sülfat, 1 mL bakır sülfat, 25 mL sülfürik asit sırasıyla ilave edildikten sonra 2,5 saat yakma ünitesinde kademeli olarak sıcaklık artırılarak ve nötralizasyon düzeneğine (% 16'lık NaOH) bağlı olarak yakıldı. Yakma işlemi tamamlandığında tüpler oda sıcaklığına gelinceye kadar soğutuldu. Destilasyonda % 4 lük indikatörlü borik asitten her örnek için 50 mL kullanıldı. Her örnek yaklaşık 3 dakika destile edildi. Destilasyon ünitesinde kullanılan NaOH % 32'lidir. Destilasyondan sonra 0,1 N HCl ile destilat titre edilerek harcanan miktar kaydedildi ve hesaplama yapıldı.

$$\% \text{ Protein} = [(V_S - V_B) \times F \times 100 \times 0.0014] / W$$

Formülde;

F: Protein tayini için kullanılan sabit (6,25)

V_S : Örnek için harcanan 0,1 N HCl miktarı (mL)

V_B : Tanık için harcanan 0,1 N HCl miktarı (mL)

W : Örnek ağırlığı (5 g) dir.

3.3.4. pH Tayini

Numunelerin pH tayinleri Yetim ve Kesmen (2008)'e göre pH metre kullanılarak yapıldı. Numuneler saf suyla % 20'lik süspansiyon haline getirildi, 45 dakika beklendi ve sıvı kısımda ölçüm yapıldı.

3.3.5. Nişasta Tayini

Nişasta tayini Ewers metoduna göre yapıldı (Elgün vd., 2005). 5 g örnek 100 mL'lik ölçü balonuna alınıp, üzerine 50 mL %1'lik HCl çözeltisi ilave edildi. Numunenin dibe yapışmaması için balon joje iyice çalkalandı, 95-100°C'daki su banyosunda 15 dakika bekletildi. Bu sürenin ilk 3 dakikası çalkalamaya devam edildi. Süre sonunda balon su banyosundan çıkarıldı, üzerine 30-35 mL saf su eklenip soğutuldu. Serbest hale gelen azotlu maddeleri çöktürmek için balona % 4'lük fosfor wolfram asidi çözeltisinden 10 mL eklendi. Balon saf su ile ölçü çizgisine kadar dolduruldu, berrak çözelti elde edilinceye kadar filtre kâğıdında süzüldü. Süzüntü 2 dm'lik polarimetre tüpüne konarak çevirme derecesi okundu. Okuma 5 defa tekrar edilerek ortalaması alındı. Belirlenen çevirme derecesi 5.4734 çevirme faktörü ile çarpılarak % nişasta miktarı tespit edildi. Aşağıdaki formül kullanılarak da hesaplama yapılabilir.

$$\% \text{ Nişasta} = \frac{a.10000}{(a) D^{20} . L . b}$$

Burada;

a : Polarimetrede okunan çevirme açısı

(a) D^{20} : Buğday nişastası için Ewers metoduna göre çevirme derecesi: 182,7

L : Polarimetre tüpünün desimetre cinsinden uzunluğu

b : Örnek miktarı (g)

3.3.6. Pektin Tayini

Yöntem, meyvelerde uygulanan pektin tayin yöntemi (Tanker vd., 1996) modifiye edilerek kullanıldı. Polenler, 40-45°C'da kurutuldu, 25 g kuru polen üzerine 400 mL su eklendi, 3 N H_2SO_4 ile pH 2,0'ye ayarlandı. Karıştırılarak 85-90°C'da 2 saat hidroliz edildi. Hidroliz sonucu oluşan pektin ekstresi posadan ayrıldı. Posa asitli su ile ikinci ve üçüncü kez hidroliz edildi. Süzüntüler birleştirilip, alkol derecesi 55° oluncaya kadar etil alkol eklenerek pektin çöktürüldü. Çöken pektin, Buchner hunisinden süzülüp 50°C'da kurutuldu ve tartılarak verim hesaplandı.

3.3.7. Eter Ekstraktı (Ham Yağ) Tayini

Polen örnekleri yarı sürekli solvent ekstraksiyon sisteminde, Sokshalet yöntemi ile eter kullanılarak 7 saat boyunca ekstraksiyona tabi tutuldu ve ekstrakt, rotary evaporatöründe eterin uzaklaştırılması ile elde edildi (Yetim ve Kesmen, 2008).

3.3.8. Toplam Fenolik Madde Tayini

Analiz Slinkard vd. (1977)'ne göre yapıldı. Toplam fenolik madde tayininin esası fenolik bileşiklerin bazik ortamda Folin-Ciocalteu ayracını indirgeyip kendilerinin oksitlenmiş forma dönüştüğü bir redoks reaksiyonuna dayanmaktadır. Folin-Ciocalteu ayracı burada oksitleyici bileşik olarak rol almaktadır. Reaksiyon sonucunda indirgenmiş ayracın oluşturduğu mavi rengin fotometrik olarak ölçülmesiyle, analizi yapılan örnekteki fenolik bileşiklerin toplam miktarlarının hesaplanması mümkün olmaktadır. Oluşan kompleksin renk şiddeti fenolik maddelerin konsantrasyonu ile doğru orantılı olup, 760 nm'de absorbans verir.

Çalışmada, standart grafiğin hazırlanmasında, fenolik bir madde olan gallik asit standardı kullanıldı (Slinkard vd., 1977; Singleton ve Rossi 1965). Gallik asitin farklı konsantrasyonları (0,5; 0,25; 0,125; 0,0625; 0,03125 ve 0,015625 mg/mL) hazırlanıp, absorbansları okundu. Konsantrasyona karşılık bulunan absorbans değerleri ile grafik çizildi. Çizilen grafiğe göre polen ekstraktlarının toplam fenolik madde miktarı bulundu, seyreltme faktörleri de dikkate alınarak asıl numunenin mg GAE (Gallik asit eşdeğeri)/g polen olarak fenolik madde miktarı bulundu. Yapılan çalışma aşağıda Tablo 7 'de toplu olarak verildi.

Tablo 7. Toplam fenolik madde tayininde yapılan pipetleme işlemleri

	Kör	Standart	Test
Distile su	0,1 mL	-	-
Standartlar	-	0,1 mL	-
Polen numunesi	-	-	0,1 mL
Distile su	5 mL	5 mL	5 mL
0,2 N Folin Reaktifi	0,5 mL	0,5 mL	0,5 mL
%2 Na ₂ CO ₃	1,5 mL	1,5 mL	1,5 mL
Tüpler vorteks ile karıştırılır ve 3 dakika sonra 2 saat inkübe edilir, 760 nm'de köre karşı absorbans okunur			

3.3.9. Toplam Flavonol Tayini

Fenolik bileşiklerden flavonollerin tayini Fukumoto ve Mazza (2000)'ya göre yapıldı. Metanolle 1:400 seyreltilen ve santrifüj edilen polen ekstraktları çalışmada kullanıldı. Aynı zamanda standart olarak Kuarsetinin 0,25; 0,125; 0,0625; 0,03125; 0,015625 mg/mL'lik bir seri çözeltisi metanol içerisinde hazırlandı. Çalışmada numune ve standartlara ait pipetlemeler aşağıdaki gibi yapıldı.

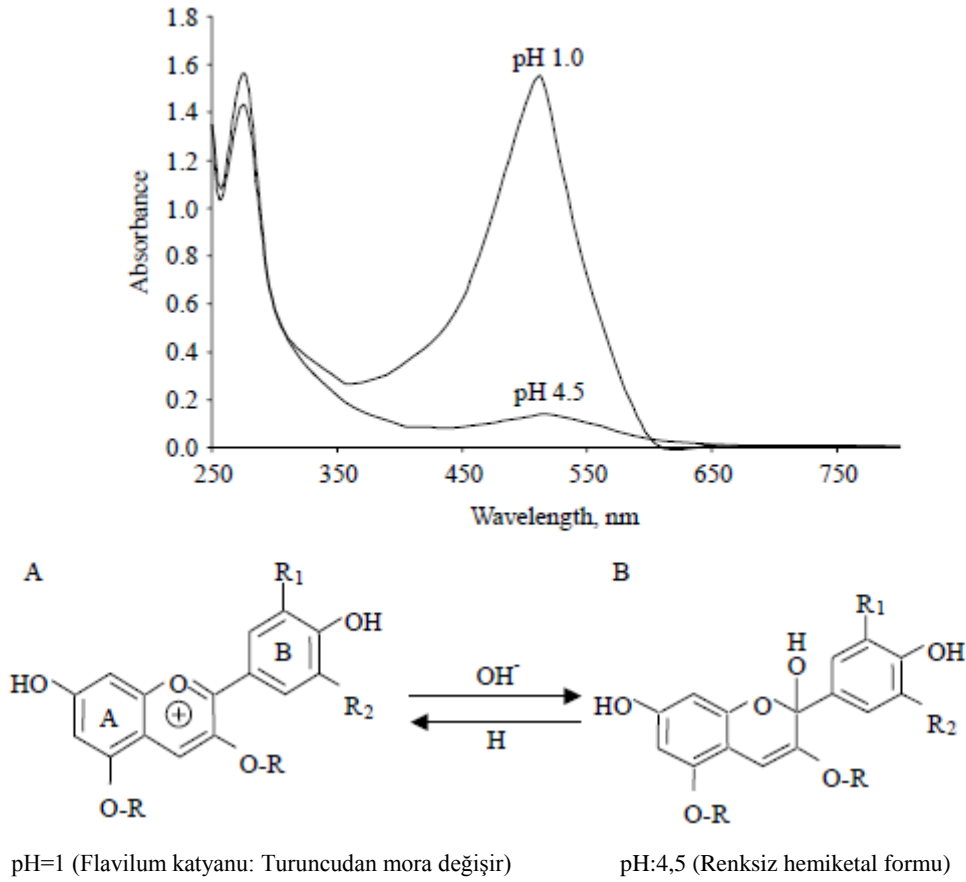
Tablo 8. Toplam flavonol tayininde yapılan pipetleme işlemleri

	Kör	Renk Körü	Standart	Numune
Numune Değişen konsantrasyonlarda	-	0,5	-	0,5
Kuarsetin Standartları (mL)	-	-	0,5	-
Mutlak Metanol (mL)	4,8	4,5	4,3	4,3
%10 Al(NO ₃) ₃ (mL)	0,1	-	0,1	0,1
1 M NH ₄ .CH ₃ COO (mL)	0,1	-	0,1	0,1
40 dk. Oda sıcaklığında inkübe edildi ve 415 nm'de saf suya karşı okundu.				

Konsantrasyona karşılık bulunan absorbans değerleri ile grafik çizildi. Çizilen grafiğe göre polen ekstraktlarının toplam flavonol miktarı bulundu, seyreltme faktörleri de dikkate alınarak asıl numunenin mg Kuarsetin eşdeğeri/g polen olarak flavonol miktarı bulundu.

3.3.10. Toplam Antosiyanin Tayini

Toplam antosiyaninlerin tayini pH-differansiyel metoduyla yapıldı (Wrolstad, 1976; 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 (Şekil 11). Buna göre ortam pH'sı 1,0 ve 4,5 olduğu zaman ölçülen absorbans değerlerinin farkı, doğrudan antosiyanin konsantrasyonu ile orantılı bulunmaktadır. Yöntem son derece basit ve duyarlıdır.



Şekil 11. Antosiyaninlerin pH 1 ve 4.5'de (UV-Vis) spektrumları

Yöntem modifiye edilerek tayin yapıldı. 2,5 g polen 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 3.000 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 kestane polenin 520–530 nm dalga boyu aralığında maksimum absorptans ($\lambda_{\text{vis-max}}$) 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 absorptans değerleri ölçüldü ve aşağıdaki eşitliklerden faydalanmak suretiyle toplam monomerik antosiyanin içeriği hesaplandı. Hesaplama antosiyanin miktarları ifade edilirken o gıdadaki başat (baskın) antosiyanin hangisi ise onun cinsinden ifade edilmektedir. Elde edilen maksimum absorptans değerini veren dalga boyunun Siyanidin-3-glukozitin maksimum absorptans verdiği dalga boyuna denk geldiği için sonuçlar Siyanidin-3-glukozit (Cyn-3-glu) cinsinden hesaplanarak ifade edildi.

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

$$A : (A_{\lambda_{520}} - A_{\lambda_{700}})_{\text{pH } 1.0} - (A_{\lambda_{520}} - A_{\lambda_{700}})_{\text{pH } 4.5}$$

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

Burada;

A : Düzeltilmiş absorptans farkı

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

S_f : Seyreltme faktörü

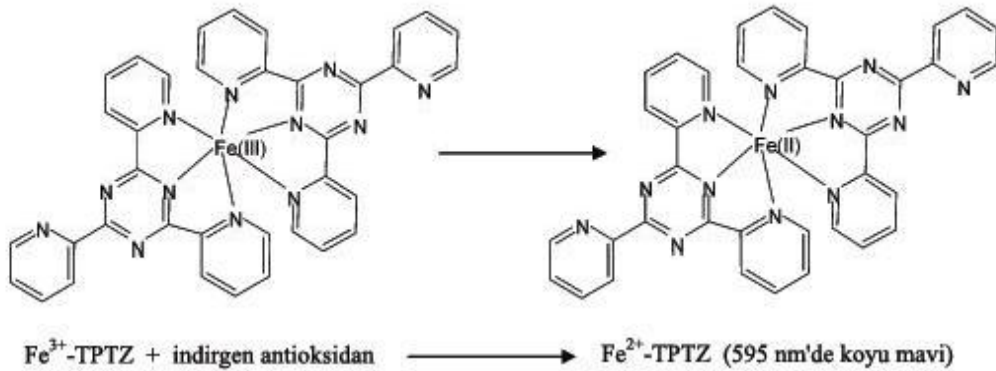
ϵ : Molar absorbtivite katsayısı (Siyanidin-3-glukozit için: 26.900) (Giusti ve Wrolstad, 2001)

3.3.11. Toplam Karotenoid Miktarı Tayini

Numunelerin karotenoid içerikleri Davis (1976) ile Pirone vd., (2007)'nin yöntemlerine göre bulundu. Polen örnekleri birkaç kez aseton-petrol eteri (1:1) ile (-18 °C) ekstrakte edildi. Ekstraktların spektrofotometrede 460 nm'de okumaları yapıldı, molar absorbtivite katsayısı 2000 olarak alınarak β -karoten cinsinden toplam miktarları tespit edildi.

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

Yöntem, Fe(III)-TPTZ (2,4,6-tris (2-piridil)-S-triazin) kompleksinin antioksidanlar varlığında indirgenerek mavi renkli kompleks Fe(II)-TPTZ oluşturması (Şekil 12) ve bu kompleksin 593 nm'de maksimum absorbans vermesi esasına dayanmaktadır (Benzie ve Strain, 1999). FRAP yöntemi nispeten basit bir yöntem olup, kolaylıkla standardize edilebilmektedir. Bitkisel ekstraktlardaki antioksidan kapasitenin ölçülmesinde FRAP (Fe (III) indirgeme gücü (Ferrik reducing/antioksidan power)) metodu geçerli bir yöntem olarak kabul edilmektedir (Benzie ve Strains, 1996).



Şekil 12. Demir (III)'ün indirgenme reaksiyonu

Kalibrasyon için Trolox[®]'un değişen konsantrasyonları (31.25 – 62.5 – 125 – 250 – 500 - 1000 μM) kullanılarak çalışma eğrisi hazırlandı. Devamında 3 mL FRAP reaktifi [300 mM pH 3.6 asetat tamponu: 10 mM TPTZ: 20 mM FeCl_3 (10: 1: 1)] ile 100 μL numune karıştırıldı, 0. dakikada ve 4 dakika sonra 593 nm'de absorbansları okundu.

Çalışma eğrisi için de numune yerine Troloks[®], un değişen konsantrasyonları kullanılarak absorbanslar tespit edildi.

Sonuçlar (numunelerin FRAP değerleri) aynı şartlarda test edilmiş standart Troloks[®] la karşılaştırmalı olarak bulundu, sonuçlar μM Troloks[®] eşdeğeri antioksidan güç olarak ifade edildi (TEAC).

Tablo 9. FRAP tayininde yapılan pipetleme işlemleri

	Kör _{met}	Test (Numune)	Renk Kör _{test(met)}	Renk Kör _{test(su)}	Troloks
FRAP Reaktifi (mL)	3	3	-	-	3
Numune (μL)	-	100	100	100	-
Troloks (Değişen kons.) (μL)	-	-	-	-	100
FeSO ₄ .7H ₂ O (Değişen kons)	-	-	-	-	-
Destile Su (mL)	-	-	-	3	-
Metanol	100 μL	-	3 mL	-	-

met: metanol

Renk Kör_{test(met)} : Metanolde çözünen numune için renk köru

Renk Kör_{test(su)} : Suda çözünen numune için renk köru

3.3.13. HPLC ile Şeker Tayinleri

HPLC ile polenlerde fruktoz, glukoz ve sakkaroz miktarı tayin edildi. Yöntemde filtre edilmiş polen çözeltilisinin şeker içeriği RI-dedektör ile HPLC’de tayin edildi. Piklerin geliş zamanlarına göre kalitatif tayin, pik alanlarına göre de kantitatif şeker tayini yapıldı (Bogdanov, Baumann, 1998).

Çalışmada fruktoz, glukoz ve sakkaroz şeker standartları ile çalışıldı. Öncelikle cihazın kalibrasyonu için bu şekerlerin standart çözeltileri hazırlandı. Bunun için; fruktozdan 2.000 g, glukozdan 1.500 g, sakkarozdan 0,250 g tartılıp hepsi 100 ml’lik ölçülü balona aktarıldı. %25’lik Metanol ile çözülüp işaret çizgisine kadar yine % 25’lik metanol ile tamamlandı. Standart çözeltiden değişik konsantrasyonlarda çözeltiler hazırlandı (Tablo 10). Böylece hazırlanmış olan standart çözeltileri 0,45 μm filtreden

geçirilip viallere alındı. Bu standart çözeltilerin HPLC cihazında RI- detektöründe okutarak geliş zamanlarına göre kalibrasyon grafikleri oluşturuldu.

Tablo 10. Fruktoz, glukoz ve sakkaroz standart çözeltilerinden hazırlanan kalibrasyon çözeltileri

Standart şeker çözeltileri	Hazırlanışı	Konsantrasyonları Fruktoz/Glukoz/Sakkaroz
Standart şeker çözeltisi 1	300 µL alıp 5 mL'lik balon jodede işaret çizgisine kadar %25'lik metanolle tamamlandı.	0,012 / 0,009 / 0,002
Standart şeker çözeltisi 2	600 µL alıp 5 mL'lik balon jodede işaret çizgisine kadar %25'lik metanolle tamamlandı.	0,024 / 0,018 / 0,003
Standart şeker çözeltisi 3	1200 µL alıp 5 mL'lik balon jodede işaret çizgisine kadar %25'lik metanolle tamamlandı.	0,048 / 0,036 / 0,006
Standart şeker çözeltisi 4	3000 µL alıp 5 mL'lik balon jodede işaret çizgisine kadar %25'lik metanolle tamamlandı.	0,110 / 0,074 / 0,013
Standart şeker çözeltisi 5	Standart şeker çözeltilerinin kendisi direk kullanıldı.	0,198 / 0,148 / 0,025

Homojenize edilmiş polen numunelerinden alınan 5 g'lık tartımlar 40 mL saf suda çözüldükten sonra 100 mL'lik ölçülü balona aktarıldı. Üzerine 25 mL metanol ilave edildi. Saf su ile işaret çizgisine kadar tamamlanıp ağzı kapatıldı. Hazırlanan çözeltiler 0,45 µm filtreden geçirilerek viallere alındı ve şartlanmış olan HPLC sistemine enjekte edildi.

HPLC Şartları:

Akış hızı: 1.3 mL/min

Kolon sıcaklığı: 30±1 °C

Enjeksiyon hacmi: 20 µL

Hareketli faz: Asetonitril/su (%80)

3.3.14. RP-HPLC-UV ile Fenolik Bileşiklerin Tayini

Polen numunesi yapısı itibarıyla polar çözücülerde kolaylıkla çözünür. Bu nedenle RP-HPLC-UV analizlerinde kullanılmak üzere numunelerin stok metanolik ekstraktları

hazırlandı. 1,35 g olarak tartılan polen numuneleri 15 mL metanolle muamele edildi, 6 saat boyunca 60 °C'de, sonikatörde, geri soğutucu altında, metanol ile ön ekstraksiyonu yapıldı. Çözelti içerisinde var olan katı partiküller adi süzgeç kağıdıyla süzildükten sonra eş hacimde olacak şekilde santrifüj tüplerine konuldu ve 4.000 rpm'de 5 dakika boyunca santrifüj edildi. Üst kısımdaki berrak çözelti yeniden Waltman (No:4) süzgeç kâğıdıyla süzülüp 25 mL'lik bir balon jojeye aktarıldı ve son hacim metanolle 25 mL'ye tamamlandı. Metanolik ekstrakt 40 °C rotary evaporatörde uçuruldu. Elde edilen kalıntı 10 mL pH'sı 2'ye ayarlı HCl çözeltisinde çözülerek dietileter ve etil asetat ekstraksiyonu uygulandı ve ekstraktlar birleştirilerek organik çözücüler uçuruldu. Kalıntı uygun miktarda metanol ile çözülerek RP-HPLC-UV ile analiz edildi.

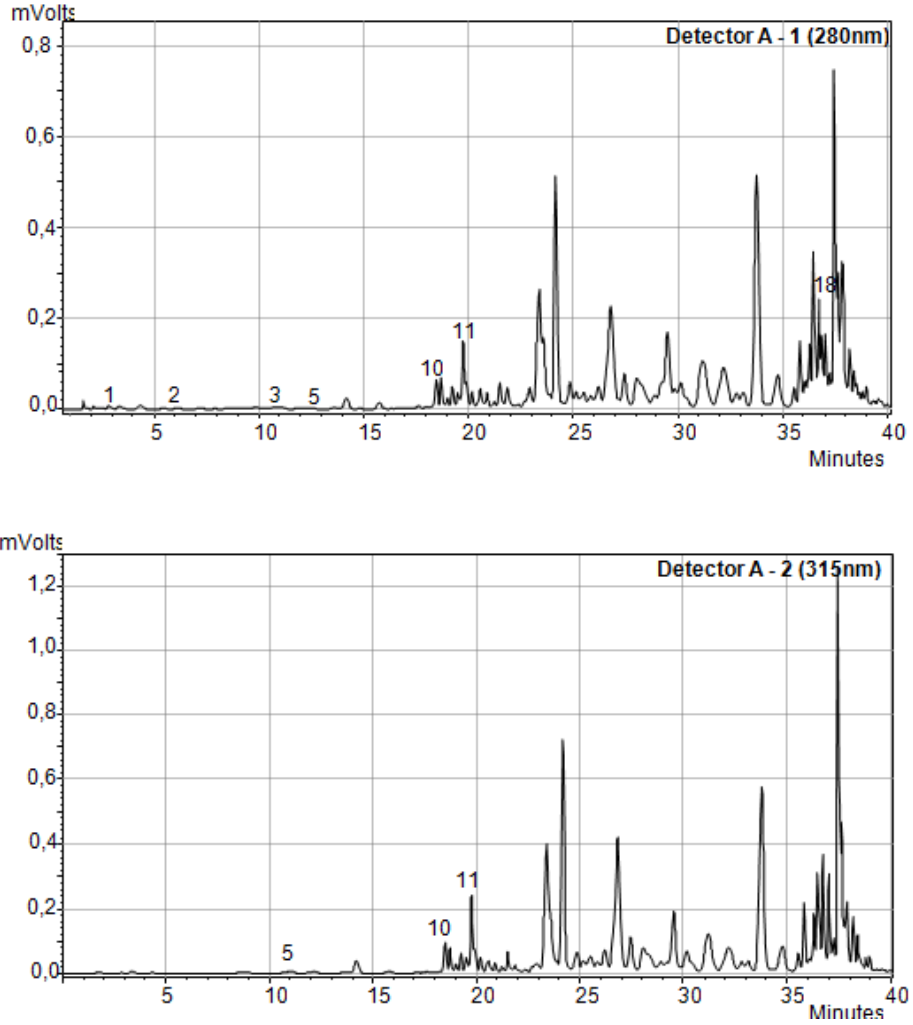
3.3.14.1. Standartlar ve Kalibrasyon

RP-HPLC-UV analizleri için analitik derecede 17 fenolik standart; gallik asit, protokatekuik asit (3,4-dihidroksi benzoik asit), kateşin, gentisik asit (*p*-hidroksi benzoik asit), klorojenik asit, vanilik asit, kafeik asit, siringik asit, epikateşin, *p*-kumarik asit, benzoik asit, *o*-kumarik asit, *cis*, *trans*-absisik asit, *trans*-sinnamic asit, rutin, ferulik asit, kuersetin ve iç standart olarak da propilparaben kullanıldı.

Tüm stok çözeltiler % 100 metanolde 1mg/mL konsantrasyonda hazırlandı. 17 standardın 2,5; 5; 10; 20; 25; 50 ve 100 mg/mL'lik kalibrasyon örnekleri stok çözeltilerin % 30'luk metanolde seyreltilmesiyle hazırlandı. Bitkilerin propil paraben içermemesi ve sudaki çözünürlüğünün yüksek oluşundan dolayı bu sentetik bileşik iç standart olarak kullanıldı. Propil paraben HPLC analizlerinde standart bileşiklere yakın ve en son elue olmaktadır. Analiz süresinin uzamasına sebep olmaması ve analiz süresi zarfında elue olması tercih sebeplerindedir. Polen numuneleri propil paraben ihtiva etmemekte ve bütün standartların piklerinden rahatça ayrılmaktadır. Gallik asit, protokatekuik asit, *p*-hidroksi benzoik asit, kateşin, vanillik asit, şiringik asit, epikateşin, benzoik asit, *o*-kumarik asit, *cis*,*trans*-absisik asit ve *trans*-cinnamik asit standartlarının kalibrasyonu için 280 nm ve klorojenik asit, kaffeik asit, *p*-kumarik asit, ferulik asit, rutin ve kuersetin standartlarının kalibrasyonu için 315 nm dalga boyları kullanıldı.

İç standart olan propil parabenin stok çözeltisinden her bir kalibrasyon çözeltisine son konsantrasyonu 10 ppm olacak şekilde eklendi. Her bir standardın konsantrasyonuna

karşı, oluşan pik alanları iç standardın pik alanına bölünerek oluşan oran kullanılarak kalibrasyon eğrileri elde edildi.



Şekil 12. Çalışmaya ait 280 ve 315 nm'deki RP-HPLC-UV fenolik standartlar:
 1: Gallik asit, 2: Protokatekuik asit, 3: *p*-hidroksi benzoik asit,
 5: Klorojenik asit, 10: *p*-Kumarik asit, 11: Rutin, 18: Propilparaben

3.3.14.2. RP-HPLC-UV Koşulları

RP-HPLC-UV analizleri iki dalga boyunda (280 ve 315 nm) aynı anda cevap alınabilen UV dedektör ile donanımlı Shimadzu LC-UV sisteminde yapıldı. Analizler Agilent ZORBAX Eclipse XDB-C18 ters faz kolonu (150x4.6 mm, 5µL) kullanarak ve asetonitril, su ve asetik asitle gradient program uygulanarak gerçekleştirildi (Villers vd.,

2004). Enjeksiyon hacmi 50 μL 'ye, akış hızı 1 ml.dk⁻¹'ya ve kolon sıcaklığı kolon fırınında 30 °C'ye ayarlandı (Öztürk vd., 2007).

Çalışmada her bir bileşik için dedeksiyon limiti (LOD) pik yüksekliklerinin standart sapmalarının 3 katı olarak ve yüzde bağıl standart sapması (%BSS) pik alanı ve alıkonma zamanlarından hesaplandı. Kantitatif olarak analitlerin belirlenme limiti (LOQ) ise yine pik yüksekliklerinin standart sapmalarının 9 katı olarak hesaplandı.

Tablo 11. Geliştirilen LC-UV metodunun parametreleri

No	RT	Standartlar	R ²	%BSS(RT)	%BSS(Alan)	LOD*	LOQ*
1	2,97	Gallik asit	0,999	0,320	2,377	0,042	0,126
2	5,771	Protokatekuik asit	0,999	0,183	3,842	0,048	0,144
3	10,347	<i>p</i> -hidroksi benzoik asit	0,999	0,119	4,966	0,038	0,114
4	12,061	Kateşin	0,999	0,115	2,124	0,028	0,085
5	12,97	Klorogenik asit	0,999	0,107	8,732	0,039	0,119
6	14,125	Vanilik asit	0,999	0,094	2,692	0,029	0,088
7	14,618	Kafeik asit	0,999	0,094	1,928	0,037	0,112
8	16,075	Siringik asit	0,999	0,085	2,474	0,046	0,138
9	17,018	Epikateşin	0,999	0,073	5,222	0,036	0,108
10	18,609	<i>p</i> -Kumarik asit	0,999	0,054	0,517	0,104	0,312
11	19,421	Rutin	0,999	0,077	3,709	0,032	0,097
12	19,834	Ferulik asit	0,999	0,745	0,897	0,054	0,162
13	21,625	Benzoik asit	0,999	0,075	1,854	0,033	0,101
14	22,29	<i>o</i> -Kumarik asit	0,999	0,076	1,687	0,036	0,109
15	26,456	<i>cis,trans</i> -Absisik asit	0,999	0,089	2,138	0,024	0,072
16	28,409	Kuersetin	0,999	0,131	3,956	0,027	0,083
17	29,525	<i>trans</i> -Sinnamik asit	0,999	0,114	4,554	0,036	0,109
18	36,911	Propilparaben (IS)		0,026	3,193	0,293	0,880

3.3.15. Palinolojik Çalışmalar

3.3.15.1. Gliserin-Jelatin Hazırlanması

Polenlerin palinolojik (polen türlerinin mikroskopik analizleri) değerlendirmesi Erciyes Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Biyoteknoloji öğretim üyelerinden sayın Doç. Dr. Sibel SİLİCİ'nin tecrübelerinden yararlanmak suretiyle kendi laboratuvarında birlikte

yapıldı. Jelatin plakları 2-3 saat ılık distile su içerisinde bırakılarak yumuşaması sağlandı. Bir ölçü erimiş jelatin 1,5 ölçü gliserin ile karıştırıldı, içerisine yeterli miktarda renklendirme için safranin, % 2-3 oranında küflenmeyi engellemek için fenol katıldı, karışım 80 °C ye kadar ısıtılıp (kaynatılmadan) petri plaklarına döküldü.

3.3.15.2. Preparat Hazırlanması

Polen tuzaklarından alınan polenlerden tesadüfi olarak 10'ar gramlık örnekler alındı, bu örneklerden renklerine göre ayırmak suretiyle peletler gruplandırıldı, ağırlıklarına göre oranlandı ve her bir peletten 4-5 preparat hazırlanarak incelemeye geçildi.

Polenlerin tanımları; polen tipi, polen şekli, ambalaj şekli, ekzin kalınlığı, skulptur gibi özellikler dikkate alınarak yapıldı.

Polenlerin incelenmesi Nikon Eclipse-E400 ışık mikroskobu ile yapıldı. Polen tanımlarında x40 ve x100 immersiyon objektif kullanıldı.

3.4. Deneysel Hayvan Çalışmaları

3.4.1. Deney Grupları ve Uygulamalar

Grup I (7 sıçan): (Serum fizyolojik kontrol grubu) Sıçanlara periton içi (intreperitonal: i.p.) yolla, karnın sol tarafına, yedi gün boyunca 0.2 mL serum fizyolojik (SF) verildi (0,8 mL/kg).

Grup II (7 sıçan): (Zeytin yağı kontrol grubu) Sıçanlara i.p. yolla karnın sol tarafına, yedi gün boyunca 0,8 mL/kg zeytin yağı verildi.

Grup III (7 sıçan): (Etil alkol kontrol grubu) Sıçanlara i.p. yolla karnın sol tarafına, yedi gün boyunca 0,8 mL/kg etil alkol verildi.

Grup IV (7 sıçan): (CCl₄ Grubu) Karbontetraklorür (CCl₄) ve zeytin yağı birebir oranında (1:1) karıştırılarak, 0,8 mL/kg dozunda karnın sağ tarafına verildi (Handa ve Sharma, 1990).

Grup V (7 sıçan): (Silibinin grubu) Karbontetraklorür (CCl₄) ve zeytin yağı birebir oranında (1:1) karıştırılarak, 0.8 mL/kg dozunda karnın sağ tarafına verildi. Arkasından etil alkolde hazırlanmış silibinininden 50 mg/kg dozunda karnın sol tarafına verildi (Horvath vd., 2001).

Grup VI (7 sıçan): (Polen 200 mg/kg grubu) Karbontetraklorür (CCl₄) ve zeytin yağı birebir oranında (1:1) karıştırılarak, 0.8 mL/kg dozunda karnın sağ tarafına verildi. Arkasından gavaj yoluyla 200 mg/kg dozunda suda çözülmüş polen sıçanlara verildi.

Grup VII (7 sıçan): (Polen 400 mg/kg grubu) Karbontetraklorür (CCl₄) ve zeytin yağı birebir oranında (1:1) karıştırılarak, 0.8 mL/kg dozunda karnın sağ tarafına verildi. Arkasından gavaj yoluyla 400 mg/kg dozunda suda çözülmüş polen sıçanlara verildi.

3.4.2. Vücut Ağırlığı Takibi

Sıçanlar sekiz gün boyunca $\pm 0,1$ hassasiyetteelektronik tartı ile her gün aynı saatlerde günlük olarak tartıldı. 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: Sekizinci gündeki ağırlık ölçümü (g)

Ağırlık₁: Birinci gün ölçülen ağırlık (g)

3.4.3. Dekapitasyon, Materyallerin Alınması ve Ön işlemler

Son uygulamadan 24 saat sonra (8. gün) tüm gruptaki sıçanlar dekapitasyon yapılarak feda edildi. Giyotinle dekapite edilir edilmez cam huni kullanılarak kanlar % 3,2'lik sodyum sitrat içeren tüplere akıtılarak kan örnekleri alındı. Zaman kaybedilmeden karıştırılarak antikoagülan madde ile kanın karışması sağlandı.

Sıçanların karaciğerleri çıkarıldı. Karaciğer biyokimyasal çalışmalar için kullanılacak olup, karaciğer parçaları soğuk % 1,15'lik KCI ile yıkandı ve % 1,15'lik KCI içerisinde muhafazaya alındı. Daha sonra buzlu bir su banyosu içinde homojenizatörde (17500 L/dak.) homojenize edildi. Santrifüj tüplerine alınan homojenat, soğutmalı santrifüjde 4000

rpm'de 15 dak. santrifüj edildi. Süpernatant kısımları eppendorflara alındı ve -80 °C'daki dondurucuda saklandı.

Kanlar 2500 rpm'de 15 dakika santrifüj edilip plazmaları pastör pipeti ile eppendorflara alındı. Elde edilen plazmalar -80°C'daki dondurucuda saklandı.

Plazma eldesinde dipteki çökelti üzerine eşit miktarda serum fizyolojik eklendi, karıştırıldı ve 2500 rpm'de 15 dakika santrifüj edildi. Üst kısım atıldı. Bu işlem 3 kez yinelendi. Dipteki çökelti üzerine 1,5 katı kadar soğuk saf su eklendi, karıştırıldı ve bu şekilde eritrosit paketleri elde edildi.

3.4.4. Biyokimyasal İncelemeler

Karaciğer süpernatantlarının MDA seviyelerine ve SOD aktivitelerine bakıldı. Ayrıca kan örneklerinden elde edilen plazmalarda rutin biyokimyasal parametrelerden AST, ALT parametreleri otoanalizörde, alınan ticari kitlerle biyokimya laboratuvarında çalışıldı. Yine plazmalarda MDA seviyeleri ve SOD aktiviteleri tespit edildi. Eritrosit MDA seviyeleri ve SOD aktiviteleri ile Redükte Glutasyon (GSH) aktivitesi incelendi. Eritrositlerde hemoglobin seviyeleri tespit edildi ve sonuçlar g hemoglobin üzerinden sunuldu.

3.4.4.1. Lipit Peroksidasyon Seviyesinin Ölçülmesi

Lipit peroksidasyonun yıkım ürünlerinden olan MDA'nın, tiyobarbitürik asit (TBA) ile reaksiyona girmesi sonucu oluşan pembe renkli kompleksin 532 nm dalga boyunda verdiği absorbansın spektrofotometrik olarak ölçülmesi prensibine dayanır. İki mol TBA asidik ortamda ve 85-100 °C sıcaklıkta bir mol MDA ile birleşerek mor renkli TBA-MDA kompleksini oluşturur (Ohkawa, 1979).

3.4.4.1.1. Karaciğer Lipit Peroksidasyon Seviyesinin Ölçülmesi

Karaciğer homojenatlarında MDA seviyeleri Mihara ve Uchiyama'nın (1978) spektrofotometrik metoduna göre yapıldı. Daha önce hazırlanan ve -80 °C'da bekletilen homojenatlar -20°C'lik dolaba alındı. Bu ara bekleme bölmesinden sonra çıkarılarak çözdürüldü ve bekletilmeden işleme geçildi. 0,5 mL homojenat alındı. Üzerine 3 mL %1'lik H₃PO₄ eklenerek karıştırıldı. Daha sonra 1 mL % 0,67'lik tiyobarbitürik asit (TBA)

eklendi ve karışım 45 dakika kaynayan su banyosunda tutuldu. Karışım oda sıcaklığında 4000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi ve 532 nm'de absorbansı okundu.

Standartların hazırlanmasında 1,1,3,3-Tetrametoksipropan kullanıldı. 10; 5; 2,5; 1,25; 0,625 nmol/mL'lik standartlardan ve körden (saf su) 0.5 mL alınıp üzerlerine H₃PO₄ ve TBA eklendi, su banyosunda 45 dakika bekletilip 532 nm de absorbansı mikro plate okuyucuda okundu. Sonuçlar nmol MDA/mL homojenat olarak ifade edildi.

3.4.4.1.2. Plazmada Lipit Peroksidasyon Seviyesinin Ölçülmesi

Daha önce elde edilmiş ve -80 °C'da bekletilen plazmalar -20 °C'lik dolaba alındı. Bu ara bekleme bölmesinden sonra çıkarılarak çözdürüldü ve bekletilmeden işleme (Yagi, 1994) geçildi.

Tablo 12. Plazmada lipit peroksidasyon seviyesinin ölçülmesi için yapılan pipetleme işlemleri

Reaktifler	Numune (mL)
Plazma	0.15
0,084 N H ₂ SO ₄	1.2
% 10'luk Fosfotungstik asit	0.15

Hafif vortekslenerek 5 dakika beklendi. 1500 g (4600 rpm)'de 10 dakika santrifüj edildi. Üst faz atıldı. Çöken kısım 2'şer mL deiyonize su ilavesiyle vortekslenerek tekrar çözüldü. Her bir numunenin üzerine 0.5 mL TBA reaktifi eklendi ve kaynayan suda 1 saat beklendi. Çıkarılıp 4000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi ve 532 nm'de absorbansları okundu.

Standartların hazırlanması da benzer şekilde yapıldı. Ancak pipetlemelerde 2 mL standart için 0.5 mL TBA eklenerek su banyosuna atıldı. Sonuçlar nmol MDA/mL plazma olarak ifade edildi. Bu metot serumda da aynı şekilde uygulanabilir.

3.4.4.1.3. Eritrosit Paketlerinde Lipit Peroksidasyon Seviyesinin Ölçülmesi

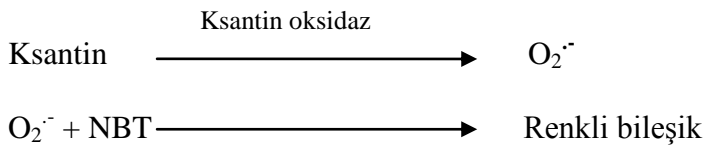
Daha önce elde edilmiş ve $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'da bekletilen eritrosit paketleri $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'lik dolaba alındı. Bu ara bekleme bölmesinden sonra çıkarılarak çözdürüldü ve bekletilmeden işleme geçildi.

50 μL eritrosit paketi üzerine 450 μL azitli PBS ilave edildi. Elde edilen 500 μL 'lik karışım $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'da 10 dakika karıştırıldı. Üzerine 250 μL PBS ilave edildi. 2 saat süreyle $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ '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 absorbansları okundu.

MDA standartlarından ayrı bir eppendorfa 150 μL alınıp aynı işlem süpernatant aşamasından sonra gerçekleştirildi.

3.4.4.2. Karaciğer Homojenatlarında, Plazmalarda ve Eritrosit Paketlerinde Süperoksit Dismütaz (SOD) Aktivitesinin Ölçülmesi

Ksantin oksidaz enziminin ksantini metabolize etmesi esnasında ortaya çıkan $\text{O}_2^{\cdot-}$ radikalinin NBT'yi redüksiyonu sonucunda oluşan mavi rengin şiddetinin ölçülmesi esasına dayanmaktadır (Durak vd., 1996).



Numunelerde SOD aktivite tayinlerinde Sun vd.'nin (1998) metodu kullanıldı. SOD aktivite tayinleri için öncelikle taze olarak bir reaksiyon karışımının hazırlanması gerekmektedir. Bu karışım hazırlanırken toplam çözeltideki derişimlerin 0.6 mmol/L EDTA, 400 mmol/L Na_2CO_3 , Ksantin 0.3 mmol/L, 1 g/L BSA (Bovine Serum Albumin:sığır serum albümin) ve çalışmanın hemen öncesinde ilave edilmesi gereken 150 $\mu\text{mol/L}$ NBT (nitroblue tetrazolium) gereklidir. 80 tüp için 200 mL reaksiyon karışımı yeterli olmaktadır. Bu konsantrasyonlar için bir behere 196 mL saf su alındı, üzerine sırasıyla 0,00867 g EDTA, 1,02 g Na_2CO_3 , 0,003646 g Ksantin, 0,012 g BSA eklendi ve

kariştırıldı. 0,08176 g NBT uygulama aşamasının hemen 6ncesinde ilave edilerek reaksiyon karişımı hazır hale getirildi.

Ksantine oksidaz enziminin bu 7alışmada 167 8nite/L'lik bir konsantrayonda, buzlu $(\text{NH}_3)_2\text{SO}_4$ i7erisinde taze olarak hazırlanması gereklidir. Stok Ksanthine oksidaz enzimimiz:

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

$$18500 \text{ U/L} \cdot X = 167000 \text{ U/L} \cdot 4 \text{ mL}$$

$X = 0.0361 \text{ mL}$: 36.1 μL stok Ksantin oksidaz'dan alındı, 4 mL'ye buzlu $(\text{NH}_3)_2\text{SO}_4$ ile tamamlandı.

7alışmada fosfat tamponu ile (veya saf suyla) SOD standartları 20, 10, 8, 6, 4, 2, 1, 0 (k6r) U/L olacak şekilde hazırlandı.

Daha 6nce elde edilmiş ve $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ 'da bekletilen numuneler $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ 'lik dolaba alındı. Bu ara bekleme b6lmesinden sonra 7ıkarılarak 76zd6r6ld6 ve bekletilmeden işleme ge7ildi.

Her bir numune i7in k6r 7alışıldı. Numune t6plerine 6l76m reaktifi, numune ve ksantin oksidaz enzimi; k6r t6plerine ise 6l76m reaktifi ve ksantin oksidaz enzimi konuldu. T6pler 25°C 'da 20 dakika ink6be edildi. Ink6basyondan sonra k6r t6plerine 1 mL CuCl_2 ; numune t6plerine 1 mL CuCl_2 ve 500 μL numune, standartlara ise 500 μL standart ve 1 mL CuCl_2 eklendi. İyice kariştırdıktan sonra her bir t6p6n absorbanı 560 nm'de distile suya karşı okutuldu. SOD enziminin y6ntemi ayrıntılı olarak aşağıda verildi.

100 μL numune (eritrosit paketi, karaciğer homojenatı veya plazma) 6zerine 900 μL saf su eklendi ve vortekslendi. Bu karişımdan ayrı bir t6pe 600 μL alındı, 6zerine 480 μL kloroform:etanol (3:5) karişımından eklendi. Oluşan yeni karişım 15.000 g'de 1 saat santrif6j edildi. Santrif6j sonrası elde edilen s6pernatanttan 500 μL alındı ve 6zerine NBT'si yeni eklenmiş reaksiyon karişımından 2,5 mL eklendi. Kariştırılan t6pler $25 \text{ }^\circ\text{C}$ 'da ink6bat6re yerleştirildi ve beklenmeden her t6pe 50 μL Ksantin oksidaz eklendi, 20 dakika bu sıcaklıkta ink6basyona terk edildi. 20. dakikadan sonra t6plere 1'er mL CuCl_2 eklendi, kariştırıldı ve absorbanları mikro plate okuyucuda okundu.

3.4.4.3. Red6kte Glutasyon (GSH) Seviyelerinin Belirlenmesi

Eritrosit red6kte glutasyon seviyeleri Garcia vd., (2008)'ye g6re HPLC kullanılarak yapıldı. 100 μL hemozilat 40 μL 0,3 mM EDTA 76zeltisi 6zerine eklendi. 100 μL % 20'lik (w/v) Triton X-100 ile 1 dakika vorteksle kariştırıldı. Proteinlerin t6revlendirilmesi i7in 10 mL %15'lik (w/v) trikloroasetik asit eklendi ve 18.000 g'de 10 dakika santrif6j edildi.

Türevlendirme 130 µL süpernatant, 500 µL 0,5 M Tris-HCl buffer (pH 8.9) ve 350 µL 5 mM DTNB (0.5 M K₂HPO₄ pH 8,0 içinde) kullanılarak gerçekleştirildi. 5 dakika buz banyosunda tutulduktan sonra çözelti 100 µL 7,0 M H₃PO₄ ile asitlendirildi ve 3000 g'de 10 dakika santrifüj edildi. Daha sonra türevlendirilen örnek 0,22 µm membrandan filtre edildi ve her filtrattan 20 µL HPLC kolonuna (ZORBAX Eclipse XDB-C18; 4,6x150 mm;5 µ, Agilent Technologies) enjekte edildi. Mobil faz phase 25 mM KH₂PO₄ (pH 3,8) ve metanolden oluşturuldu. Tutunma zamanı ve pik alanlarına göre GSH seviyeleri belirlendi ve sonuçlar µmol/g Hb olarak ifade edildi.

3.5. İstatistiksel Analiz

Verilerin değerlendirilmesinde SPSS (Statistical Package for Social Sciences) 15.0 for Windows® istatistik paket programı ve Microsoft® Excel (for windows XP) kullanıldı. Veriler tek yönlü varyans analizi (One-way ANOVA) ile test edildi. Sonuçlar ortalama ± standart hata olarak ifade edildi ve p<0.05 olasılık değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi. Gruplar arasında istatistikî 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. Ayrıca diskriminant analizi de SPSS programında Fisher's Lineer Discriminant fonksiyonu kullanılarak yapıldı.

4. BULGULAR

4.1. Kestane Poleninin Özellikleri

Polenlerin içerikleri toplandıkları bitkiden bitkiye, iklim şartlarına, havadaki nispi nem miktarına, tuzaklandıkları kovanın bulunduğu yere, toprağa yakınlığına, mevsimine, toplanan polenlerin saklandıkları yere göre farklılık göstermektedir.

4.1.1. Su içerikleri (%)

Kovanlardaki polen tuzaklarından arıcılar tarafından alınan polenler güneş altında bir müddet bekletilerek alındığı için polenlerin sahip olduğu su içerikleri birbirinden farklılık göstermektedir. Su içeriği tayini yapılırken literatürdeki benzer yöntemlerden faydalanılmış olup, numuneler yaklaşık 44–48 saatte 45°C'daki etüvde sabit ağırlığa getirildi % su içerikleri tespit edildi.

Numunelere ait su içerikleri yaş ağırlık esasına göre Tablo 13'de verildi.

4.1.2. Kül Miktarları (%)

Numuneler kül miktarı tayinleri yapılırken öncesinde etil alkol ile yaş yakma işlemine tabi tutuldu ve sonrasında asıl yakmaya geçildi. Örneklerin % kül miktarları kuru maddede % kül miktarı olarak aşağıdaki formüle göre hesaplandı ve Tablo 13'de verildi.

$$\% \text{ Kül (Kuru Maddede)} = \frac{100 \cdot (b-a)}{\text{Ö}} \cdot \frac{100}{100 - S}$$

a: Yakma kabı darası (g)

b: Kül+Dara (g)

Ö: Örnek miktarı (g)

S: Örneğin su miktarı (%)

4.1.3. Protein Miktarları (%)

Yarı otomatik makro Kjeldahl yakma ünitesinde yapılan azot miktarı tespiti ardından polenlerin hesaplanarak bulunan protein miktarları kuru maddeleri üzerinden yeniden hesaplandı ve Tablo 13' de verildi.

Tablo 13. Kestane polenlerinin su içerikleri, kül miktarları ve protein içerikleri (%)

Numune Adı	Su İçeriği (%)	Kül Miktarı (%)	Protein Miktarı (%)
Ereğli Kestane Poleni (ZP1)	14,03 ± 0,42 ^a	2,23 ± 0,21 ^a	23,67 ± 2,08 ^b
Zonguldak Kestane Poleni (ZP2)	15,70 ± 0,35 ^b	2,43 ± 0,21 ^a	20,67 ± 1,53 ^{ab}
Giresun Kestane Poleni (GP)	17,47 ± 0,47 ^c	2,93 ± 0,06 ^b	17,67 ± 1,53 ^a
Trabzon Kestane Poleni (TP)	16,87 ± 0,99 ^c	3,03 ± 0,15 ^b	18,00 ± 1,73 ^a

* Her bir değer, üç tekrardan elde edilen sonuçların ortalamasını ve ± standart sapmasını göstermektedir. Küçük harfle gösterilen indisler örnek farklılığının polen özelliği üzerine etkisinin istatistiksel olarak önem derecesini göstermektedir(p<0,05).

4.1.4. pH Değerleri

Polen örneklerinin pH ölçümleri suyla hazırlanmış süspansiyon içerisinde yapıldı ve sonuçları Tablo 14' de verildi.

4.1.5. Nişasta Miktarları (%)

Ewers metoduna göre yapılan ön işlemlerin ardından polarimetre kullanılarak numunelere ait çevirme açıları belirlendi ve formül yardımıyla nişasta miktarları bulundu. Kuru madde üzerinden hesaplanarak % olarak Tablo 14' de ifade edildi.

4.1.6. Pektin Miktarları (%)

H₂SO₄ ile numunelerden elde edilen pektin ekstresi etil alkol eklenerek çöktürüldü, buchner hunisinden süzüldü ve verim kuru madde üzerinden hesaplanarak bulundu. Numunelere ait pektin içerikleri Tablo 14’de verildi.

4.1.7. Ham Yağ Miktarları (%)

Kestane poleni örneklerinin eter ekstrakt fraksiyonları Sokshalet yöntemi ile belirlendi ve kuru madde üzerinden Tablo 14’de ifade edildi.

Tablo 14. Kestane polenlerinin pH değeri, nişasta, pektin ve ham yağ miktarları (%)

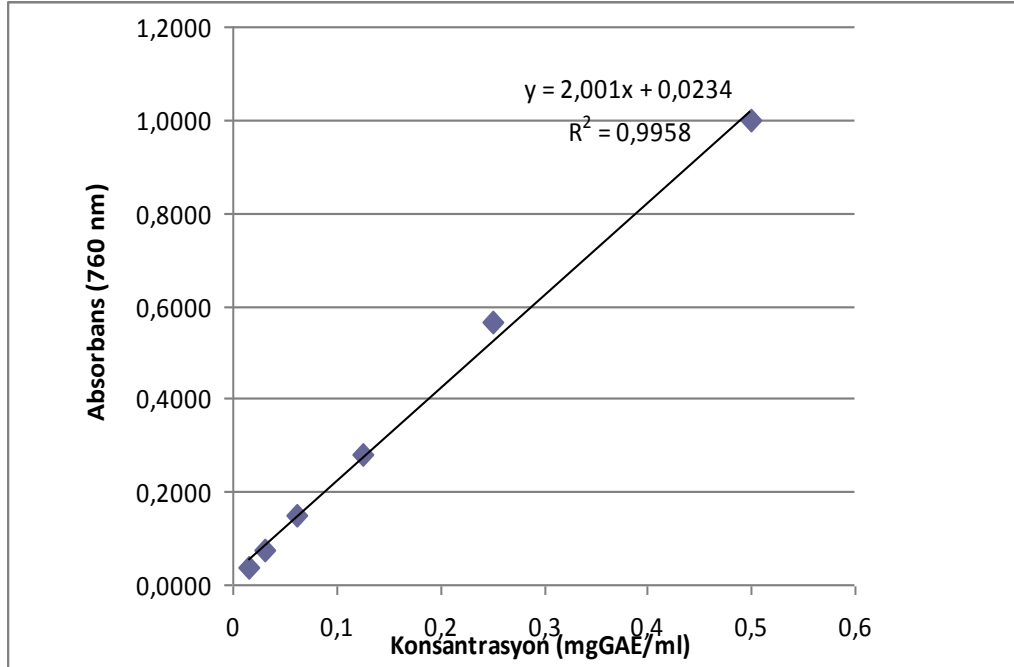
Numune Adı	pH	Nişasta Miktarları (%)	Pektin Miktarları (%)	Ham Yağ Miktarları (%)
ZP1	6,43 ± 1,31 ^a	6,83 ± 0,29 ^a	8,57 ± 1,01 ^a	5,87 ± 2,39 ^a
ZP2	6,13 ± 1,01 ^a	6,67 ± 1,15 ^a	8,80 ± 0,72 ^a	5,40 ± 3,05 ^a
GP	5,20 ± 0,26 ^a	7,33 ± 1,53 ^a	10,77 ± 1,50 ^a	5,53 ± 2,84 ^a
TP	4,83 ± 0,68 ^a	7,67 ± 0,58 ^a	9,70 ± 1,15 ^a	6,07 ± 2,55 ^a

* Her bir değer, üç tekrardan elde edilen sonuçların ortalamasını ve ± standart sapmasını göstermektedir. Küçük harfle gösterilen indisler örnek farklılığının polen özelliği üzerine etkisinin istatistiksel olarak önem derecesini göstermektedir(p<0,05).

4.1.8. Toplam Fenolik Madde Miktarları

Toplam fenolik madde miktarı (polifenol) tayininde spektrofotometrik yöntemden faydalanıldı ve referans fenolik madde olarak gallik asit standardı kullanıldı. Polen örneklerinin hazırlanan metanolik ekstraktlarında spektrofotometrenin okuma sınırları içerisinde kalacak şekilde seyreltme işlemleri yapıldıktan sonra toplam fenolik madde miktarları gallik asit standardına göre tayin edildi. Konsantrasyon tayini için ilk önce değişik konsantrasyonlarda hazırlanan (0,5; 0,25; 0,125; 0,0625; 0,03125 ve 0,015625

mg/mL) standart gallik asit çözeltileri ile Bölüm 3.3.8'de anlatılan metoda göre toplam fenolik madde miktarları tayin edildi. Elde edilen 760 nm'deki absorbans değerleri y-ekseninde ve konsantrasyon değerleri ise x-ekseninde gösterilerek bir standart çalışma grafiği hazırlandı (Şekil 14). Elde edilen standart çalışma grafiğinde absorbans konsantrasyonla doğru orantılı olup, $R^2(0,9958)$ değeri oldukça iyi bulundu. Hazırlanan standart çalışma grafiği kullanılarak 1 g polenin içerdiği polifenol miktarı (Tablo 15), 760 nm'de ölçülen absorbans değerleri kullanılarak mg GAE (Gallik asit eşdeğeri)/ g polen olarak belirlendi. Daha sonra elde edilen değerler, literatürle kıyaslanmanın yapılabilmesi için kuru madde üzerinden hesaplanarak Tablo 15'de verildi.



Şekil 14. Gallik asit standardı kullanılarak hazırlanan standart çalışma grafiği

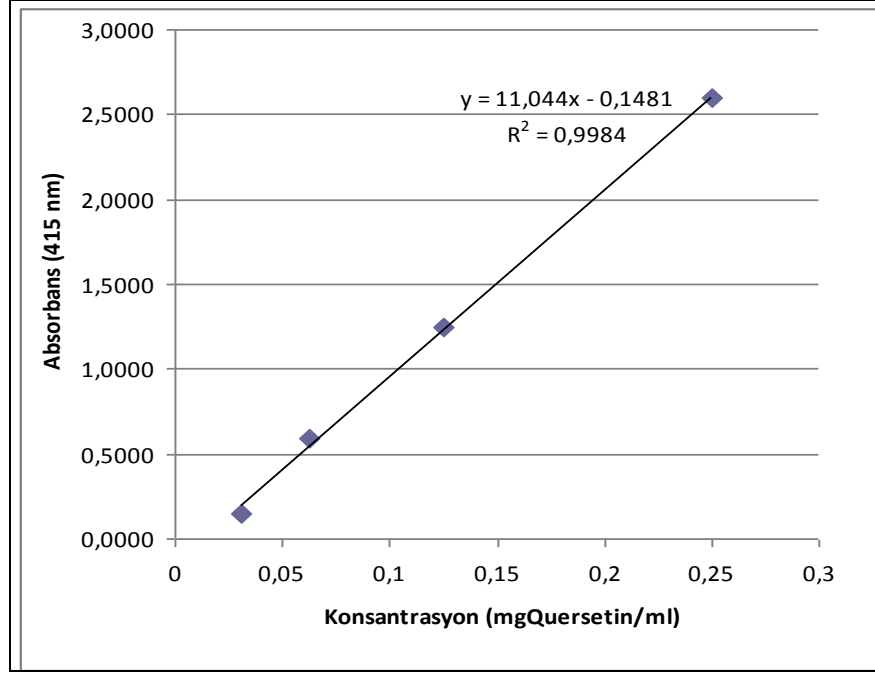
Tablo 15. Kestane polenlerinin toplam fenolik madde miktarları (TFMM)

Numune Adı	TFMM (mgGAE/ g polen) (Yenilen yaş ağırlık üzerinden)	TFMM (mgGAE/ g kuru polen) (Kuru Madde üzerinden)
ZP1	24,82 ± 2,14 ^d	28,87±2,48 ^d
ZP2	21,68 ± 1,46 ^c	25,72±1,73 ^c
GP	11,29 ± 0,34 ^a	13,68±0,41 ^a
TP	17,19 ± 0,97 ^b	20,67±1,17 ^b

* Her bir değer, üç tekrardan elde edilen sonuçların ortalamasını ve ± standart sapmasını göstermektedir. Küçük harfle gösterilen indisler örnek farklılığının polen özelliği üzerine etkisinin istatistiksel olarak önem derecesini göstermektedir(p<0,05).

4.1.9. Toplam Flavonol Miktarları

Flavonollerin miktar tayininde spektrofotometrik yöntem kullanıldı ve referans flavonol madde olarak Kuarsetin standardı kullanıldı. Polen örneklerinin hazırlanan metanolik ekstraktlarında spektrofotometrenin okuma sınırları içerisinde kalacak şekilde seyreltme işlemleri yapıldıktan sonra toplam flavonol miktarları Kuarsetin standardına göre tayin edildi. Konsantrasyon tayini için ilk önce değişik konsantrasyonlarda hazırlanan (0,25; 0,125; 0,0625; 0,03125; 0,015625 mg/mL) standart Kuarsetin çözeltileri ile Bölüm 3.3.9'da anlatılan metoda göre flavonol miktarları tayin edildi. Elde edilen 415 nm'deki absorbans değerleri y-ekseninde ve konsantrasyon değerleri ise x-ekseninde gösterilerek bir standart çalışma grafiği hazırlandı (Şekil 15). Elde edilen standart çalışma grafiğinde absorbans konsantrasyonla doğru orantılı olup $R^2(0,9984)$ değeri oldukça iyi bulundu. Hazırlanan standart çalışma grafiği kullanılarak 1 g polenin içerdiği flavonol miktarı (Tablo 16), 415 nm'de ölçülen absorbans değerleri kullanılarak mg Kuarsetin eşdeğeri / g polen olarak belirlendi. Daha sonra elde edilen değerler literatürle kıyaslamının yapılabilmesi için kuru madde üzerinden hesaplanarak Tablo 16'de verildi.



Şekil 15. Kuersetin standardı kullanılarak hazırlanan standart çalışma grafiği.

Tablo 16. Polenlerin toplam flavonol miktarları

Numune Adı	Toplam flavonol miktarı (mg Kuersetin/ g polen)	Toplam flavonol miktarı (mg Kuersetin/ g kuru polen)
ZP1	6,93± 0,71 ^a	8,07±0,83 ^a
ZP2	8,13± 0,78 ^a	9,64±0,93 ^a
GP	7,82± 0,47 ^a	9,48±0,57 ^a
TP	7,80± 0,83 ^a	9,38±1,0 ^a

* Her bir değer, üç tekrardan elde edilen sonuçların ortalamasını ve ± standart sapmasını göstermektedir. Küçük harfle gösterilen indisler örnek farklılığının polen özelliği üzerine etkisinin istatistiksel olarak önem derecesini göstermektedir (p<0,05).

4.1.10. Toplam Antosiyanin Miktarları

Antosiyaninler birçok meyve, sebze ve çiçeklerin kendine has kırmızı, sarı, mor, pembe, viole, mavi renklerinden sorumlu suda çözünür bileşikler olduğu için numunelerin seyreltilmeleri de su kullanılarak yapıldı. Ancak, dokudaki antosiyaninlerin dokudan ekstre

edilmesi için %1'lik HCl ile asitlendirilmiş etil alkol ile ekstraksiyonu yapıldı (Giusti ve Wrolstad, 2001). Ekstraksiyonda renk maddelerinin ekstraksiyon verimini artırmak için süre uzatıldı ve bu işlem -18°C 'da yapıldı.

Ekstraktın içerisindeki başat antosiyaninin hangi dalga boyunda maksimum absorbans verdiğini belirlemek için pH 1,0'deki seyreltisinin UV-Vis spektrofotometrede 250–600 nm arasındaki spektrumu tespit edildi ve 520–530 nm dalga boyu aralığında maksimum absorbans ($\lambda_{\text{vis-max}}$) verildiği görüldü.

Ancak, burada asıl sorun örneğin seyreltme derecesinin saptanmasıdır. Çalışmada numuneler ön seyreltmeye tabi tutuldu. Bu amaçla örnekler pH 1,0'deki KCl tampon çözeltisinde öyle seyreltildi ki; $\lambda_{\text{vis-max}}$ dalga boyundaki absorbans değerlerinin 0,4 – 0,6 arasında kalması sağlandı. Bu yolla seyreltme faktörleri her bir örnek için dikkatlice hesaplandı.

pH 1,0 ve pH 4,5'da hazırlanmış çözeltilerdeki örneklerin bu bekleme sonucunda 520 ve 700 nm dalga boylarında, suya karşı saptanan absorbans değerleri ölçüldü ve eşitliklerden faydalanmak suretiyle toplam monomerik antosiyanin içeriği hesaplandı. Elde edilen maksimum absorbans değerini veren dalga boyunun Siyanidin-3-glukozitin maksimum absorbans verdiğini dalga boyuna denk geldiği için, sonuçlar, Siyanidin-3-glukozit (Cyn-3-glu) cinsinden hesaplanarak Tablo 17'de hem yaş ağırlık üzerinden, hem de kuru ağırlık üzerinden verildi

Tablo 17. Kestane polenlerinin toplam monomerik antosiyanin miktarları

Numune Adı	Toplam Monomerik Antosiyanin miktarı (mg/kg)	
	mg Cyn-3-glu /kg yaş polen	mg Cyn-3-glu /kg kuru polen
ZP1	79,70 ± 21,68 ^b	92,71±25,21 ^b
ZP2	53,25 ± 15,75 ^{ab}	63,16±18,63 ^{ab}
GP	44,83 ± 12,83 ^a	54,32±15,53 ^a
TP	57,64 ± 12,05 ^{ab}	69,33±14,50 ^{ab}

* Her bir değer, üç tekrardan elde edilen sonuçların ortalamasını ve ± standart sapmasını göstermektedir. Küçük harfle gösterilen indisler örnek farklılığının polen özelliği üzerine etkisinin istatistiksel olarak önem derecesini göstermektedir ($p<0,05$).

4.1.11. Toplam Karotenoid Miktarları

Kestane polenlerinin yapısı incelendiğinde açık sarı, sarı, değişik tonlarda turuncu, açık yeşil, açık kahverengi gibi renk karışımı içerdiği anlaşılmaktadır. Numunelerdeki toplam karotenoid miktarları bölüm 3.3.10'da anlatıldığı şekilde yapıldı ve kestane polenlerinin kuru madde üzerinden içerdikleri karoten miktarları β -karoten cinsinden mg/100 g kuru polen olarak hesaplanarak ve Tablo 18'da verildi.

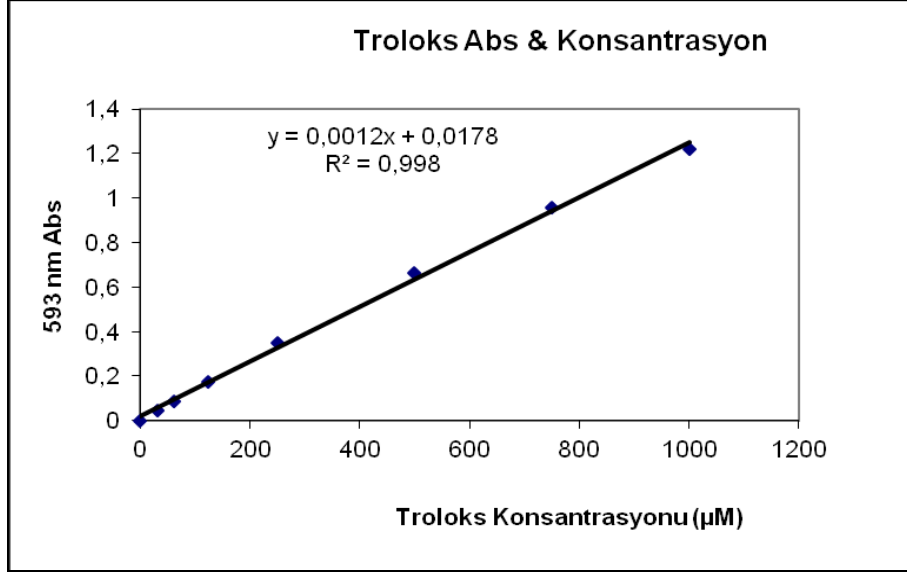
Tablo 18. Kestane polenlerinin toplam karotenoid miktarları

Numune Adı	Toplam Karotenoid Miktarı mg β -karoten/100 g kuru pollen
ZP1	29 \pm 9 ^a
ZP2	21 \pm 5 ^a
GP	17 \pm 5 ^a
TP	20 \pm 8 ^a

* Her bir değer, üç tekrardan elde edilen sonuçların ortalamasını ve \pm standart sapmasını göstermektedir. Küçük harfle gösterilen indisler örnek farklılığının polen özelliği üzerine etkisinin istatistiksel olarak önem derecesini göstermektedir ($p < 0.05$).

4.1.12. FRAP Antioksidan Kapasite

Kalibrasyon amacıyla hazırlanan Troloks[®]'un değişik konsantrasyonlarındaki çözeltilerden faydalanılarak 3 mL FRAP reaktifi ile 100 μ L Troloks[®] çözeltisi karıştırıldı. 0. dakikada ve 4 dakika sonra 593 nm'de absorbans okundu. Her bir konsantrasyona karşılık aynı işlemler yapılmak suretiyle absorbans değerleri elde edildi. Konsantrasyona karşılık gelen absorbans değeri grafiğe geçirildi (Şekil 16).



Şekil 16: Troloks® konsantrasyonlarına karşılık absorbans grafiği

Devamında 3 mL FRAP reaktifi ile 100 µL numune karıştırıldı. 0. dakikada ve 4 dakika sonra 593 nm’de absorbansları okundu. 0. ve 4. dakikadaki absorbans farkları alınarak elde edilen son absorbansa karşılık gelen Troloks® konsantrasyonundan yola çıkarak, seyreltme faktörleri de dikkate alınarak numunelerin antioksidan kapasitesi mM Troloks® eşdeğeri /g yaş polen ve mM Troloks® eşdeğeri /g kuru polen olarak antioksidan güç (TEAC) ifade edildi.

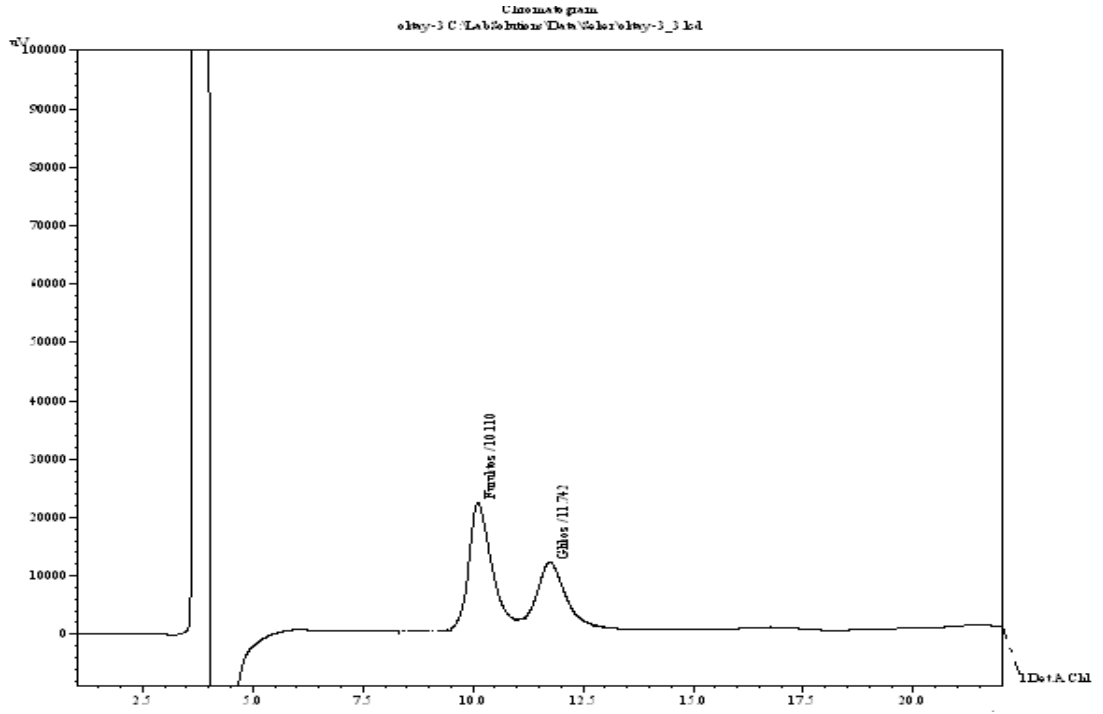
Tablo 19. Kestane polenlerinin TEAC değerleri

Numune Adı	(TEAC) mM Trolox eşdeğeri / g yaş polen	(TEAC) mM Trolox eşdeğeri / g kuru polen
ZP1	70,76 ± 2,07 ^b	82,31 ± 2,41 ^b
ZP2	61,04 ± 3,25 ^a	72,41 ± 3,86 ^a
GP	56,16 ± 4,15 ^a	68,04 ± 5,03 ^a
TP	59,45 ± 2,51 ^a	71,51 ± 3,02 ^a

* Her bir değer, üç tekrardan elde edilen sonuçların ortalamasını ve ± standart sapmasını göstermektedir. Küçük harfle gösterilen indisler örnek farklılığının polen özelliği üzerine etkisinin istatistiksel olarak önem derecesini göstermektedir (p<0,05).

4.1.13. Şeker Miktarları

Şeker tayinleri için metanol ile farklı konsantrasyonlarda hazırlanan fruktoz, glukoz ve sakkaroz şeker standartları 0,45 µm filtreden geçirilip viallere alındı. Bu standart çözeltilerin HPLC cihazında RI- detektöründe okutarak geliş zamanlarına göre kalibrasyon grafikleri oluşturuldu.



Şekil 17. Polenlerin HPLC kromatogramı

Kalibre edilen kromatografi cihazına gerekli ön işlemler uygulanmış polenler enjekte edildikten sonra kromatogramları takip edildi. İncelenen tüm polen örneklerimizde glukoz ve fruktoza değişen oranlarda rastlanmasına rağmen, indirgen olmayan sakkarozu analiz limitleri içerisinde rastlanmadı. Analizin doğruluğunu saptamak için numuneler asidik ortamda da hidroliz edildi, ancak dedeksiyon limitleri içerisinde sakkarozu rastlanmadı.

Numunelerde tespit edilen glukoz ve fruktoz miktarları Tablo 20’de verildi.

Tablo 20. Polenlerin glukoz ve fruktoz içerikleri (kuru maddede %)

	Glukoz	Fruktoz
ZP1	27,93 ± 1,41 ^a	41,74 ± 2,36 ^{ab}
ZP2	25,35 ± 1,15 ^a	37,72 ± 2,19 ^a
GP	30,95 ± 3,02 ^b	45,36 ± 4,29 ^b
TP	37,35 ± 1,02 ^c	54,21 ± 1,92 ^c

* Her bir değer, üç tekrardan elde edilen sonuçların ortalamasını ve ± standart sapmasını göstermektedir. Küçük harfle gösterilen indisler örnek farklılığının polen özelliği üzerine etkisinin istatistiksel olarak önem derecesini göstermektedir ($p < 0,05$).

4.1.14. Fenolik Bileşikler

RP-HPLC-UV kullanılarak metanolik polen ekstraktlarında yapılan fenolik bileşik tayinlerinde 17 fenolik standart (gallik asit, protokatekuik asit (3,4-dihidroksi benzoik asit), kateşin, gentisik asit (*p*-hidroksi benzoik asit), klorojenik asit, vanilik asit, kafeik asit, siringik asit, epikateşin, *p*-kumarik asit, benzoik asit, *o*-kumarik asit, *cis,trans*-absisik asit, *trans*-sinnamic asit, rutin, ferulik asit, kuersetin) ve iç standart olarak da propilparaben kullanıldı, 280 ve 315 nm'deki fenolik standart pikleri ile optimizasyon sağlandı. Fenolik asitlerin tanınması ve miktarının belirlenmesi için UV spektrumları ve alıkonma zamanları standartlarla karşılaştırıldı. Çalışılan ZP1 polenlerinde fenolik asit dağılımı Tablo 21'de verildi. Fenolik asitlerden gallik asit, protokuik asit, *p*-hidroksibenzoik asit, klorojenik asit ve *p*-kumarik asit polen örneklerinde belirli miktarlarda tespit edilirken diğer çalışılan fenolik asitler dedeksiyon limitlerinin (LOD) altında bulundu.

Tablo 21. ZP1 Polenlerindeki fenolik asit dağılımları

Pik No	Standartlar	Sonuç (µg/g yaş polen)
1	Gallik Asit	19,42
2	Protokatekuik asit	16,96
3	<i>p</i> -OH Benzoik asit	28,58
4	Kateşin	<LOD
5	Klorojenik asit	68,73
6	Vanilik asit	<LOD
7	Kaffeik asit	<LOD
8	Şiringik asit	<LOD
9	Epikateşin	<LOD
10	<i>p</i> -Kumarik asit	27,10
11	Rutin	<LOD
12	Ferulik asit	<LOD
13	Benzoik asit	<LOD
14	<i>o</i> -Kumarik asit	<LOD
15	Absisik asit	<LOD
16	Kuersetin	<LOD
17	<i>t</i> -Sinnamik asit	<LOD
18	Propilparaben	IS

4.1.15. Palinolojik Değerlendirmeler

Bitkilerin üreme organları olan spor ve polenlerin incelendiği palinolojik çalışmalarımızda örneklerimizin polen teşhisleri yapıldı ve polenlerimizin hangi bitkilerden gelen polenleri içerdiği tespit edildi.

Yapılan polen analizi neticesinde 9 familyaya ait polenlerin baskın olduğu görüldü. Bu familyalardan dördü tür düzeyinde teşhis edilirken (*Castanea sativa*, *Rhamnus cathartica*, *Zea mays*, *Myrtus communis*) diğerleri cins düzeyinde (*Medicago* spp., *Trifolium* spp., *Aster* spp., *Cirsium* spp., *Carduus* spp., *Apium* spp., *Dianthus* spp., *Malus* spp.,) teşhis edildi. Bu tespit edilen tür ve cinsler içerisinde *Castanea sativa* (kestane)'nin polenler içerisinde baskın olduğu tespit edildi.

Fabaceae: *Medicago* spp., *Trifolium* spp.:Yonca, Üçgül

Fagaceae: *Castanea sativa*: Kestane

Asteraceae: *Aster* spp., *Cirsium* spp., *Carduus* spp.: Yıldızpatı, Devedikeni, Eşekdikeni.

Apiaceae: *Apium* spp.: Kereviz

Caryophyllaceae: *Dianthus* spp.: Karanfil

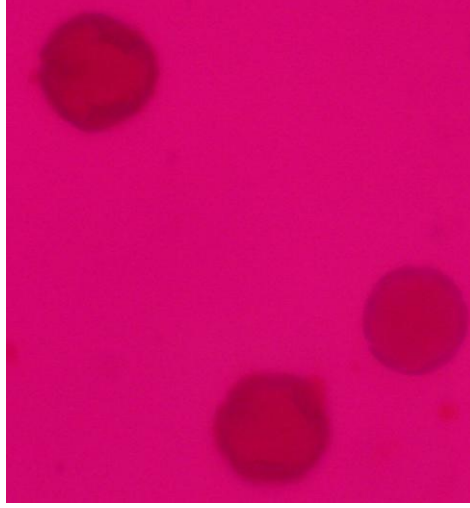
Poaceae: *Zea mays*: Mısır

Rosaceae: *Malus* spp., Elma

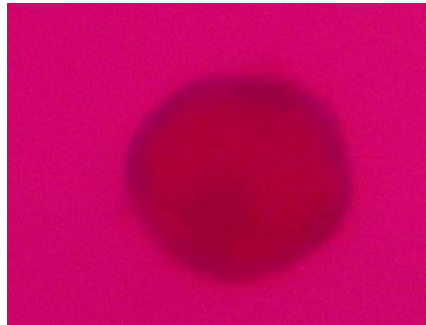
Myrtaceae: *Myrtus communis*: Yaban mersini

Rhamnaceae: *Rhamnus cathartica*: Akdiken

Tespit edilen polen görüntülerinden kestane poleni resimleri Resim 6 ve 7'de sunuldu.



Şekil 18. *Castanea sativa* polenlerinin görüntüsü



Şekil 19. *Castanea sativa* polenin görüntüsü

4.2. Sıçanlara Ait Sonuçlar

4.2.1. Vücut Ağırlığı Takibi

Sıçanların ağırlık takipleri sekiz gün boyunca yapıldı ve 8. gün sonundaki ağırlıkları ve ilk günkü ağırlıkları baz alınarak ağırlık değişimleri hesaplandı (Tablo 22).

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

Ağırlık₈: 8. gündeki ağırlık ölçümü (g)

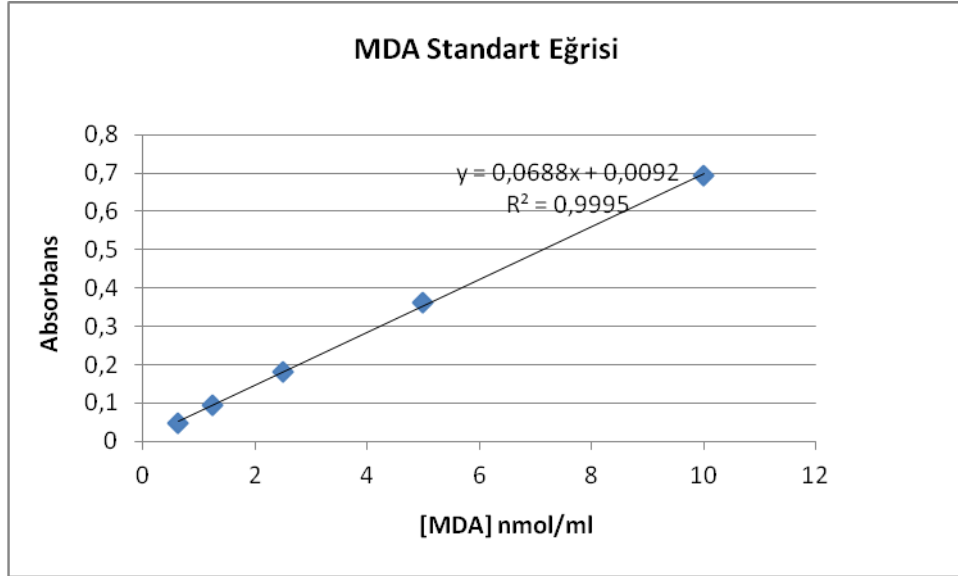
Ağırlık₁: Birinci gün ölçülen ağırlık (g)

Tablo 22. Sıçanların ağırlık değişimleri

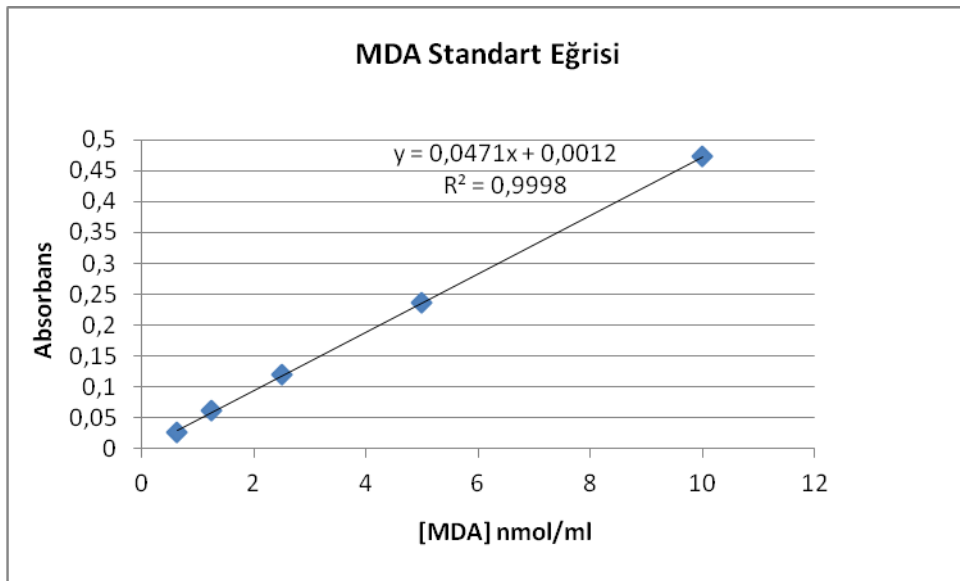
Grup No	Grup Adı	Grup Ağırlık Ortalaması (g)		Ağırlık Değişim Oranı (%)
		1.Gün	8.Gün	
1	Serum Fizyolojik (SF)	313,4	315,7	+ 0,7 (1,07) ^b
2	Zeytin Yağı (ZY)	307,9	310,1	+ 0,7 (1,07) ^b
3	Etil alkol (EA)	306,4	289,8	- 5,4 (0,946) ^a
4	CCl ₄	308,7	279,3	- 9,5 (0,905) ^a
5	Silibinin (Sil)	311,1	285,7	- 8,2 (0,918) ^a
6	Polen 200 mg/kg (P2)	304,3	290	- 6,7 (0,933) ^a
7	Polen 400 mg/kg (P4)	305,3	300,4	- 1,6 (0,984) ^{ab}

4.2.2. Biyokimyasal Bulgular

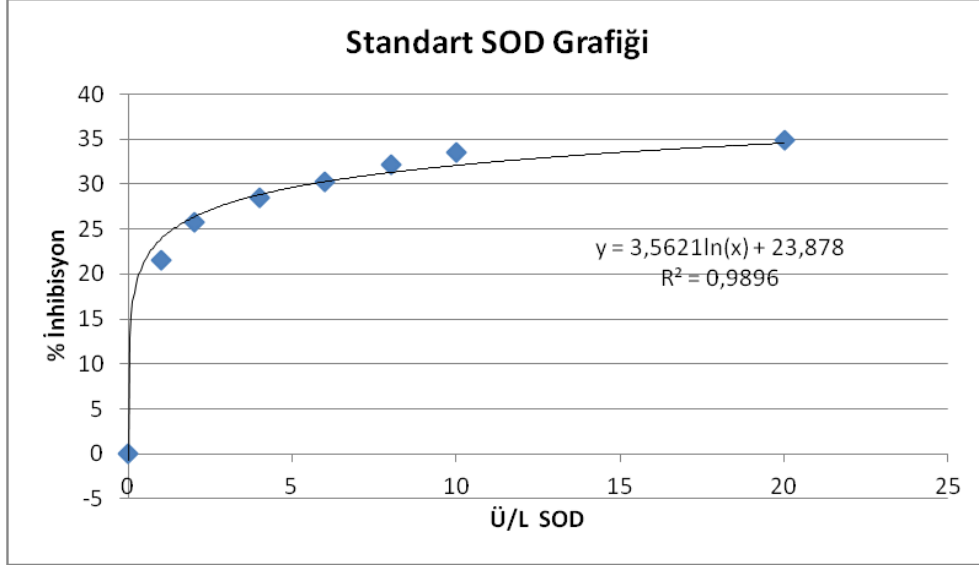
Plazmalarda AST ve ALT değerleri otoanalizörde, SOD aktivitesi spektrofotometrede belirlendi. Plazma, eritrosit paketleri ve karaciğerlerdeki MDA miktarları 1,1,3,3-Tetrametoksipropanın 10; 5; 2,5; 1,25; 0,625 nmol/mL'lik standartları kullanılarak hazırlanan MDA standart eğrisi kullanılarak hesaplandı. Sonuçlar nmol MDA/numune olarak ifade edildi. Eritrosit paketlerinde okumalar iki farklı absorbans değerinde 532 nm ve 600 nm'de yapıldı. Redükte Glutasyon (GSH) düzeyleri HPLC ile tespit edildi ve g hemoglobin başına ifade edildi.



Şekil 20. Plazmalar için hazırlanan MDA standart eğrisi



Şekil 21. Karaciğer için hazırlanan MDA standart eğrisi

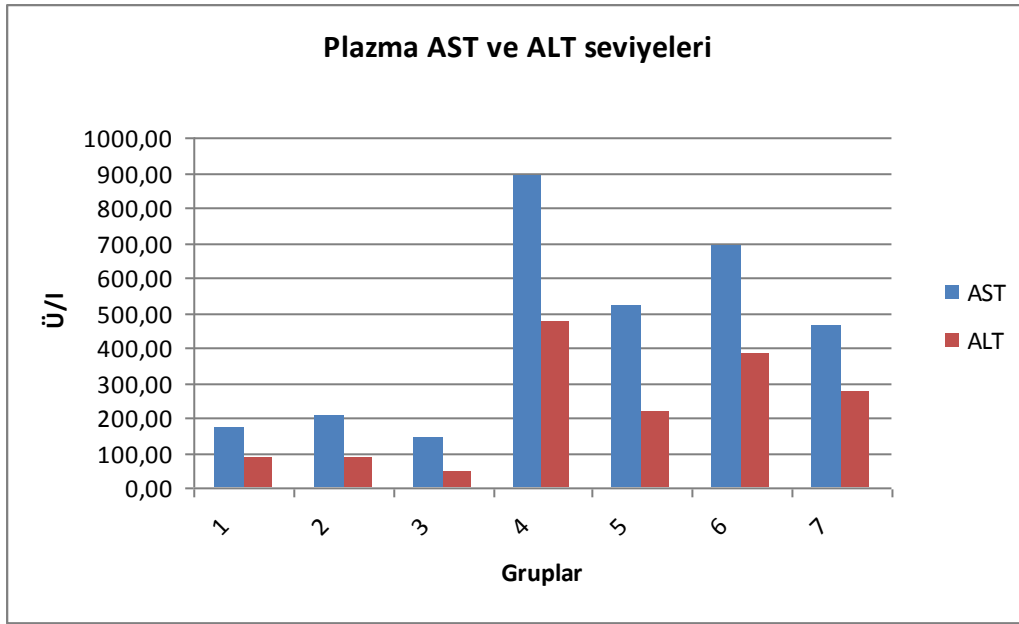


Şekil 22. Standart SOD grafiği

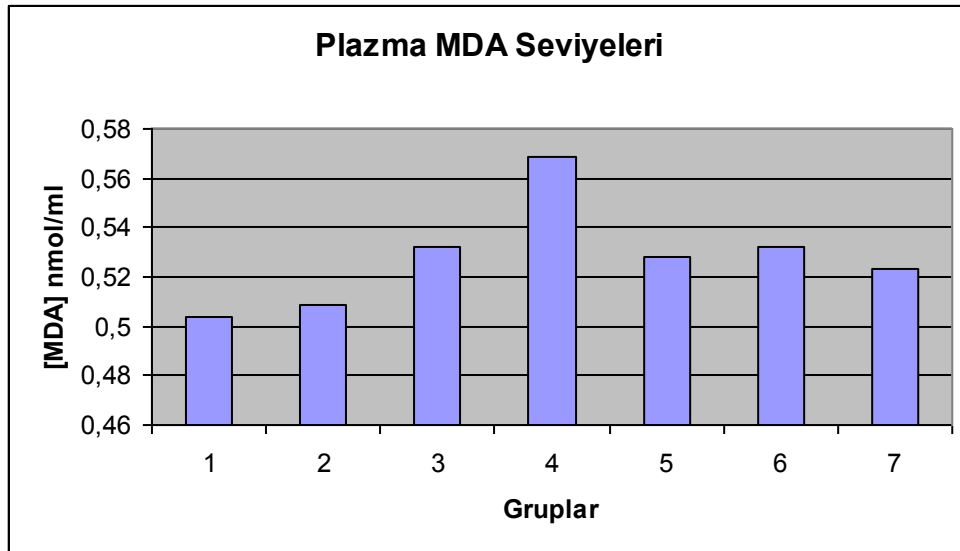
Sıçanlardan elde edilen plazmalarda incelenen parametreler ve değerleri Tablo 23, Şekil 23, 24 ve 25' de verilmiştir.

Tablo 23. Gruplara ait plazma parametreleri

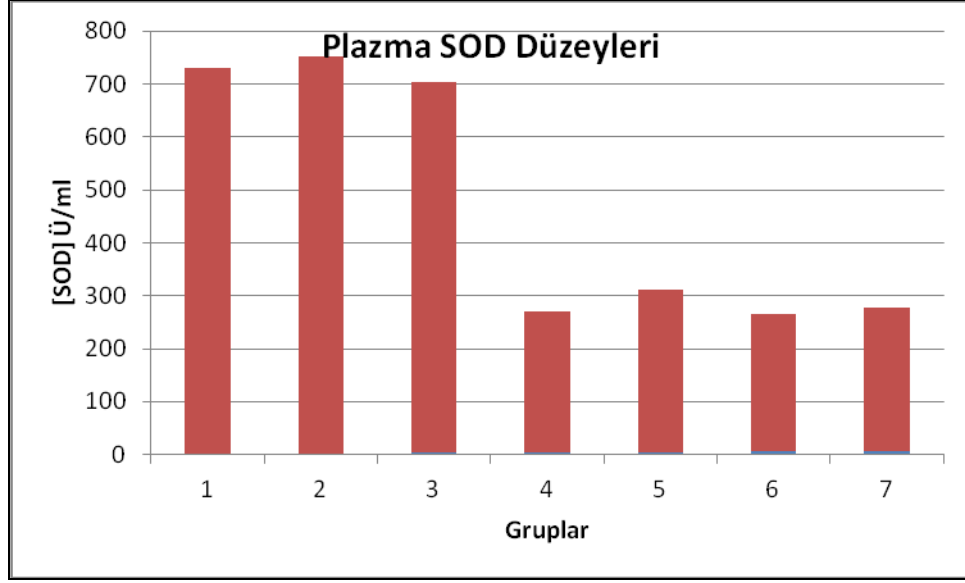
Gruplar	AST (Ü/L)	ALT (Ü/L)	MDA nmol/mL plazma	SOD Ü/mL plazma
1 (SF)	171,57±21,74 ^a	85,86 ±14,31 ^a	0,504±0,021 ^a	729,3±30 ^c
2 (ZY)	207,14±20,59 ^a	86,57 ±8,90 ^a	0,509±0,009 ^a	750,1±25 ^c
3 (EA)	145,50±21,45 ^a	44,50±11,47 ^a	0,532±0,028 ^{ab}	700,65±45 ^c
4 (CCl ₄)	892,57±291,11 ^d	474,86±134,76 ^d	0,569±0,084 ^b	265,25±15 ^a
5 (Sil)	518,80±122,76 ^b	218,80±73,25 ^b	0,528±0,021 ^{ab}	305,9±40 ^b
6 (P2)	690,83±149,15 ^c	383,40±93,02 ^c	0,532±0,029 ^{ab}	260,3±30 ^a
7 (P4)	464,0±69,02 ^b	277,00±49,62 ^b	0,523±0,010 ^a	270,25±20 ^{ab}



Şekil 23. Grupların Plazma AST ve ALT düzeyleri



Şekil 24. Grupların Plazma MDA düzeyleri

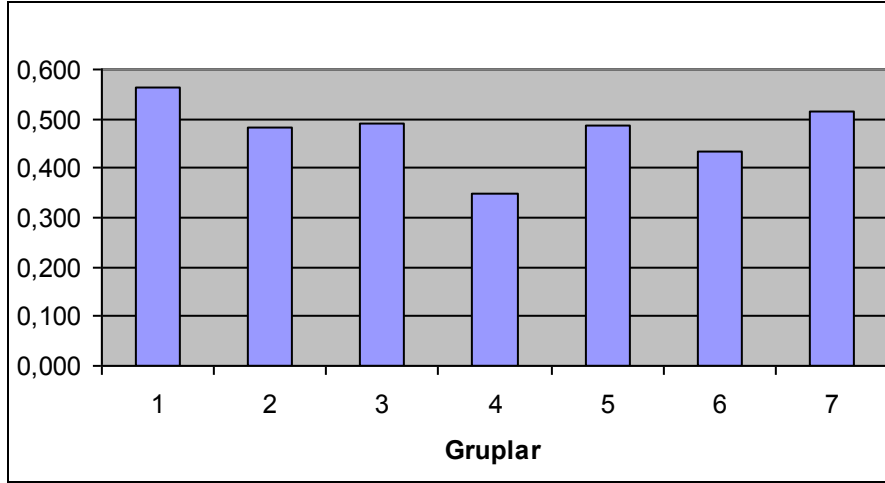


Şekil 25. Grupların Plazma SOD düzeyleri

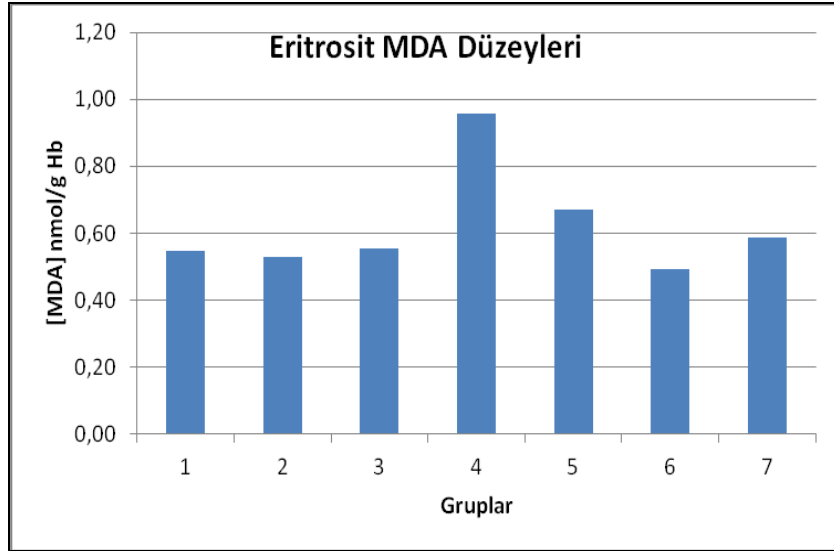
Çalışmamızda grupların eritrosit paketlerinde hemoglobin miktarları, GSH, MDA ve SOD düzeyleri hesaplanarak Tablo 24, Şekil 26, 27 ve 28’de sunuldu.

Tablo 24. Grupların eritrosit paketlerine ait parametreler

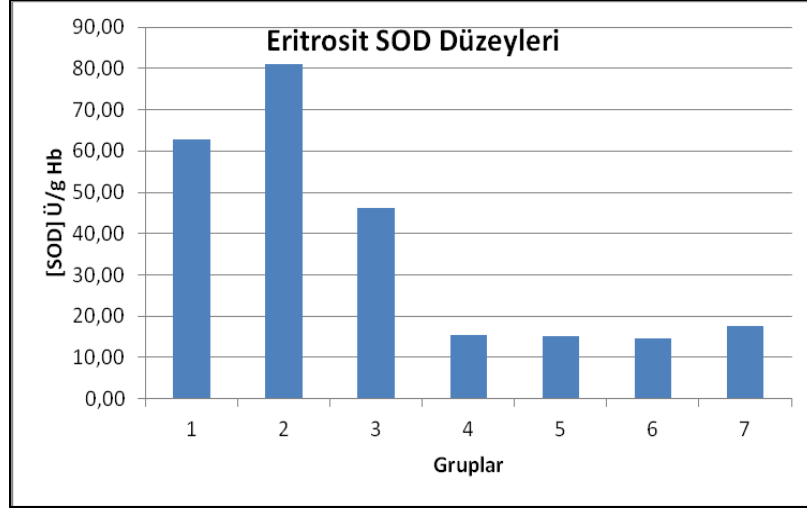
Gruplar	Hemoglobin g/dL	GSH µmol/g Hb	MDA nmol/g Hb	SOD Ü/g Hb
1 (SF)	8,46±4,04 ^a	0,56±0,10 ^b	0,55±0,38 ^a	62,93±31,58 ^{bc}
2 (ZY)	8,61±3,27 ^a	0,48±0,09 ^b	0,53±0,31 ^a	80,93±68,19 ^c
3 (EA)	8,54±1,25 ^a	0,49±0,10 ^b	0,55±0,1 ^a	46,12±19,58 ^{ab}
4 (CCl ₄)	6,87±3,31 ^a	0,35±0,10 ^a	0,96±1,33 ^a	15,42±21,78 ^a
5 (Sil)	7,42±1,02 ^a	0,49±0,10 ^b	0,67±0,28 ^a	15,26±14,14 ^a
6 (P2)	8,13±2,52 ^a	0,44±0,10 ^{ab}	0,49±0,27 ^a	14,74±6,63 ^a
7 (P4)	8,71±2,12 ^a	0,52±0,18 ^b	0,59±0,5 ^a	17,72±8,70 ^a



Şekil 26. Eritrositlerin GSH Düzeyleri (µmol/g Hb)



Şekil 27. Eritrositlerin MDA Düzeyleri

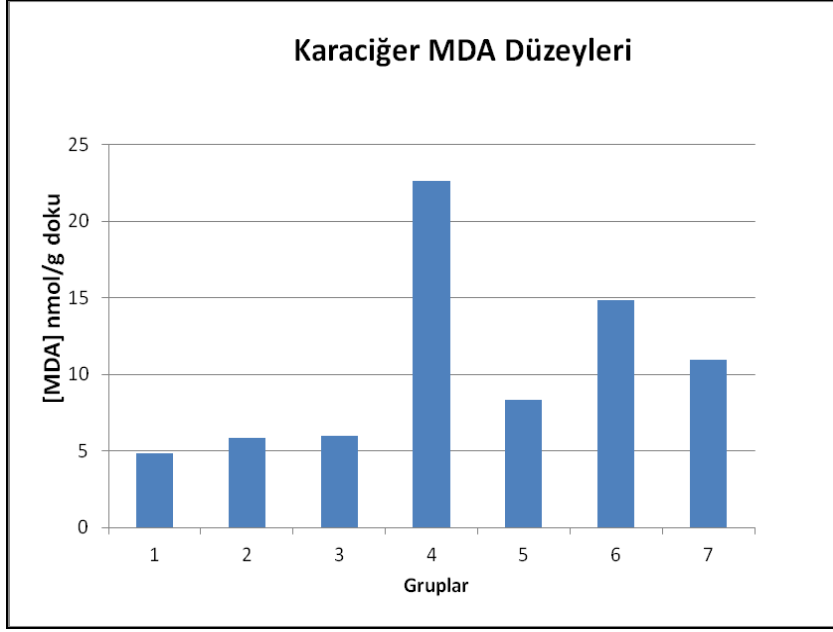


Şekil 28. Eritrositlerin SOD Düzeyleri

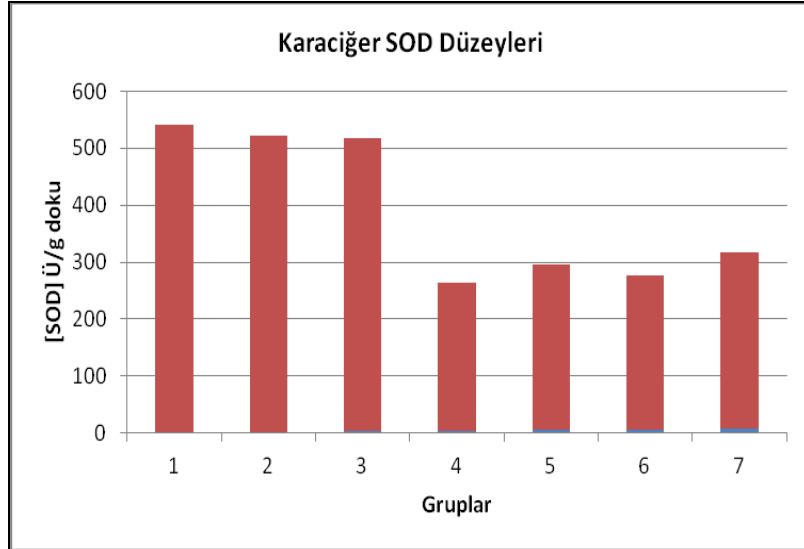
Sıçanlara ait karaciğer parametreleri hesaplanmış, MDA ve SOD düzeyleri Tablo 25, Şekil 29 ve 30'de sunulmuştur.

Tablo 25. Gruplara ait karaciğer parametreleri

Gruplar	MDA nmol/g doku	SOD Ü/g doku
1 (SF)	4,845±0,257 ^a	540,10±10,30 ^c
2 (ZY)	5,816±0,405 ^a	520,20±19,22 ^c
3 (EA)	5,953±0,490 ^a	515,15±23,12 ^c
4 (CCl ₄)	22,62±2,7 ^e	260,50±42,10 ^a
5 (Sil)	8,302±0,814 ^b	290,60±23,20 ^b
6 (P2)	14,82±1,548 ^d	270,20±12,34 ^{bc}
7 (P4)	10,943±0,917 ^c	310,10±14,40 ^b



Şekil 29. Grupların Karaciğer MDA düzeyleri



Şekil 30. Grupların Karaciğer SOD düzeyleri

4.2. Bulguların Korelasyonu

Çalışmada polenlerin özelliklerine dair elde edilen bulguların birbirleri ile korelasyonları hesaplanmış ve Tablo 26'da sunulmuştur. Korelasyonların ifadesinde korelasyon katsayısı r eğer + ise pozitif korelasyon; – ise negatif korelasyonu ifade etmektedir. Eğer r , 0 ile 0.49 arasındaysa zayıf korelasyonu (*); 0,5 (dahil) ile 1 arasındaysa kuvvetli korelasyonu (**) ifade etmektedir.

Tablo 26. Polen sonuçlarının korelasyonu

		SU	KÜL	PROTEİN	pH	NİŞASTA	PEKTİN
SU	r		0,879(**)	-0,748(**)			0,777(**)
	p		0,000	0,005			0,003
	N		12	12			12
KÜL	r	0,879(**)		-0,733(**)			0,649(*)
	P	0,000		0,007			0,022
	N	12		12			12
PROTEİN	r	-0,748(**)	-0,733(**)				
	p	0,005	0,007				
	N	12	12				
PEKTİN	r	0,777(**)	0,649(*)				
	p	0,003	0,022				
	N	12	12				
YAĞ	r					0,648(*)	
	p					0,023	
	N					12	
TFMM	r	-0,844(**)	-0,727(**)	0,769(**)	0,634(*)		-0,618(*)
	p	0,001	0,007	0,003	0,027		0,032
	N	12	12	12	12		12
FLAVONOL	r			-0,637(*)			
	p			0,026			
	N			12			
ANTOSİYANİN	r	-0,659(*)					-0,599(*)
	p	0,020					0,040
	N	12					12
FRAP	r	-0,870(**)	-0,669(*)	0,815(**)			
	p	0,000	0,017	0,001			
	N	12	12	12			
GLUKOZ	r		0,693(*)		-0,613(*)		
	p		0,012		0,034		
	N		12		12		

** 0,01 seviyesinde anlamlı; * 0,05 seviyesinde anlamlı; r: Pearson korelasyon katsayısı; p: Anlamlılık

Tablo 26'nın devamı

		YAĞ	TFMM	FLAVONOL	ANTO-SİYANİN	FRAP	GLU-KOZ	FRUKTOZ
SU	r		-0,844(**)		-0,659(*)	-0,870(**)		
	p		0,001		0,020	0,000		
	N		12		12	12		
KÜL	r		-0,727(**)			-0,669(*)	0,693(*)	0,630(*)
	P		0,007			0,017	0,012	0,028
	N		12			12	12	12
PROTEİN	r		0,769(**)	-0,637(*)		0,815(**)		
	p		0,003	0,026		0,001		
	N		12	12		12		
Ph	r		0,634(*)				0,613(*)	-0,632(*)
	p		0,027				0,034	0,028
	N		12				12	12
NİŞASTA	r	0,648(*)						
	p	0,023						
	N	12						
PEKTİN	r		-0,618(*)		-0,599(*)			
	p		0,032		0,040			
	N		12		12			
TFMM	r					0,799(**)		
	p					0,002		
	N					12		
FRAP	r		0,799(**)					
	p		0,002					
	N		12					
GLUKOZ	r							0,994(**)
	p							0,000
	N							12

** 0,01 seviyesinde anlamlı; * 0,05 seviyesinde anlamlı; r: Pearson korelasyon katsayısı; p: Anlamlılık

Deneyisel hayvan çalışmaları sonrasında elde edilen bulguların birbirleri ile korelasyonları hesaplandı ve Tablo 27'de sunuldu. Tablolarda verilen değerler sadece korelasyon gösteren değerleri göstermekte olup, korelasyon göstermeyen parametreler tabloda verilmedi.

Tablo 27. Sıçanlara ait parametrelerin korelasyonu

		AĞIRLIK	AST	ALT	MDA PLAZMA	MDA Karaciğer
AĞIRLIK	r		-0,421(**)	-0,416(**)	-0,558(**)	-0,422(**)
	p		0,003	0,003	0,000	0,003
	N		49	49	49	49
AST	r	-0,421(**)	1	0,924(**)	0,373(**)	0,848(**)
	p	0,003	0,	0,000	0,008	0,000
	N	49	49	49	49	49
ALT	r	-0,416(**)	0,924(**)	1	0,355(*)	0,857(**)
	p	0,003	0,000	0,	0,012	0,000
	N	49	49	49	49	49
MDA PLAZMA	r	-0,558(**)	0,373(**)	0,355(*)	1	0,430(**)
	p	0,000	0,008	0,012	0,	0,002
	N	49	49	49	49	49
MDA Karaciğer	r	-0,422(**)	0,848(**)	0,857(**)	0,430(**)	1
	p	0,003	0,000	0,000	0,002	0,
	N	49	49	49	49	49
ERİTROSİT-GSH	r		-0,458(**)	-0,436(**)		-0,447(**)
	p		0,001	0,002		0,001
	N		49	49		49
ERİTROSİT- MDA	r				0,328(*)	
	p				0,022	
	N				49	
ERİTROSİT- SOD	r	0,333(*)	-0,505(**)	-0,484(**)		-0,478(**)
	p	0,019	0,000	0,000		0,001
	N	49	49	49		49
Plazma SOD	r	0,521(**)	-0,801(**)	-0,814(**)	-0,308(*)	-0,727(**)
	p	0,000	0,000	0,000	0,032	0,000
	N	49	49	49	49	49
Karaciğer-SOD	r	0,523(**)	-0,837(**)	-0,837(**)	-0,324(*)	-0,773(**)
	p	0,000	0,000	0,000	0,023	0,000
	N	49	49	49	49	49

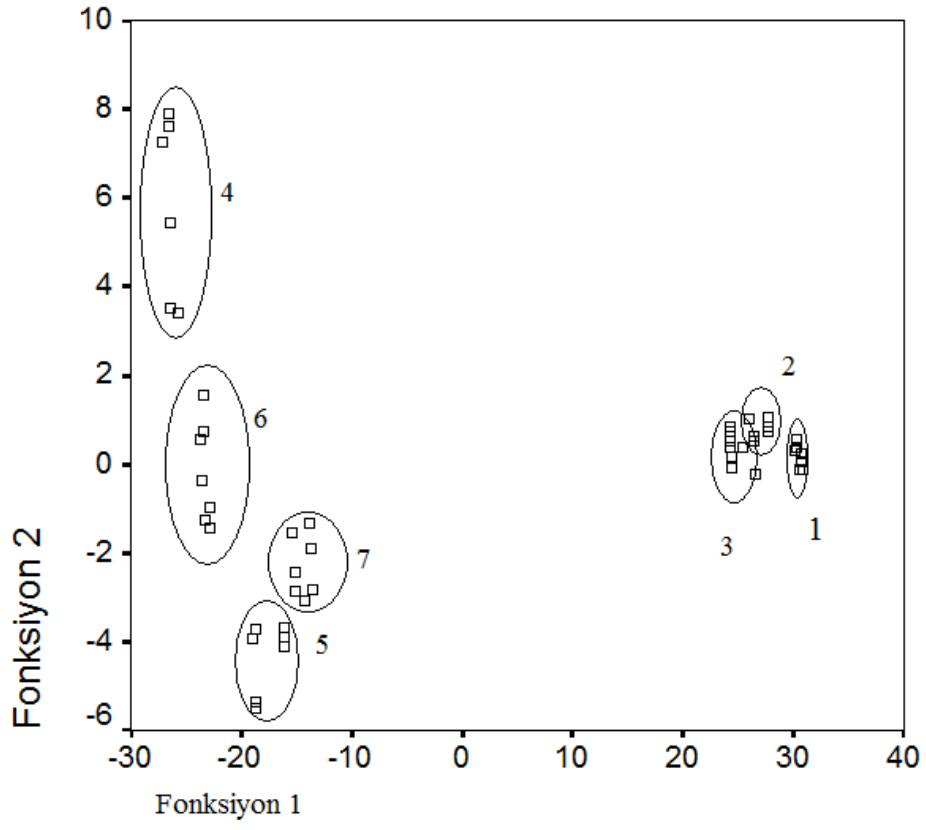
** 0,01 seviyesinde anlamlı; * 0,05 seviyesinde anlamlı; r: Pearson korelasyon katsayısı; p: Anlamlılık

Tablo 27'nin devamı

		ERİTROSİT- GSH	ERİTROSİ T- MDA	ERİTROSİ T- SOD	Plazma- SOD	Karaciğer- SOD
AĞIRLIK	R			0,333(*)	0,521(**)	0,523(**)
	P			0,019	0,000	0,000
	N			49	49	49
AST	R	-0,458(**)		-0,505(**)	-0,801(**)	-0,837(**)
	P	0,001		0,000	0,000	0,000
	N	49		49	49	49
ALT	R	-0,436(**)		-0,484(**)	-0,814(**)	-0,837(**)
	P	0,002		0,000	0,000	0,000
	N	49		49	49	49
MDA PLAZMA	R	-0,250	0,328(*)		-0,308(*)	-0,324(*)
	P	0,083	0,022		0,032	0,023
	N	49	49		49	49
MDA Karaciğer	R	-0,447(**)		-0,478(**)	-0,727(**)	-0,773(**)
	P	0,001		0,001	0,000	0,000
	N	49		49	49	49
ERİTROSİT-GSH	R					0,322(*)
	p					0,024
	N					49
ERİTROSİT- MDA	r					
	p					
	N					
ERİTROSİT- SOD	r				0,668(**)	0,655(**)
	p				0,000	0,000
	N				49	49
Plazma- SOD	r			0,668(**)		0,985(**)
	p			0,000		0,000
	N			49		49
Karaciğer-SOD	r	0,322(*)		0,655(**)	0,985(**)	1
	p	0,024		0,000	0,000	0,
	N	49		49	49	49

** 0,01 seviyesinde anlamlı; * 0,05 seviyesinde anlamlı; r: Pearson korelasyon katsayısı; p: Anlamlılık

Çalışmamızda elde edilen veriler sonucunda deneysel hayvan gruplarında daha önce literatürde uygulanmamış bir istatistiki metot da kullanıldı. Bu anlamda diskriminant (ayırma) analizi kullanılarak 7 grup hayvanımızın sonuçları ışığında, 7 tane özellik bakımından deney ünitelerinin ait oldukları orijinal grupları doğru olarak sınıflandırabilme olasılığı hesaplandı ve serpilme grafiği oluşturuldu (Şekil 31).



Şekil 31. Sığan parametrelerinin serpilme grafiği

5. TARTIŞMA

Bal, polen, propolis ve diğeri arı ürünlerinin kullanıldığı tüm tedavi şekilleri apiterapi olarak adlandırılmaktadır. Bu arı ürünlerinden üzerinde en fazla çalışılan doğal ürün bal ve propolis olup, polenin de yüksek biyolojik potansiyele sahip doğal bir ürün olduğu bildirilmektedir. Polen veya çiçek tozu, çiçekli bitkilerin üremesi için gerekli olan, yüksek besin değerine sahip doğal bir gıda maddesidir. Arılar, doğadaki tozlaşmayı (palinasyon) sağlayan canlılar olup, ayaklarına yapışan polenleri larva sonrası yavru beslenmesinde ve gençlik dönemlerinde dokularının, kaslarının, salgı bezlerinin ve diğer organlarının yeterince gelişmesinde kullanmak üzere kovanlarına taşımaktadırlar. Kovanlara taşınan polenler petek gözlerinde depolandıkları gibi balın içerisine de katılır ve balın oksidasyonu gibi pek çok zararlı etkiden korunmasında rol alırlar. Değerli bir ürün olması nedeniyle son yıllarda arı kovanlarından polen tuzakları vasıtasıyla toplanan polenler, halk arasında destekleyici bir besin olarak özellikle sporcuların, gelişme geriliği bulunan çocukların, anemik hastaların, hepatit kimselerin diyetlerine takviye edici olarak kullanılmaktadır. Polenin yüksek antioksidan kapasiteye sahip bir ürün olduğu ve bu oksidasyonu önleme kapasitesinin bitki florasına göre değişim gösterdiği pek çok bilimsel çalışmada bildirilmektedir (Ferreira vd., 2009; Karataş vd., 2000). Ancak polenlerinin *in vivo* olarak karaciğer hasarını önlemedeki fonksiyonu üzerine yapılan bir çalışma bulunmamaktadır.

Polenin fiziksel, kimyasal ve biyolojik özelliklerinin toplandığı bitkiye, toplandığı bölgenin coğrafik konumuna, iklim özelliklerine, toplanma şekline ve ambalaj şekline bağlı olarak değişim gösterdiği bildirilmektedir (Karataş vd., 2000). Polen üzerine yapılan çalışmalar son 3-5 yılda artış göstermiş ve bu çalışmalarda polenin palinolojik değerlendirmeleri ile *in vitro* biyolojik özellikleri üzerine yoğunlaşmıştır. Polenlerin lokasyonlara bağlı olarak yörede baskın bitki poleni olarak toplanması ve ticari olarak satılması dikkate alındığında polenlerin bu şekilde spesifik olarak tanımlanmamış olması bu çalışmaya ihtiyaç açısından önem arz etmektedir. Buna ilaveten yeterince *in vivo* çalışmanın yapılmamış olması nedeniyle polenin gerçek değeri ortaya çıkarılamamıştır. Bu nedenle çalışmada, Türkiye florasına ait Karadeniz bölgesi polenlerinin kimyasal bileşimlerini ve biyolojik etkinliğini ortaya çıkarmayı amaçladık. Yapılan çalışmada polenin fiziksel, kimyasal ve biyokimyasal özellikleri belirlendikten sonra hayvan deneyleri ile karaciğer hasarını önlemedeki rolü araştırıldı.

Çalışmada Karadeniz Bölgesine ait toplam dört farklı polen örneği analiz edildi. İki polen örneği Batı Karadeniz bölgesinden (Ereğli (ZP1) ve Zonguldak (ZP2)); iki polen örneği de Doğu Karadeniz Bölgesinden (Trabzon (TP) ve Giresun (GP)) temin edildi. Polenlerin yapılan palinolojik analizleri sonucu baskın şekilde Karadeniz florasında bolca bulunan kestane (*Castanea sativa*) polenini içerdiği tespit edildi. Bu nedenle çalışmada kullanılan polenler kestane poleni olarak adlandırıldı.

Polenlerin müstahsillerden güneş altında kurutulduktan sonra temin edilmelerine rağmen farklı oranlardaki su içerikleri, kalite parametrelerinin kuru ağırlık üzerinden ifade edilebilmesi için tespit edildi. Su içeriklerinin % 14,03-% 16,87 arasında değişim gösterdiği, ZP1 poleninin en düşük su içeriğine sahip olduğu belirlendi. Polenlerin tespit edilen kül içerikleri incelendiğinde ZP1 poleninin % 2,23 ile en düşük; TP poleninin % 3,03 ile en yüksek kül içerdiği, % 17,67 ile % 23,67 arasında protein içeriğine sahip polenlerden en yüksek protein içeriğine sahip polenin ZP1 poleni olduğu ve doğu Karadeniz bölgesi polenlerinin protein içeriğinin istatistikî açıdan kendi arasında farklılık göstermediği tespit edildi. Dört farklı yöreye ait polen örneklerinin pH, nişasta, pektin ve yağ analizleri bakımından aralarında anlamlı farklılıklar olmadığı tespit edildi ($p < 0,05$). Polenlerin glukoz ve fruktoz içerikleri HPLC de refraktif indeks dedektörü kullanılarak tayin edildi ve polenlerin glukoz içeriklerinin kuru madde üzerinden % 25,35 - % 37,35 arasında ve fruktoz içeriklerinin ise % 37,72 - % 54,21 arasında değişim gösterdiği tespit edildi. En yüksek fruktoz ve glukoz içeriğe sahip polenin Trabzon yöresine ait P4 poleni olduğu belirlendi. Almeida-Muradian vd., (2005) Brezilya polenlerinin kimyasal bileşimi üzerine yaptıkları çalışmada polenlerin ortalama % 7,4 nem; % 20 protein; % 6 lipit ve % 2,2 kül içerdiğini tespit etmişlerdir. Yine su içeriğine dair yapılan bir başka çalışmada, polenlerin, % 4,11 ile % 7,72 arasında su içerdiği tespit edilmiştir (Gergen vd., 2006). Neme dair bulgularımızın literatürdeki bulgulardan yüksek olması Karadeniz bölgesi nisbi neminin fazla olmasından kaynaklanmaktadır. Bu sonuç literatürde kıyaslamamanın doğru yapılabilmesi adına polenlerde sonuçların kuru madde üzerinden verilmesi gerekliliğini de ortaya çıkardı. Yapılan bir başka çalışmada ise depolanan polenlerin % 21 nem; % 28,1 protein; % 7,6 lipit; % 3,6 kül ve % 60,7 karbohidrat içerdiği tespit edilmiştir (Human ve Nicolson, 2006).

Dört farklı polenin toplam fenolik madde miktarları gallik asit standardı kullanılarak Folin-Ciocalteu yöntemine göre test edildi ve dört farklı bölgeden toplanan polen örneklerinin total fenolik madde içeriklerinin 13,68 ile 28.87 mgGAE/ g kuru polen

arasında değişim gösterdiği tespit edildi. Gerek yaş polen üzerinden ve gerek kuru madde miktarı üzerinden yapılan hesaplama sonucu ZP1 polenin en yüksek fenolik içeriğe sahip olduğu tespit edildi ($p < 0,05$).

Polenin renginden sorumlu ve aynı zamanda antioksidan etkili antosiyanin miktarları pH differansiyel metoduna göre tayin edildi. Monomerik antosiyanince ZP1 polen örneğinin diğer polenlerden yüksek olduğu tespit edildi ($p < 0,05$). Toplam flavanol miktarı Kuersetin standardı eşdeğeri olarak Fukumoto ve Mazza (2000)'ya göre tayin edildi ve ZP2 örneğinin diğer polenlerden daha yüksek flavanol içerdiği tespit edildi ($p < 0,05$). Dört polen türüne ait fenolik madde miktarları literatürdeki fenolik madde miktarları ile karşılaştırıldığında Karadeniz Bölgesine ait polenlerin daha yüksek fenolik madde miktarına sahip olduğu görülmektedir. Nitekim Romanya'da yapılan bir çalışmada 12 farklı monofloral polen örneğinin Folin-Ciocalteu metoduna göre ve gallik asit standardına göre toplam fenolik madde miktarının 4,4 mg ile 16,4 mg GAE/ g polen arasında değişim gösterdiği bildirilmektedir (Mărghitas vd., 2009). Yapılan bir başka çalışmada ökaliptus polenine ait toplam fenolik madde miktarlarının 32,59 mg GAE/g polen olduğu bildirilmektedir (Leja vd., 2007). Aynı çalışmada toplam flavanol miktarlarının 3,8 mg Kuersetin /g ile 13,6 mg Kuersetin/g arasında değişim gösterdiği tespit edilmiştir. Polen çalışmamıza benzer toplam fenolik madde miktarları Amerika'nın Sonoran bölgesine ait 6 farklı floraya sahip polen örneklerinde görüldü (LeBlanc vd., 2009). Bu çalışmada toplam fenolik madde miktarının 15,91 mg – 34,85 mg GAE/g polen arasında değişim gösterdiği ve en yüksek toplam fenolik madde miktarına sahip polen örneğinin mimoza çiçeğine ait polenin olduğu bildirilmiştir (LeBlanc vd., 2009). Çalışılan dört polen numunelerinin flavanol miktarı 8,07 ile 9,64 mg Kuersetin/ g kuru polen arasında değişim göstermiş olup aralarında anlamlı farklılıklar bulunmamaktadır. Yapılan bir başka çalışmada altı farklı floraya sahip polen örneklerinde çalıştığımız metoda uygun şekilde ve kuersetin standardı kullanılarak yapılan ölçüm sonucu toplam flavanol miktarının 2,66 – 5,48 mg Kuersetin /g polen arasında değişim gösterdiği bildirilmektedir. Bu değerleri Türkiye florası poleni ile karşılaştırdığımız zaman gerek toplam fenolik madde içeri ve gerek flavanol miktarı cinsinden olsun, ülkemiz polenleri, daha yüksek değerler arz etmektedir. Polonya'nın Krakow bölgesinden toplanan 12 farklı türden polen içeriklerinin toplam fenolik madde miktarları, toplam flavanol ve antosiyanin değerleri ile çalışmamızda bulunan değerler paralellik göstermektedir (Leja vd., 2007). Fenolik asitler, flavanoller, flavanoidler, antosiyaninler, kalkonlar gibi bileşiklerin tümü birer fenolik

madde olup, bitkinin oksidasyondan korunmasından çevre şartlarına adaptasyonuna; her tür böcek ve zararlılara karşı korunmasından aromasına kadar pek çok fonksiyona sahip sekonder bileşenlerdir (Cotton, 1996; Cowan, 1999). Ayrıca fenolik madde miktarı ile antioksidan, antimikrobiyal aktivite arasında pozitif bir ilişki olduğu yapılan pek çok çalışmada bildirilmiştir (Robards vd., 1999; Cannac vd., 2007).

Çalışmada *in vivo* denemelerde kullanılan ZP1 polenlerinin antioksidan özellik gösteren fenolik asit ve flavanol türleri HPLC ile tayin edildi. Çalışılan polenlerde gallik asit, protokatekuik asit, *p*-hidroksibenzoik asit, klorojenik asit ve *p*-kumarik asit değişen oranlarda tespit edilirken kateşin, vanilik asit, kaffeik asit, şiringik asit, epikateşin, rutin, ferulik asit, benzoik asit, *o*-kumarik asit, absisik asit, kuersetin, *t*-sinnamik asit dedeksiyon limitlerinin (LOD) altında bulundu. Šarić vd. (2009)'nin Hırvatistan polenlerinde yaptıkları bir çalışmada polenin kafeik asit, galangin, kampferol, krisin, pinosembriin, isorhamnetin ve kuersetin içerdiği bildirilmiştir. Kestane balında yapılan başka çalışmalarda ise kafeik asit, *p*-kumarik asit ve ferullik asitin kestane balında marker fenolik bileşen olduğu ve balın orijininin belirlenmesinde kullanılabileceği belirtilmiştir (Merken vd., 2000; Andrade vd., 1997). Bu fenolik bileşenlerden *p*-kumarik asit kestane polenlerimizde de bulunmuştur.

Polenlerin antioksidan aktivitelerinden sorumlu bir başka bileşik sınıfı da karotenoidlerdir. Lipofilik karaktere sahip karotenoidlerin oksidasyonu engellemede kuvvetli radikal süpürücü özelliği olduğu bildirilmektedir (Edge vd., 1997). Çalışmada polenlerin toplam karotenoid miktarları spektrofotometrik olarak β -karoten standardı kullanılarak (Davis, 1976; Pirone vd., 2007) 460 nm de tayin edildi. Polenlerin toplam karotenoid madde miktarlarının 17 ila 29 mg β -karoten/100 g kuru polen arasında değişim gösterdiği belirlendi. Karotenoid miktarının en yüksek bulunduğu polenin ZP1 poleni olduğu fakat bu değer in istatistiki olarak diğer polenlerden anlamlı olarak farklılık göstermediği tespit edildi. Hırvatistan'ın orta Dalmatia bölgesinden toplanan polen türlerinde yapılan bir çalışmada *Cystus incanus* L. polenlerinin β -karoten ve α -karoten miktarlarının 11,90 mg /100 g polen değerine sahip olduğu bildirilmektedir (Šarić vd., 2009). Bu değer bulgularımızla uyum içersinde olup Karadeniz florasına ait polenlerin daha yüksek karotenoid içeriğine sahip olduğu görülmüştür.

Sonuç olarak çalışmamızda bulunan değerleri, dünyada yapılan başka çalışmalarla karşılaştırdığımız zaman, polenlerin toplam fenolik madde miktarları ile flavanol ve antosiyanin miktarları polenin florasına bağlı olarak değişim gösterdiği, ancak aralarında

büyük farklılıkların olmadığı gözlemlenmektedir. Buradan hareketle çalışmamızda bulduğumuz *in vivo* sonuçların diğer polenler için de emsal teşkil edebileceği düşünülmektedir.

Toplam fenolik madde ve karotenoidlerden başka polenlerin toplam antioksidan kapasitelerini ölçmek ve karşılaştırma amacıyla FRAP yöntemini kullanıldı. Demir (III) indirgeme/antioksidan güç olarak da adlandırılan bu yöntem çeşitli bitkisel ekstraktların toplam antioksidan kapasitelerinin belirlenmesinde en çok kullanılan yöntem olup Benzie ve Strains, (1996) tarafından geliştirilmiştir. Dört farklı polen örneğinin Trolox® standardına göre ölçülen toplam antioksidan kapasitelerinin oldukça yüksek olduğu ve en yüksek değere sahip polenin ZP1 poleni olduğu (70,76 mM Trolox eşdeğeri / g polen) tespit edildi.

Polenlere dair elde edilen veriler ışığında kuru madde üzerinden verilen değerler dikkate alındığında polenlerin kül içeriği ile protein içeriği arasında güçlü negatif korelasyon (p:0,007; r:-0,733); kül- pektin arasında zayıf pozitif korelasyon (p:0,022; r:0,649) tespit edildi. Yine kül içeriği ile fenolik içerik ve FRAP antioksidan kapasite arasında da negatif korelasyon tespit edildi. Yağ miktarı ve nişasta miktarı arasında zayıf pozitif korelasyon (p:0,023; r:0,648) bulunması lipit fraksiyonlarının nişasta bileşenlerince tutulmasından kaynaklanabilir. Polenlerden elde edilen protein içerikleri ile toplam fenolik madde miktarı (p:0,003; r:0,769) ve FRAP antioksidan kapasite (p:0,001; r:0,815) arasında güçlü pozitif korelasyon tespit edildi. Bu korelasyonun sebebi non-fenolik antioksidanlar olarak adlandırılan proteinlerin antioksidan etkisinin (Campos vd., 2003) polenlerde de etkin olmasından ileri gelebilir.

Polenlerin pH değerleri ile glukoz (p:0,034; r:-0,613) ve fruktoz (p:0,028; r:-0,632) içeriği arasında rastlanılan zayıf negatif korelasyon sakarozun inversiyonuna atfedilebilir. Bunu destekler nitelikte glukoz ve fruktoz arasında güçlü korelasyon (p:0,00; r:0,994) tespit edildi.

Çalışma sonuçlarında elde edilen FRAP değerleri ile TFMM arasında da önemli bir biçimde güçlü pozitif korelasyon bulundu (p:0,002; r:0,799). Bu fenolik bileşenlerin güçlü antioksidan etkisine atfedilebilmektedir (Bravo, 1998; Alasalvar vd., 2003; Chung vd., 1998; Cassidy vd., 2000; Tapiero vd., 2002; Cai vd., 2006). Ayrıca yenilebilir yaş polen üzerinden elde edilen verilerin korelasyonları incelendiğinde antosiyanin miktarı ile FRAP antioksidan kapasite arasında hesaplanan pozitif korelasyon (p:0,045; r:0,586) da antosiyaninlerin antioksidan etkilerinden kaynaklanmaktadır.

Çalışmadaki kimyasal ve biyolojik testlerin değerlendirilmesi sonucu çalışılan dört farklı polen numunesinden ZP1 polenin biyolojik yönden daha aktif olduğu belirlendi. Planlanan konsantrasyonlarda *in vivo* testlerin nasıl bir sonuç vereceği bilinmediği için etkili olan bu polenlerin karaciğer hasarının tedavi edilebilirliğinin tespitinde kullanılmasına karar verildi.

Karaciğer sayısız endojen ve eksojen maddenin detoksifikasyonu, çeşitli moleküllerin sentezi, itrahi gibi birbirinden bağımsız pek çok fonksiyona sahip yegâne organdır (Akarca, 2007). Karaciğer alınan tüm besin maddelerinin ve kimyasalların transformasyona uğradığı bir yer olması bakımından hücre harabiyetinde ilaç tedavisi mümkün değildir. Bu nedenle alkol, aşırı yağlanma, kimyasallara maruz kalma, zehirlenme, viral enfeksiyonlar, bakteriyel enfeksiyonlar vs.'den dolayı bozulan (Akarca, 2007) karaciğer dokusunun tedavisinde doğal ilaçlarla tedavi ön plana çıkmaktadır. Bu amaçla halk arasında enginar ve deve dikenini (*Silybum marianum*) ekstreleri ve onlardan hazırlanmış haplar en çok kullanılan bitkisel doğal özütlerdir (D'andrea vd., 2005). Deve dikeninde bulunan Silimarin adlı ekstrenin karaciğer hasarını önlemede etkili olduğu bildirilmektedir. Deve dikeninde bulunan Silimarin adlı madde karışımı 4 izomerik flavoligninden; silibinin, izosilibinin, silidianin ve silikristin oluşmaktadır. Silimarin özütleri yaklaşık 2000 yıl boyunca akut ve kronik karaciğer tedavisinde ilaç olarak kullanılmıştır. Silimarin 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).

Planlanan çalışmada karbontetraklorür ile karaciğer hasarı gerçekleştirildi ve iki farklı polen derişiminde tedavi izlendi. Deneysel hasar oluşturulmasında CCl₄'den başka kimyasallar da kullanılmaktadır. Kronik alkol muamelesi (Kolonkaya vd., 2002), organofosfat (Eraslan vd., 2010), ağır metal iyonları (Liu vd., 2010) gibi çeşitli toksik ajanlara uzun süre maruz bırakılan deney hayvanlarında karaciğer hasarları meydana geldiği ve hasarların izlenmesinde ALT ve AST enzimlerinin markır olarak kullanıldığı bildirilmektedir.

CCl₄ mitokondriyal monooksijenaz sisteminde metabolize edilmektedir. İleri sürülen mekanizmaya göre metabolizma esnasında triklorometil serbest radikali (CCl₃·) oluşur ve sonra radikal lipidler ve proteinler ile kovalent bağlar oluşturarak triklorometil peroksit (Cl₃COO·) veya başka formlara dönüşür (Recknagel vd., 1989). Oluşan serbest radikaller hücre membranlarındaki fosfolipidlerde bulunan yağ asidlerinin peroksidasyonuna yol

açarak hücre harabiyetine sebep olur. CCl₄' e bağlı olarak gelişen karaciğer hasarında lipit peroksidasyonu son derece önemlidir (Nadkarni ve Souza, 1988). Çünkü bu hasara bağlı olarak ilerleyen süreçte karaciğer fibrozu ve siroz oluşur. Karaciğer fibrozu, ekstrasellüler matriks komponentlerinin özellikle AST ve ALT enzimlerinin artması ile karakterize edilir.

Yapılan araştırmalarda arı ürünlerinden bal, polen, propolis gibi arı ürünlerinin potansiyel olarak yüksek antioksidan, antimikrobiyal, antitümoral, antifungal, antiviral ve anti-inflamatuar gibi pek çok biyolojik aktif özelliği bulunmaktadır (Küçük vd., 2007; Leja vd., 2007; Inoue, 2003). Son yıllarda arı ürünlerinin bu özelliklerinden başka DNA hasarını (Inoue, 2003; Kolonkaya vd., 2002), karaciğer hasarını (Eraslan vd., 2010) önlediğine dair çalışmalar yoğunlaşmaktadır. Ancak polenin karaciğer hasarını önlemedeki rolü üzerine ayrıntılı bir çalışmaya rastlanılmamıştır. Bu nedenle planlanan çalışmada Türkiye florasına ait polenin karaciğer hasarını önlemedeki rolü CCl₄ ile deneysel hasar oluşturulan sıçanlarda yapıldı. Polenin etkinliği daha önce hücre hasarına etkili olduğu bilinen pozitif bir kontrol olan ve yine bitkisel bir ürün olan Silibinin ile karşılaştırılarak test edildi. Deve dikeninde bulunan Silimarin adlı madde karışımının 4 izomerik flavoligninden biri olan ve literatürde (D'andrea vd., 2005; Schümann vd., 2003) karaciğer hasarını önleyici madde olarak tanımlanan Silibinin pozitif kontrol olarak kullanıldı.

Çalışma bir grupta 7 adet sıçan olmak üzere, toplam 7 ayrı grup, 49 adet erkek sıçan üzerinde 8 gün süreyle çalışılarak gerçekleştirildi. İlk 3 grup kontrol grupları olarak belirlendi. 1. Gruba sadece serum fizyolojik intraperitoneal (i.p.) yolla uygulandı. 2. Gruba CCl₄' ün çözücüsü olduğu için saf zeytinyağı uygulandı, 3. Gruba Silibininin çözücüsü olduğu için etil alkol i.p. yolla uygulandı. 4. Grup hasar oluşturulan CCl₄ grubu olup zeytinyağında çözülerek (1:1) i.p. yolla uygulandı. 5. Grup pozitif kontrol Silibinin grubu olup, CCl₄ ile birlikte i.p. yolla uygulandı. 6. Grup gavaj yoluyla uygulanan düşük derişimli polen grubu olup CCl₄ ile birlikte uygulandı. 7. Grup gavaj yoluyla uygulanan yüksek derişimli polen grubu olup CCl₄ ile birlikte uygulandı. 8. Gün sıçanlar dekapite edilerek kanları ve karaciğerleri hızlı bir şekilde alında ve ayrıldı.

Karaciğer fonksiyonunun ölçümünde kullanılan pek çok test ve teknik olmakla birlikte serum ALT ve AST enzimlerinin aktiviteleri karaciğer dokusundaki hücre harabiyetini gösteren en önemli markırlardır (Akarca, 2007). ALT sadece hücre sitoplazmasında bulunduğu halde, AST % 20 sitoplazmada, % 80 mitokondrilerde bulunur. Karaciğer zone-3 hücreleri (santral venlere yakın hücreler) daha hipoksi ortamda

buldukları için mitokondriden zengindir. Bu hücreler iskemi ve toksik hasarlara daha hassastır. Bu nedenle alkol veya toksik ajanlara maruz kalma durumlarında öncelikle zone-3 hasarı meydana geldiği için AST, ALT ye nazaran daha çok yükselme gösterir (Akarca, 2007).

AST enzimi karaciğer dışında kalp, kas dokusu, böbrek ve beyinde de fonksiyon görmektedir. Bu dokulardan herhangi birinde oluşan hasarda kandaki AST düzeyi artmaktadır, oysa ALT karaciğere daha spesifiktir. Bu enzim karaciğer dışındaki dokularda da bulunabilmesine rağmen karaciğerde daha fazla konsantre edildiği için karaciğer hasarının daha spesifik bir göstergesidir.

Bu nedenle çalışmada karaciğer hasarının oluştuğunun tespit edilmesinde ve polen tedavisinin izlenmesinde plazma AST ve ALT enzimlerinin aktiviteleri marker olarak kullanıldı. Ayrıca eritrosit, plazma ve karaciğerde CCl₄'den kaynaklanan oksidasyonun değişimleri ve oksidasyon ürünleri SOD, MDA ve GSH düzeylerinin belirlenmesi ile test edildi.

Normal sağlıklı insan serum AST ve ALT seviyeleri 0-40 U olup, bu değer karaciğer hasarının büyüklüğüne göre değişim göstermektedir. Plazma ALT ve AST aktiviteleri arasında ilk üç, serum fizyolojik, zeytinyağı ve alkol grubu olarak adlandırdığımız kontrol gruplarında, anlamlı değişim gözlenmezken, CCl₄ verilen grupta yaklaşık olarak 4-5 kat artış görüldü. Tek bir doz halinde pozitif kontrol olarak (50 mg/kg) uygulanan Silibin grubunda AST ve ALT düzeyleri, dolayısıyla karaciğer hasarı, yaklaşık % 50 oranında azalma gösterdi. kg sıçan başına 200 mg polen verilen gruplarda (6. Grup) her iki enzim düzeyi anlamlı olarak azalırken, polen miktarının iki katına artırılmasıyla her iki enzim aktivitesi polen konsantrasyonu ile orantılı olarak azalma gösterdi. İstatistiki olarak AST ve ALT seviyelerindeki düşüş Silibinin uygulanan grup ile 400 mg polen/kg'lık polen beslemesinin (7. Grup) aynı tedavi edici etkiyi gösterdiği tespit edildi.

Polenin karaciğer hasarını önleyici etkisinin bu parametreler bazında silibinle karşılaştırılmasında 7. Grup dozunda ve deney süresinde silibinine eşdeğer bir tedavi edici etkiye sahip olduğu gözlemlendi. Bununla birlikte; i.p. yolla ilaç olarak Silibinin uygulanan sıçanların hemen hepsinde gastrointestinal yollarda bozukluklar ve ishal olduğu gözlemlendi. Oysa gavaj yoluyla gıda olarak uygulanan polen gruplarında böyle bir olumsuzluk gözlemlenmedi. Ayrıca istatistiki olarak bir anlam ifade etmese bile çalışma gruplarımızda birer adet hayvan ölümleri 3.Grup (Etil alkol grubu); 4. Grup (CCl₄) ve 5. Grupta (Silibinin) gerçekleşti.

Sıçanlarda deney sonra ağırlık değişimleri incelendiğinde ilk iki serum fizyolojik ve zeytinyağı kontrol grubunda % 0,7 oranında kilo artışı gözlemlenirken, alkol grubunda % 5,4 oranında azalma görüldü. En yüksek kilo kaybının gözlemlendiği grup CCl₄ grubu (% 9,5) iken, silibin grubu ikinci sırada (% 8,2) yer aldı. Polen grubunda ise % 6,7 ve % 1,6 oranında kilo kaybı gözlemlendi. İstatistiki açıdan yüksek doz polen ile beslenen dışındaki CCl₄ uygulanan tüm gruplar aynı kategoride gruplandırılmış olup, yüksek doz polen grubu, kontrol grubu ve CCl₄ uygulanan diğer gruplar arasında değerlendirildi. Bu anlamda Silibinin'le karşılaştırıldığı zaman yüksek dozda polen ile beslenen grupta daha az kilo kaybı görüldü.

CCl₄ gibi bileşiklerin oluşturduğu oksidatif stres her türlü radikal oluşumuna neden olur ve burada lipidlerin oksidasyonuna yol açar. Malondialdehit bir lipid peroksidasyon ürünü olup, oksidatif stresin izlenmesinde kullanılan önemli bir markırdır. MDA oksidan bir ürün olup, proteinlerin lizin rezidüleriyle ve fosfolipidlerin amin gruplarıyla reaksiyona girer ve fonksiyonel bozukluklara yol açar (Uchida, 2003; Devay, 2008). Ayrıca, MDA kolaylıkla diffüze olabildiğinden, DNA bazlarıyla da reaksiyona girerek hasara neden olabilir.

Yapılan çalışmada plazma, eritrosit ve karaciğer dokularında MDA seviyeleri MDA'nın, tiobarbitürik asit (TBA) ile reaksiyona girmesi sonucu oluşan pembe renkli kompleksin ölçülmesi esasına göre yapıldı (Ohkawa, 1979). Çalışmada elde edilen MDA seviyeleri incelendiğinde plazma MDA seviyelerinde beklendiği gibi CCl₄ ile besleme sonrasında artışlar gözlemlendi. Bununla beraber etil alkol kontrol grubunda da bir yükseliş istatistiki olarak gözlenmesine rağmen artış CCl₄ (4. grup) grubundakinin altında kaldığı görüldü. Silibinin tedavisi ve düşük doz polen beslemesi MDA artışını kısmen düşürdü ve etil alkol kontrol grubu seviyelerine indirdi. Buna karşılık yüksek doz polen beslemesinde MDA seviyesinin 1. ve 2. grup seviyelerine gerilediği görüldü. Eritrosit MDA seviyelerinde ise herhangi bir farklılık gözlemlenmedi. Bunun sebebi SOD ve GSH antioksidan enzimlerinin eritrositlerdeki oksidasyonu azaltıcı yönde etki göstermesine atfedilebilir. Kontrol grubu ile CCl₄ grubu karşılaştırıldığında, MDA miktarı karaciğer dokusunda yaklaşık 5 kat artış gösterdi, Silibinin ile tedavi edilen sıçanlarda MDA seviyesinde önemli düşüşler görüldü. Yapılan birçok çalışmada karaciğer hastalıklarında oksidatif stres ve buna bağlı olarak ortaya çıkan karaciğer hasarı ile fibrozis arasında ilişki olduğu gösterilmiştir (Shimizu, 2001; Shimizu, 2003). Polenle beslenen gruplarda da MDA seviyelerinde düşüşler gözlenmesine rağmen Silibinin seviyesinde tedavi görülmedi.

CCl₄'e maruz bırakılmış sıçanlarda yapılan bir çalışmada AST ve ALT enzimleri ile birlikte MDA seviyelerinin karaciğer ve plazma da anlamlı olarak artış gösterdiği ve enginar (*Cynara scolymus* L.) ekstraktlarının gerek AST, ALT enzimlerini ve gerekse MDA' yı anlamlı olarak azalttığı bildirilmiştir (Mehmetçik vd., 2008).

Oksidatif stres pek çok serbest oksijen radikallerinin oluşumuna yol açtığı gibi oluşan radikal ajanlar enzimlerin inhibisyonuna, lipid peroksidasyonuna, DNA hasarı gibi bozukluklara yol açmaktadır. Yapılan çalışmada oksidatif stresin MDA'dan başka süperoksit dismutaz (SOD) ve redükte glutatyon antioksidan enzimler üzerindeki etkileri de ölçüldü. Plazma, karaciğer dokusu ve eritrositlerde SOD aktivitesi ve eritrositlerde GSH aktiviteleri ölçüldü.

3 Farklı kontrol grubunda plazma ve karaciğer SOD aktivitelerinde anlamlı farklılık gözlemlenmezken, 4. Grup (CCl₄) sıçanlarda SOD seviyesinde önemli bir düşüş gözlemlendi. Silibinin ve polen beslemelerinin SOD seviyesini anlamlı şekilde yükseltmesine rağmen yükseliş kontrol grubu seviyesini bulmadı. Eritrosit paketlerinde SOD aktivitesinde anlamlı bir farklılık gözlemlenmezken farklı şekilde zeytinyağı kontrol grubunda SOD seviyesi artış gösterdi.

SOD metabolizmada oksijenin eksik indirgenmesi ile oluşan süperoksit radikallerinin temizlenmesinde rol oynayan bir enzimdir. Artan süperoksit radikalleri durumunda baskılanmadan dolayı SOD aktivitesinin de artması beklenir, fakat CCl₄'e maruz bırakılan sıçanlarda SOD aktivitesi yaklaşık %50 ve daha fazla miktarda azalma gözlemlendi. Bunun sebebinin, yoğun ve akut oksidatif stresin karaciğer hücre hasarına yol açması ve buna bağlı sentez yeteneğinde azalmanın olduğu düşünülmektedir.

Sıçanlarda redükte glutatyon enzimi seviyeleri incelendiğinde eritrosit paketlerinde GSH seviyesi ilk üç gruptaki kontrol gruplarına nazaran CCl₄ muamelesi yapılan sıçanlarda önemli seviyede düşüş gösterdi, Silibinin ve yüksek doz polen beslemesinin GSH seviyesini kontrol grubu seviyesine çıkardığı, düşük doz polen beslemesinin de kısmi bir yükselişe neden olduğu tespit edildi.

GSH endojen bir antioksidan ajan olup serbest olarak ve bazı antioksidan enzimlerin kofaktörü olarak hücre içinde rol alır. GSH vücudun birçok hücresinde bulunan ve hücrenin fonksiyonel proteinlerini oksidan ajanlara karşı koruyan bir tripeptittir (Champe ve Harvey,1997). Hücre içerisinde indirgen formda (GSH) bulunur. Endojen üretilen peroksitlere karşı okside olarak onları indirger. Glutatyon peroksidaz bu reaksiyonu katalizler. Glutatyon etkin olarak hücreyi koruyabilmesi için büyük kısmı redükte halde

tutulmalıdır. Bu reaksiyonu da glutatyon redüktaz katalizler. Glutatyonun glutatyon redüktazla indirgenmesi reaksiyonu NADPH'a ihtiyaç duyduğu için heksoz monofosfat yoluyla bağlantılıdır (Vincent vd., 2004; Memisogullari vd., 2003; Cherubini vd., 2005; Sözmen, 2002). Yapılan çalışmalarda diyabette GSH düzeylerinin sağlıklı kişilerden anlamlı şekilde düşük olduğu rapor edilmektedir (Abou-Seif ve Youssef, 2004).

CCl_4 ve alkol gibi toksik ajanlara maruz bırakılmış sıçanlarda yapılan çalışmalarda da çalışmamıza benzer sonuçlar bulunmuştur (Mehmetçik vd., 2008). Nitekim Eraslan vd. (2010) yaptıkları çalışmada triklorofor karaciğer hasarı oluşturdukları farelerin kan ve dokularında SOD, GSH-PX ve CAT aktivitelerinin anlamlı olarak azalma gösterdiği bildirilmiştir.

Eraslan vd. (2008a) yaptıkları çalışmada Karbaril pestisitinin sıçanlarda oluşturduğu oksidatif stres parametrelerini incelemiş (SOD, MDA, CAT, GSH) ve polen ekstraktları ile beslemenin tedavi edici etkisini ortaya koymuştur. Yine başka bir çalışmada (Eraslan vd., 2008b) prokürsörün sıçanlardaki oksidatif etkisinin polenle besleme sonrasında azaltıldığı ortaya konulmuştur.

Sıçanlarda incelenen parametrelerin birbirleri ile olan korelasyonu incelendi ve ağırlık değişiminin eritrosit GSH ve MDA'sı dışındaki tüm parametrelerle korelasyon gösterdiği tespit edildi. Bu anlamda AST (p:0,003; r:-0,421), ALT (p:0,003; r:-0,416), plazma MDA (p:0,00; r:-0,558), karaciğer MDA (p:0,003; r:-0,422) seviyeleri ile güçlü negatif korelasyon gösterirken; eritrosit (p:0,19; r:0,333), plazma (p:0,00; r:0,521) ve karaciğer SOD (p:0,00; r:0,523) seviyeleri ile pozitif korelasyon gösterdi. Yine beklendiği gibi AST-ALT arasında güçlü bir pozitif korelasyon hesaplandı. Buna ilaveten AST seviyeleri plazma ve karaciğer MDA seviyeleri arasında güçlü pozitif korelasyon (p:0,00; r:0,373-0,848) tespit edilirken, SOD ve GSH seviyeleri ile arasında güçlü negatif korelasyon bulundu. ALT seviyelerinin diğer parametrelerle korelasyonu AST'nin korelasyonları ile paralellik gösterdi.

Plazma, eritrosit ve karaciğer MDA seviyelerinin birbirleri ile güçlü pozitif korelasyon gösterdiği tespit edildi. Bu korelasyonlar plazma MDA – karaciğer MDA için p:0,002, r:0,430; plazma MDA-eritrosit MDA için p:0,0022, r:0,328 olarak hesaplandı. Eritrosit GSH seviyesi ile AST, ALT seviyeleri ve karaciğer MDA seviyeleri arasında güçlü negatif korelasyonlar tespit edilirken, karaciğer SOD seviyesi arasında pozitif korelasyon tespit edildi.

Çalışmamızda sıçanların elde edilen verilerine SPSS programı ile diskiriminant (ayırım) metodu uygulandı. Diskriminant analizi, birimleri en az hata ile ait oldukları kitlelere ayırmak için yapılan işlemler topluluğu olarak tanımlanmaktadır. Diskriminant analizinin temeli, incelenen birimlerin kitlesinin belirlenmesini sağlayacak bir fonksiyonu bulmak ve bu fonksiyonlar yardımıyla yeni gözlenen bir birimi sınıflama hatası minimum kılacak biçimde gruplardan birine atama yapmaktır (Yüksel, 2002; Özdamar, 1999; Tatlıdil,1996). Diskiriminant analizi doğrultusunda diskiriminant fonksiyonu yardımıyla elde edilen merkezlerin birbirlerinden ayrıldığı; bunlar içinde 1., 2. ve 3. grupların merkezlerinin birbirlerine oldukça yakın olduğu; 4-7. grupların ise birbirlerinden oldukça ayırım gösterdiği; 5. ve 7. grupların grup merkezlerinin birbirlerine daha yakın olduğu görüldü. Bu çalışma ile elde edilen serpilme grafiğine bakıldığında grupların incelenen parametreler çerçevesinde rahatlıkla birbirlerinden ayrılabilirdiği, kontrol gruplarının ise beklendiği ve amaçlandığı gibi bir merkez çerçevesinde yoğunlaştığı görüldü.

Çalışmada CCl_4 'ün toksik etkilerine bağlı olarak oksidatif stresi artırdığı, polen ve Silibininin ise meydana gelen bu strese karşı lipit peroksidasyonunu önleyerek, SOD ve redükte glutatyon gibi antioksidan moleküllerin miktarını arttırarak ve bir serbest radikal temizleyicisi gibi rol oynayarak koruyucu etki yapabileceği kanaatine varıldı.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Daha çok çiçek tozu olarak bilinen polen, arıların çiçeklerden nektar toplamaları sırasında bacaklarına yapışarak kovana taşıdıkları doğal bir üründür. Doğadaki tozlaşmanın büyük bir çoğunluğu arılar tarafından polenlerin taşınması esnasında sağlanmaktadır. Polen az miktarda bala karıştığından balın şifa kaynağı olmasında büyük role sahipken polen peletlerinin birleştirilmesinde kullanılan bal özleri de polene biyolojik aktivite ve kısmi tatlılık katmaktadır. Polenin biyolojik değeri insan sağlığını korumada ve çeşitli hastalıkların doğal yollarla tedavi edilmesinde öne çıkmaktadır. Yapısında protein, karbohidrat ve lipitlerden başka sekonder metabolit olarak adlandırılan pek çok vitamini, fenolik ajanları ve fitokimyasalları barındıran biyolojik olarak son derece aktif önemli bir doğal üründür. Biyolojik önemi bileşimine bağlı olarak değişim gösterdiğinden diğer apiterapik arı ürünleri floral orijinine bağlı olarak değişmekle birlikte bazı polen türleri ön plana çıkmaktadır.

Nitekim planladığımız çalışmada Türkiye florasına ait Karadeniz bölgesinden dört farklı polen türünün kimyasal ve fiziksel bileşimleri incelendi ve Doğu Karadeniz Bölgesi Zonguldak yöresi kestane poleninin toplam fenolik madde miktarı ve antioksidan kapasitesi bakımından daha yüksek olduğu bulundu. Buradan hareketle planlanan *in vivo* çalışmada planlanan dozlarda etkinliği daha iyi analiz edebilmek adına biyolojik etkinliği en yüksek olan polenin kullanılmasına karar verildi.

Palinolojik değerlendirmesinde kestane polenini ağırlıklı içerdiği tespit edilen polenlerin oksidasyon ile oluşturulan karaciğer hasarını önlemedeki etkinliği çalışmada test edildi ve karaciğer hasarlarını önlemede etkin olduğu bildirilen, doğal bir bitkiden izole edilen, flavonoid yapıya sahip Silibinin ile etkinlikleri karşılaştırıldı. Sulu ortamda hazırlanan ve gavaj yoluyla verilen iki farklı konsantrasyondaki polen i.p. yolla verilen CCl₄ ile birlikte sıçanlara verildi. Karaciğer hasarının oluşması ve hasarın tedavi süreci ALT ve AST transaminaz enzimlerinin plazmadaki konsantrasyonları ile, eritrosit, plazma ve karaciğer dokusundaki SOD, MDA ve GSH gibi parametrelerin seviyesi ile takip edildi.

Elde edilen veriler derlendiğinde;

1) Bir gıda maddesi olarak kabul edilen ve arı kovanlarından polen tuzakları ile toplanan polenler, toplandıkları bölge florasına ve zamana bağlı olarak oldukça değişkenlik göstermekte olduğu, Haziran-Temmuz aylarında Karadeniz bölgesinden toplanan ve

çalışmamıza konu olan polenlerin birçok farklı bitki poleni ile birlikte kestane ağırlıklı bir polen içeriği gösterdiği;

2) Çalışmada incelenen kestane polenlerinin oldukça yüksek biyolojik aktiviteye sahip olduğu, bunlar içerisinde Zonguldak/Ereğli bölge polenlerinin daha yüksek aktivite gösterdiği;

3) Fiziksel, kimyasal ve biyolojik özellikleri ortaya çıkarılan, *in vitro* ve *in vivo* antioksidan etkisi aydınlatılan kestane poleninin iyi bir apiterapik ürün olduğu

4) Çalışmamızda karaciğer hasarı oluşturmak üzere seçilen CCl₄'ün karaciğerde ciddi hasarlar oluşturan oldukça toksik bir madde olduğu ve ölçülen parametrelerde oksidasyon göstergelerini (AST, ALT, SOD, MDA, GSH) önemli miktarlarda değiştirdiği;

5) Çalışmada denenen konsantrasyonlarda serum fizyolojik, etanol ve zeytinyağının karaciğer hasarına yol açmadığı, ancak etil alkolün bazı parametreleri olumsuz etkilediği;

6) 200 ve 400 mg/kg sıçan başına gavaj yolla verilen polenlerin hasarı önlemede etkin olduğu ve bu etkinliğin polen konsantrasyonu ile orantılı olarak değişim gösterdiği;

7) Deve dikeninden izole edilen ve bir flavolignin olan Silibinin'in 50 mg/kg konsantrasyonda karaciğer hasarını önlemede 200 mg/ kg polen beslemesinden daha etkili olduğu, fakat bu konsantrasyonda sıçanların mide ve barsak sistemine zarar verdiği ve ayrıca kilo kaybına yol açtığı;

8) 400 mg/kg konsantrasyonda polenin karaciğer hasarını önlemede etkili olduğu ve aynı zamanda sıçanları beslediği;

9) İntraperitonel yolla verilen CCl₄'ün sıçanların antioksidan sistemleri üzerine etkili olduğu ve lipid peroksidasyonuna neden olduğu, bu oksidasyon seviyesinin karaciğer dokusu, plazma ve eritrositlerde artan MDA seviyelerinden anlaşılabilirdiği;

10) CCl₄ oksidasyonunun süperoksit dismutaz (SOD), redükte glutatyon (GSH) metabolizmalarını etkilediği ve inhibisyonlarına, sentezlerinde azalmaya neden olduğu ve polen tedavisinin bu enzim seviyelerinde yükselmeye neden olduğu;

11) Çalışmada kullanılan diskriminant analizi ile sıçanlarda yapılan gruplama sonrasında bu ayırım metodunun hayvansal çalışmalarda etkin şekilde kullanılabileceği görülmüştür.

Sonuç olarak bir gıda maddesi olarak polenin etkin bir biyolojik aktiviteye sahip olduğu, sulu ekstraktlarının silibinine kıyasla oksidasyonu önleyici, oluşan radikalik ajanları temizleyici ve oluşan hasarları tamir edici fonksiyona sahip olduğu belirlendi. Arı ürünleri içerisinde önemli bir yere sahip olan ancak ögünsel tüketimde fazla kullanılmayan

polenin insan sağlığını korumada etkili olabileceği ve kimyasal yollarla tedavi edilemeyen karaciğer hasarlarının (akut, kronik hepatit, siroz) önlenmesinde oral yola alınacak polenlerin etkin olabileceği düşünölmektedir.

Çalışmada elde edilen verilere ilave olarak çalışma sonuçlarının desteklenmesi adına;

a) İlerleyen çalışmalarda karaciğer hasarının belirlenmesinde AST ve ALT enzimlerinden başka karaciğer biyopsileri ve histopatolojik testler kullanılmalıdır.

b) Ayrıca çalışma klinik bazı çalışmalarla desteklenmeli, insan karaciğer doku hasarının önlenmesindeki rolü çalışılmalıdır.

c) Farklı floral orijinli polenlerin ve diğer arı ürünlerinin etkileri de incelenmelidir.

d) Çalışmanın ileri aşamalarında DNA hasarı, diğer antioksidan enzim aktiviteleri ve karbonik anhidraz aktivitesi gibi parametreler de çalışılmalıdır.

e) Polen alerjisi olan kişilerde de çalışma denenmeli, bu kişilere polenlerden etken maddelerin ekstre halinde verilmesi incelenmelidir.

f) Polenlerin günlük tüketimde miktarının artırılabilmesi için gıdaların (krem peynir, bebek maması, yoğurt, bisküvi vb...) içerisine katkı maddesi ve/veya ingrediyeni olarak kullanılabilirliği Ar-Ge çalışmaları ile ortaya konulmalıdır.

7. KAYNAKLAR

- Abou-Seif, M.A. ve Youssef, A., 2004. Evaluation of Some Biochemical Changes in Diabetic Patients, Clin. Chim. Acta., 346, 161–170.
- Aebi, H., 1974. Catalase, In: H.U. Bergmeyer, (Ed): Methods of Enzymatic Analysis, Academic Press, New York and London, 673-677.
- Ahıskalıoğlu, A., 2007. *Anemone narcissiflora* Bitkisinin Karakterizasyonu Ve Biyolojik Aktivitesinin İncelenmesi, Yüksek Lisans Tezi, KTÜ, FBE, Trabzon.
- Akkuş, I., 1995. Serbest Radikaller ve Fizyopatolojik Etkileri, 1.Baskı, Mimoza Yayınları, Konya.
- Aksoy, F., 1977. Karaciğerin Histolojisi, Türk Patoloji Dergisi, 4,3, 153-155.
- Aksu, S., 1971. Bitkisel Maddeler Kimya ve Teknolojisi, İstanbul, 68-98-217.
- Akşit, D., Yıldız, Z., Çelik, H. ve Sargon, M., 1998. Karın II: Karın Boşluğu, Klinik Anatomi, Ed., M. Yıldırım, 5. Baskı, 216-219, Yüce Yay., İstanbul.
- Aktaş, M., 2005. Değirmenci,U., Ercan, S.K., Tamer, L., Atik, U., Türk Klinik Biyokimya Dergisi, 3, 95-99
- Akyol, E. ve Korkmaz, A., 2006. *Varroa destructor*'un Biyolojik Kontrol Yöntemleri, (Biological Methods to Control of the *Varroa destructor*), Uludağ Bee Journal, 6,2, 62-67.
- Al Somai, N., Coley, K.,E., Molan, P.C. ve Hancockb, M., 1994. Susceptibility of *Heliobacter pylori* to the Antibacterial Activity of Manuka Honey, J.Royal Soc. Med., 87, 9-12.
- Alasalvar, C., Shahidi, F., Liyanapathirana, C. M. ve Ohshima, T. 2003. Turkish Tombul Hazelnut (*Corylus avellane* L.) : 1. Compositional Chracteristics., J Agr. Food Chem., 51, 3790-3796.
- Aljadi, A.M. ve Kamaruddin, M.Y., 2004. Evaluation of the Phenolic Contents and Antioxidant Capacities of Two Malaysian Floral Honeys, Food Chem., 85, 4, 513-518.
- Al-Mamary, M. A. ve Al-Meerı Al-Haborı, M., 2002. Antioxidant Activities and Total Phenolics of Different Types of Honey, Nutrition Res., 22, 1041–1047.
- Almaraz-Abarca, N., Campos, MG., Ávila-Reyes, JA., Naranjo-Jiménez, N., Corral, JH. ve González-Valdez, LS., 2007. Antioxidant Activity of Polyphenolic Extract of

Monofloral Honeybee-collected Pollen from mesquite (*Prosopis juliflora*, *Leguminosae*), J. Food Compos Anal., 20, 119-124.

Almeida-Muradian, L. B., Pamplona, L. C., Coimbra, S. ve Barth, O. M.,2005. Chemical Composition and Botanical Evaluation of Dried Bee Pollen Pellets, J. Food Compos Anal., Madison, 18,1, 105-111.

Altınışik, M., 2011. <http://www.mustafaaltinisik.org.uk/21-adsem-01.pdf>, 15 Ekim 2011.

Anderson, T.W.,2003. An Introduction to Multivariate Statistical Analysis, Third Edition", New Jersey: Wiley-Interscience.

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 Chem., 60, 79-84.

Antonenkov, VD., 1989. Dehydrogenases of The Pentose Phosphate Pathway in Rat Liver Peroxisomes, Eur J Biochem, 183, 75-82.

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, J Agr. Food Chem, 52, 7970–7981.

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.

Arora, A., Nair, M. ve Strasburg, G.M., 1998. Structure-Activity Relationships for Antioxidant Activities of A Series Of Flavonoids in A Liposomal System, Free Radical Biology and Medicine, 24, 1355–1363.

Arrick, B. ve Nathan, C., 1984. Glutathione Metabolism as Determinant of The Therapeutic Efficacy: A Review. Cancer Res, 33, 4224-32.

Arvanitoyannis, S., Chalhoub, C., Gotsiou, P., Lydakis-Simantiris, N. ve Kefalas, P., 2005. Novel Quality Control Methods in Conjunction with Chemometrics (Multivariate Analysis) for Detecting Honey Authenticity , Crit Rev Food Sci Nutr., 45, 3, 193–203.

Aslan, D., 2005. Tietz,"Klinik Kimyada Temel İlkeler", Beşinci Baskıdan Çeviri, Palme Yayıncılık, 748-760.

Aslan, S., 1985. Modern Teşhis İlaç ve Tedavi, Beta Basım Yayın Dağıtım, İstanbul, 1, 258-273.

- Aslan, A. ve Bayraktar, A., 1996. Arı Sütlerinin Kimyasal Bilesimi ve Beslenme Açısından önemi, II. Gıda Mühendisliği Kongresi, Gaziantep.S:339-349, Apitherapy Society (many case histories and literature reviews) Vol.2.
- 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.
- Aydemir, T. ve Kuru, K., 2003. Purification and Partial Characterization of Catalase from Chicken Erythrocytes and The Effect of Various Inhibitors on Enzyme Activity, Turk J Chem., 27, 85-97.
- Aytekin, Y. ve Solakoğlu, S., 2006. Temel Histoloji. 10. Baskı, 322-344, Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul.
- Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D. ve Idaomar, M., 2008. Biological Effects of Essential Oils- a Review, Food Chem Toxicol., 46, 446-475.
- Bal Tebliği, 2000. Türk Gıda Kodeksi 2000/39 sayılı Bal Tebliği.
- Basaga, H.S., 1990. Biochemical Aspects of Free Radicals, Biochem. Cell. Biol., 68, 989-998.
- Basim E., Basim H. ve Özcan M., 2006. Antibacterial Activities of Turkish Pollen and Propolis Extracts Against Plant Bacterial Pathogens, J. Food Eng., 77, 992-996.
- Bast, A., Haenen, G.R.M.M. ve Doelman, C.J.A., 1991. Oxidants and Antioxidants: State of the Art, Amer J Med Sci., 91, 3625-3635.
- Baydar, H., 1989. Tıbbi, Aromatik ve Keyf Bitkileri Bilimi ve Teknolojisi, Süleyman Demirel Üniversitesi Ziraat Fak. Yayınları, Yayın no:51.
- Bayrak, N., 2005. Arı Ürünlerinin (Bal, arı sütü, polen ve propolis) Mikrofloralarının ve Antimikrobiyal Aktivitelerinin İncelenmesi, Yüksek lisans tezi, Fırat Üniv. FBE, Elazığ.
- Baytop, T., 1999. Türkiye’de Bitkilerle Tedavi, Nobel Tıp Kitabevi, İstanbul.
- Baytop, T., 2001. Therapy with Medicinal Plants in Turkey (Past and Present),1st Ed. Istanbul University, İstanbul.
- 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., Oriolı, 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.

- Bismuth, H., 1982. Surgical anatomy and anatomical surgery of the liver, World J.Surg., 6, 1, 3-9.
- Board, P., Coggan, M., Johnston, P., Ross, V., Suzuki T. ve Webb, G., 1990. Genetic Heterogeneity of The Human Glutathione Transferases: A Complex of Gene Families, Phar Ther, 48, 357-369.
- Bogdanov S., Rieder K. ve Rüegg M., 1987. Neue Qualitätskriterien bei Honiguntersuchungen, Apidologie, 18, 267-278.
- Bogdanov, S. ve Baumann, S., E., 1998. Bestimmung von Honigzucker mit HPLC, Mitt. Gebiete Lebensm. Hyg., 79, 198-206.
- Bonaga, G. ve Giumanini, AG., 1986. The volatile fraction of chestnut honey, J Apicult Res, 25, 113–20.
- Boyunağa, H. ve Çelik C., 1996. Serbest radikaller ve hücre sel denge, Bilim Teknik Dergisi, 347, 98-100,
- Bravo, L., 1998. Polyphenol Chemistry, Dietary Sources, Metabolism And Nutritional Significance, Nutr Rev, 56, 317-333.
- Bublitz, C. ve Steavenson, S., 1988. The pentose phosphate pathway in the endoplasmic reticulum, J Biol Chem, 263, 12849-12853.
- Burda, S. ve Oleszek, W., 2001. Antioxidant and Antiradical Activities of Flavonoids, J Agric Food Chem, 49, 2774– 2779.
- Busaua, F.I.S., 1990. Biochemical aspects of free radicals, Biochem Cell Biol., 68, 989-998.
- Cai, Y. Z., Sun, M., Xingc, J., Luo ,Q. ve Corke, H., 2006. Life Sci., 78, 2872 – 2888.
- Calderone, N. W. ve Johnson, B.R., 2002. The withinnest behaviour of honeybee pollen foragers in colonies with a high or low need for polen, Anim Behav, 63, 749-758.
- 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.
- Cannac, M., Pasqualini, V., Greff, S., Fernandez, C. ve Ferrat, L., 2007. Characterization of phenolic compounds in *Pinus laricio* needles and their responses to prescribed burnings, Molecules, 12, 1614–22.
- Canuto, R.A., Muzio, G., Maggiora, M., Biocca, M.E. ve Dianzani M.U., 1993. Glutathione S Transpherase, alcohol dehydrogenase and aldehyde dehydrogenase activities during diethylnitrosamine carcinogenesis in rat liver, Cancer Lett., 68, 177-183.

- Cao, G., Sofic, E. ve Prior, R., 1997. Antioxidant and prooxidant behavior of flavonoids: structure-activity relationships, Free Radical Biol Med., 22, 749– 760.
- Carrera, S, Mitjavila, S. ve Derache, R., 1973. Effect of tannic acid on the digestive availability of vit. B12 in rats, Ann. Nutr. Aliment, 27, 73.
- Cassidy, A., Hanley, B. ve Lamuela-Raventos, R.M., 2000. Isoflavones, lignans and stilbenes—origins, metabolism and potential importance to human health, J. Sci.Food Agr. 80, 1044– 1062.
- Champe, P.C. ve Harvey, R.A., 1997. Glikozaminoglikanlar., Tokullugil A., Dirican M., Ulukaya E., Lippincott's illustrated reviews serisinden, Biyokimya, İkinci baskı, Nobel Tıp Kitabevi, İstanbul, 147-156.
- Chao, J.C., Huang, CH., Wu, SJ., Yang, SC., Chang, NC., Shieh, MJ. ve Lo, PN., 2002. Effects of beta-carotene, vitamin C and E on antioxidant status in hyperlipidemic smokers, J Nutr Biochem., 13, 427-434.
- Cheeseman, K, H. ve Slater, T,F., 1993. An Introduction to Free Radical Biochemistry, Brit Med Bull., 49,3, 479-480.
- Chen, L.H., Boissonneault, G.A. ve Glauert, H. P., 1998. Vitamin C, Vitamin E and Cancer (Review), Anticancer Res., 8, 739-748.
- Cherbuliez, TH., 1997. Bee Venom Therapy-A Review, International Conference on: Bee Product: Properties, Applications and Apitherapy P:54. Israel.
- Cherubini, A., Ruggiero, C., Polidori., MC. ve Mecocci, C., 2005. Potential markers of oxidative stress in stroke, Free Radical Biol Med., 39, 841 – 852.
- Chung, KT, Wei, CI. ve Johnson, MG., 1998. Are tanens a double-edged sword in biology and health? Trends Food Sci Technol., 9, 168-175.
- Chung, KT., Wong, TY., Wei, CI., Huang YW. ve Lin, Y., 1998. Tanens and human Health: a Review, Crit. Rev. Food Sci. Nutr.,38, 421-468.
- Codex Standard For Honey, 1981. Supersedes the Codex European Regional Standard for Honey (CODEX STAN 12).
- Cotton, C. M., 1996. Ethnobotany : principles and applications. John Wiley & Sons, Chichester ; New York.
- Cowan, M.M., 1999. Plant products as antimicrobial agents, Clin Microbiol Rev., 12, 4, 564-582.
- Crane, E., 1990. Bees and beekeeping: Science, Practice and World Resources. Cornstock Publ., Ithaca, NY., USA.

- Crawford, J.M., 2002. The Liver and the Biliary Tract, In “Robbins Basic Pathology”. Ed. V. Kumar, R.S.Cotran and S.L.Robbins, 7th Ed., 592-611, Elsevier Saunders, Philadelphia.
- Cuevas-Glory, L.F., Pino, J.A., Santiago, L.S. ve Sauri-Duch, E., 2007. A review of volatile analytical methods for determining the botanical origin of honey, Food Chem., 103, 1032–1043.
- Çakmak, İ., Aydın, L., Camazine, S. ve Wells, H., 2002. Polen Traps and Walnut-Leaf Smoke for Varroa Control, Amer Bee J., 142, 367-370
- Çalıkoğlu, E., Kıralan, M., Bayrak, A., 2006. Uçucu Yağ Nedir, Nasıl Üretilir ve Türkiye'deki Durumuna Genel Bir Bakış, Türkiye 9. Gıda Kongresi; Bolu, 24-26 Mayıs 2006.
- Çay, A., İmamoğlu, M., Unsal, M.A., Aydın, S., Alver, A., Akyol, A. ve Sarihan, H., 2006. Does Anti-Oxidant Prophylaxis with Melatonin Prevent Adverse Outcomes Related to Increased Oxidative Stress Caused by Laparoscopy in Experimental Rat Model? J Surg Res., 135, 2-8.
- Çelik, N., Bulur, V., 1996. Çayır-mera ve yem bitkileri kaynaklı hayvan zehirlenmeleri ve beslenme bozuklukları, Türkiye 3. Çayır-mera ve yem bitkileri kongresi, 17-19 Haziran, 51-58, Erzurum.
- D’Andrea, V., Pe’rez, L.M. ve Pozzi, E.J.S., 2005. Inhibition of rat liver UDP-glucuronosyltransferase by silibinin and the metabolite silibinin-glucuronide, Life Sci., 77, 683–692.
- Dashti, H., Jeppsson, B., Hägerstrand, I., Hultberg, B., Srinivas, U., Abdulla, M. ve Bengmark, S., 1989. Thioacetamide- and carbon tetrachloride-induced liver cirrhosis, Eur. Surg. Res., 21, 83-91.
- Davies, M.J., 1990. Detection of myoglobin - derived radicals on reaction of metmyoglobin with hydrogen peroxide and other peroxidic compounds, Free Radic Res., 10, 36-370.
- Davies, B.H., 1976. Carotenoids in chemistry and biochemistry of plant pigments., Ac. Press. London, 2, 38-165.
- Devay, S. D., 2008. Karbon Tetraklorür ile Deneysel Siroz Oluşturulan Ratlarda Serbest Radikal Metabolizması; Stobadin’in Antioksidan Etkisi, Uzmanlık Tezi, Gazi Üniversitesi , Tıp Fakültesi.
- Dobson, H. E. M., Peng, Y. S., 1997. Digestion of pollen components by larvae of the flower-specialist bee *helostoma florissomne* (Hymenoptera: Megachilidae), J. Insect physio., 43, 89-100.
- Dringen, R., Pawlowski P.G., 2005. Hirrlinger J., Peroxide detoxification by brain cells, J. Neurosci. Res., 79, 157-165.

- Durak, I., Canbolat, O., Kavutcu, M., Öztürk, HS. ve Yurtarslanı, Z., 1996. Activities of total, cytoplasmic and mihochondrial superoxide dismutase enzymes in sera and pleural fluids from patient with lung cancer, J. Clin. Lab. Anal., 10, 17-20.
- Dündar, Y. ve Aslan, R., 2000. Hekimlikte Oksidatif Stres ve Antioksidanlar, 1. Basım, Afyon Kocatepe Üniversitesi, Afyon..
- Edge, R., Mc Garvey, D.J. ve Truscott, T.G., 1997. The Carotenoids as Antioxidants-A Review, J. Photoc. Photobio., 41, 189-200.
- Elgün, A., Türker, S., Bilgiçli, N., 2005. Tahıl ve Ürünlerinde Analitik Kalite Kontrolü, S.Ü. Ziraat Fakültesi, Gıda Müh. Yay., Konya.
- Elkins, R., 1996. Bee polen royal jelly propolisand honey, Woodland Publishing, London.
- 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. ve Karabacak, M., 2010. Beneficial effect of in honey on trichlorfon induced some biochemical alterations inmice, Ecotoxicolo Environ Safety, 73, 1084–1091.
- Erdemir, I., Zorba, E., Işık, O. ve Savucu, Y., 2005. Tek doz polen yüklemesinin dayanıklılık sporcularında maksimal oksijen tüketim ve kan parametrelerine etkisi, F.Ü. Sağlık Bilimleri Dergisi, 19,185-191.
- Erdogan, Y. ve Dodologlu, A., 2005. Bal Arısı (Apis Mellifera L.) Kolonilerinin Yasamında Polenin önemi, Uludag Bee Journal, May, 5.2.
- Ergezer, H., Çam, M., 2008. Tanenler: Sınıflandırma, Yapıları ve Sağlık Üzerine Etkileri, Türkiye 10. Gıda Kongresi; 21-23 Mayıs, Erzurum.
- Erten, R., 2009. Karbontetraklorür ile oluşturulan deneysel karaciğer hasarında dihydromyrcenol ve geranyl formate'nin karaciğeri koruyucu etkisi, Yüzüncü Yıl Üniv.Tıp Fakültesi, Patoloji Abd., Uzmanlık tezi, Van.
- Esterbauer, H., Gebicki, J., Puhl H. ve Jügens, G., 1992. The role of lipid peroxidation and antioxidants in oxidative modification of LDL, Free Radic Biol Med, 13, 341-90.
- Evans, P., Lyras, L. ve Halliwell, B., 1999. Measurement of protein carbonyls in human brain tissue, Methods Enzymol., 300, 145-156.
- Evans, M.D. ve Cooke, M.S., 2004. Factors contributing to the outcome of oxidative damage to nucleic acids, Bioessays, 26, 533-542.
- Fantone, J.C. ve Ward, P.A., 1985. Polymorphonuclear Leukocyte Mediated and Tissue Injury, Hum Pathol., 16, 973-978.

- Felix, K., Rockwoodi, LD., Pretsch, W., Nair J., Bartsch, H., Bornkamm, GV. ve Janz S., 2002. Moderate G6PD deficiency increases mutation rates in the brain on mice, Free Radical Biol Med., 32, 663-673.
- Frei, B., 1994. Reactive Oxygen Species and Antioxidants Vitamins mechanisms of action, The Amer J Med., 97, 5-13.
- Fridovich, I., 1983. Superoxide Radical: An Endogenous Toxicant, Ann Rev. Pharmacol Toxicol, 23, 239-257.
- Fujii, A, Kobayashi, S, Kuboyama, N, et al., 1990. Augmentation of wound healing by royal jelly in streptozotocin-diabetic rats, Jpn J Pharmacol, 53, 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, 33-78-83.
- Garcia, SC, Schott, K, Charão, M, Moro, A, Bulcão, R, et al., 2008. Quantification of reduced glutathione by HPLC-UV in erythrocytes of hemodialysis patients, Biomed Chromatogr., 22, 460–8.
- Gergen, I, Radu, F., Bordean, D. ve Isengard, H.D., 2006. Determination of water content in bee pollen samples by Karl Fischer titration, Food Control, 17, 176–179.
- Giusti, M. M. ve Wrolstad, R. E., 2001. Unit F1.2.1-13. Anthocyanins, Characterization and measurement with Uvvisible spectroscopy, In R. E. Wrolstad (Ed.), Current Protocols in Food Analytical Chemistry, R.E. Wrolstad, and S.J.Schwartz, (eds.), F1.2.1.-13, John Wiley&Sons, New York, NY, USA.
- Gonza'lez Parama's, A.M., Ba'rez, J.A.G., Marcos, C.C., Garcı'a-Villanova, R.J. ve Sa'nchez, J.S., 2006. HPLC-fluorimetric method for analysis of amino acids in products of the hive (honey and bee-pollen), Food Chem., 95, 148–156.
- Goth, L., 1991. A simple method for determination of serum catalase activity and revision of reference range, Clin. Chim. Acta., 196, 143-51.
- Groot H., 1994. Reactive oxygen species in tissue injury, Hepato-gastroenterol., 41, 328-332.
- Gudehithlu, K.P, Pegoraro, A.A, Dunea, G., Arruda, J.A. ve Singh, A.K., 2004. Degradation of albumin by the renal proximal tubule cells and the subsequent fate of its fragments, Kidney Int., 65, 2113-22.
- Güven, A., Erginsoy, S., 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), Cavusoğlu H., (Ceviri Editoru), Nobel Tıp Kitabevi, İstanbul, Sayfa 884.
- Halliwell, B., 1996. Antioxidants in human health and disease, *Ann. Rev. Nutr.*,16, 33-50.
- Halliwell, B., Aruoma., O.I., 1991. DNA damage by oxygen- derived species, Its mechanism and measurement in mammalian systems, *FEBS Lett*, 281, 9-19.
- Halliwell, B., 2007. Biochemistry of oxidative stres, *Biochem Soc Trans.*, 35, 1147-1150.
- Halliwell, B. ve Gutteridge, J.M., 2000. Free Radical in Biology and Medicine, Third ed., Oxford University Press, Oxford, 160-165.
- Halliwell, B., 1990. How to characterize a biological antioxidant, *Free radic. Res. Commun*,1:1-32.
- Halliwell, B., Gutteridge J. M. ve Cross, E.C., 1992. Free Radical, Antioxidants, And Human Disease: Where are we now? *J Lab Clin Med.*, 119, 598-620.
- Handa, S.S. ve Sharma, A., 1990. Hepatoprotective activity of andrographolide from *Andrographis paniculata* against carbontetrachloride, *Indian J Med Res*, 92, 276-283.
- Harris, E.D., 1992. Regulation of antioxidant enzyrnes, *Faseb. J.*, 6, 2675-2683.
- Harrison, P.M. ve Arosio, P., 1996. The ferritins: molecular properties, iron storage function and cellular regulation, *Biochim Biophys Acta.*, 1275, 161-203.
- Harrison, P.M., 1997. Ferritin: an iron-storage molecule, *Semin Hematol.*, 14, 55-70.
- Hawkins, C.L. ve Davies, M.J., 2001. Generation and propagation of radical reactions on proteins, *Biochem. Biophys. Acta*, 1504, 196-219.
- Hayes, J.D. ve Pulford, D.J., 1995. The Glutathione S-Transferase supergene family: Regulation of GST and the contribution of the isoenzymes to cancer chemoprotection and drug resistance, *Crit Rev Biochem Mol Biol*, 30, 445-600.
- Heidrick, M.L., Hendricks, L.C. ve Cook, D.E., 1984. Effect of dietary 2-mercaptoethanol on the life span, immune system, tumor incidence and lipid peroxidation damage in spleen lymphocytes of aging BC3F1 mice, *Mech Ageing Dev*, 27, 341-358.
- Helle, R.A., Jesper, B.N. ve Fleming, N., 1997. Antioxidative enzyme activities in human erithrocytes, *Clin. Chem.*, 43, 562-68.
- Hill, R., 1977. Propolis: The Natural Antibiotic, Thorsons Publish Ltd.,Wellingborough, UK.

- Horvath, M.E, Gonzales Cabello, R., Blazovics, A et al., 2001. Effect of silibinin and vitamin E on restoration of cellular immune response after partial hepatectomy., J Ethnopharmacol, 77, 227-232.
- Human, H. ve Nicolson, W., 2006. Nutritional content of fresh, bee collected and stored pollen of *Aloe greatheadii* var *davyana* (Asphodelaceae), Phytochemistry, 67, 1486-1492.
- Ingenbleek, Y. ve Carpentier, Y. A., 1985. A prognostic inflammatory and nutritional index scoring critically ill patients, Int J Vitam Nutr Res., 55, 91-101.
- Inoue, S., Koya-Miyata, S., Ushio, S., Iwaki, K., Ikeda, M. ve Kurimoto, M., 2003. Royal Jelly prolongs the life span of C3H/HeJ mice: correlation with reduced DNA damage. Exp Gerontol., 38, 965–969.
- İnci, A., 1996. Sindirim Kanalının Salgı Fonksiyonları, Tıbbi Fizyoloji, Ed. H. Çavuşoğlu, 9. Baskı, 827-828, Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul.
- Jain, S.K. ve Levine, S.N., 1995. Elevated lipid peroxidation and vitamin E-quinone levels in heart ventricles of strep tozotocin-treated diabetic rats. Free Radic Biol Med., 18, 337-341.
- Jeleń, H.H., Wlazly, K., Wasowicz, E. ve Kamiński, E., 1998. Solid-phase microextraction for the analysis of some alcohols and esters in beer: comparison with static headspace method, J. Agric. Food Chem., 46, 1469-1473.
- Jenkins, R. R. ve Tengı, J., 1981. Catalase Activity in Skeletal Muscle of Varying Fiber Types, Experimentia, 37, 67-68.
- Jerry, P., Liu, L., Zeng, M. ve Stamler, J.S., 2000. An apoptotic model for nitrosative stress, Biochem, 39, 1040-1047.
- Jialal, I. ve Grundy, S.M., 1993. Effect of combined supplementation with alpha-tocopherol, ascorbate, and beta carotene on low-density lipoprotein oxidation, Circulation, 88, 2780-2786.
- Jo Bright Simon J., Hiscock, Philip E. ve James, John T., 2009. Hancock Pollen generates nitric oxide and nitrite: a possible link to pollen-induced allergic responses, Plant Physiol Biochem., 47, 1, 49.
- Kamakura, M., Mitani, N., Fukuda, T. ve Fukushima, M., 2001. Antifatigue effect of fresh royal jelly in mice, J Nutr Sci. Vitaminol, 47, 394–401.
- Karataş, F., Munzuroğlu, Ö. ve Gür, N., 2000. Arı polenlerindeki A, E ve C vitaminleri ile selenyum düzeylerinin araştırılması, F.Ü. Fen ve Müh.Bilimleri Dergisi, 12, 219-224.

- Karataş, F. ve Şerbetçi, Z., 2008. Arı Polenlerindeki Adrenalin ve Noradrenalin Miktarlarının HPLC İle Belirlenmesi, Fırat Üniv. Fen ve Müh. Bil. Dergisi, 3, 419-422.
- Kataoka, M., Arai, N., Taniguchi, Y., et al., 2001. Analysis of antiallergic function of royal jelly, Nat Med., 55, 174–180.
- Ketterer, B., Harris, J.M., Talaska, G., Meyey, D.J., Pemple, S.E., Taylor, J.B., Lang, N.P. ve Kadlubar, F.F., 1992. The Human Glutathione S-Transferase Supergene Family, Its Polymorphism, and Its Effects on Susceptibility to Lung Cancer. Env Health Persp., 98, 87-94.
- Khanbabaee, K. ve Ree, T., 2001. Tanens: Classification and definition, Nat. Prod. Rep., 18, 641–649.
- 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 Chem., 78, 213–217.
- Kolaylı, S. ve Keha E., 1999. A Comparative Study of Antioxidant Enzyme Activities in Freshwater and Seawater Adapted Rainbow Trout, J Biochem Mol Toxicol., 13,6, 334-337.
- Kolayli, S., Küçük, M., Duran, C., Candan F. ve Dinçer, B., 2003. Chemical and Antioxidant Properties of *Laurocerasus officinalis* Roem. (Cherry Laurel) Fruit Grown in the Black Sea Region, J Agr Food Chem., 51, 7489-7494.
- Konar, V., Özdemir, F.A., Karataş, F., 2010. Ticari Arı Polenlerinde B Vitamini Miktarlarının Araştırılması, Fırat Univ. Journal of Science, 22, 61-64.
- Kono, S., Ikeda, M., Tokudome, S. ve Kuratsume, M., 1988. A case-control study of gastric cancer and diet in northern kyushu, Japan. J. Cancer Res., 79, 1067-1074.
- Krebs, H.A. ve Eggleston, L.V., 1978. The regulation of the pentose phosphate cycle in rat liver. In: Weber G (ed). *Adv enzyme regul.* Oxford: Pergamon Press Ltd, 12, 421-33.
- Krell, R., 1996. Value-Added Products From Beekeeping. FAO Agricultural Services Bulletin No. 124 Food and Agriculture Organization of the United Nations Rome.
- Küçük, M., Kolayli, 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.
- LeBlanc, B.W., Davis, O.K., Boue,S., DeLucca, A. ve Deeby, T., 2009. Antioxidant activity of Sonoran Desert bee pollen, Food Chem., 115, 1299–1305.
- Lee, KH., 1992. Plant phenolics compounds as cytotoxic antitumour agents in phenolic compounds in food and their Effects on health, II. Antioxidants and Cancer Prevention, 367-379 ACS symposium Series 506, American Chemical Society.

- Lee, RG., 1994. Fibrosis and cirrhosis. *Diagnostic Liver Pathology*. First Ed. Mosby-ear Book Inc., 280-304.
- Leja, M., Mareczek, A., Wyżgolik, G., Klepacz-Baniak, J. ve Czekońska, K., 2007. Antioxidative properties of bee pollen in selected plant species, *Food Chem.*, 100, 237–240.
- Levy, HR., 1979. Glucose-6-phosphate dehydrogenases, In: Meister A (ed). *Advan Enzymol.*, New York: John Wiley and Sons Inc., 48, 97-191.
- Liebelt, R.A., Lyle, D. ve Walker, J., 1994. Effects of a bee pollen diet on Survival and Growth of Inbred Strains of Mice, *Amer Bee J.*, 134, 615-620.
- Lien, E.J., Ren, S.J., Bui, H.H. ve Wang, R. 1999. *Free Radical Biol Med.*, 26, 285–294.
- Linskens, H. F. ve Jorde, W., 1997. Pollen as food and medicine – A review. *Econ Bot.*, 51, 78-86.
- Listowsky, I., Abramowitz, M., Hama, H. ve Niitsu, Y., 1988. Intracellular binding and transport of hormones and xenobiotics by GST, *Rev.*, *Drug Metab. Rev.*, 19, 305-318.
- Liu, C.M., Ma, J.Q. ve Sun, Y.Z., 2010. Puerarin protects the rat liver against oxidative stress-mediated DNA damage and apoptosis induced by lead, *Exp Toxicol Pathol.*, 9, xxx.
- Magnusson, M., Sigfusson, N., Sigvalason, H., Johannesson, G.M., Magnusson, S. ve Thorgeirsson, G., 1994. Low Iron-Binding Capacity as a Risk Factor for Myocardial Infarction., *Circulation*, 89, 6, 2947-8.
- Mahan, L. K., 1990. Nutrition and the allergic athlete, *Jpn J Pharmacol.*, 53, 157-64.
- Mărghitas, L.A., Stanciu, O.G., Dezmirean, D., S., Bobiș, O., Popescu, O., Bogdanov, S. ve Campos, M.G., 2009. In vitro antioxidant capacity of honeybee-collected pollen of selected floral origin harvested from Romania., *Food Chem.*, 115, 878–883.
- Masaki, N., Yamada, S., Ogata, I., Ohta, Y. ve Fujiwara, K., 1988. Enhancement of carbon tetrachloride-induced liver injury by glucagon and insulin treatment, *Res. Exp. Med.*, 188, 27-33.
- Matsui, T, Yukiyoishi, A, Doi, S, et al., 2002. Gastrointestinal enzyme production of bioactive peptides from royal jelly protein and their antihypertensive ability in SHR, *J Nutr Biochem.*, 13,80–86.
- McCord, J.M. ve Fridovich, I., 1978. The biology and pathology of oxygen radicals, *Annals of Internal Med.*, 89, 122- 128.
- Medeiros, K.C.P., Figueiredo, C.A.V., Figueredo, T.B., Freire K.R.L., Santosd F.A.R., Alcantara-Neves, N.M., Silvaa, T.M.S. ve Piuvezama, M.R., 2008. Anti-allergic

effect of bee pollen phenolic extract and myricetin in ovalbumin-sensitized mice, Journal of Ethnopharmacology, 119, 41–46.

- Meglia, E.G., Jensen, S.K., Lauridsen, C. ve Waller, P., 2006. α -tocopherol concentration and stereoisomer composition in plasma and milk from dairy cows fed natural or synthetic vitamin E around calving, J. Dairy Res., 73, 227–234.
- Mehmetçik, G., Özdemirler, G., Toker, N.K., Çevikbaş, U. ve Uysal, M., 2008. Effect of pretreatment with artichoke extract on carbon tetrachloride-induced liver injury and oxidative stress, Exp Toxicol Pathol., 60, 475–480
- Mehta, A., Mason, P.J. ve Vulliamy, T.J., 2000. Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency, Baillieres Best Pract Res Clin Haematol, 13, 21-38.
- Memisogullari, R., Taysi, S., Bakan, E. ve Capoglu, I., 2003. Antioxidant Status and Lipid Peroxidation in Type II Diabetes Mellitus, Cell Biochem Func., 21, 291-296,
- Memişoğulları, R., 2005. Diyabette Serbest Radikallerin Rolü ve Antioksidanların Etkisi, Düzce Tıp Fakültesi Dergisi, 3, 30-39.
- Merken, H.M. ve Beecher, G.R., 2000. Measurement of Food Flavonoids by High-Performance Liquid Chromatography: A Review, J. Agric. Food Chem., 48, 3, 577–599.
- Michiels, C., Raes, M., Toussaint, O. ve Remacle, J., 1994. Importance of S-glutathione peroxidase, catalase, Cu-Zn superoxide dismutase for cell survival against oxidative stress, Free Radic. Biol. Med., 17, 235-248.
- Mihara, M. ve Uchiyama, M., 1978. Determination of malondialdehyde precursor in tissues by thiobarbituric acid test, Ann Biochem., 86, 271- 278.
- Mikhail, T.H., Awadallah, R. ve El-Dessoukey, E.A., 1978. Effect of AMP on serum minerals in carbontetrachloride hepatotoxicity, Z Ernährungswiss, 17, 47-51.
- Molan, P.C., 1997. Honey as an Antimicrobial Agent. International Conference on Bee Product: Properties, Applications and Apitherapy, p:27,Israel.
- 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 Chem Toxicol., 46, 3482-3485.
- Nadkarni, G.D. ve Souza, N.B., 1988. Hepatic antioxidant enzymes and lipid peroxidation in carbon tetrachloride-induced liver cirrhosis in rats, Biochem Med and Met Biol, 40, 42-5.
- Nagai, T., Sakai, M., Inoue, R. ve Suzuki, N., 2001. Antioxidative activities of some commercially honeys, royal jelly, and propolis, Food Chem., 75, 237-240.

- Naidu, K.A., 2003. Vitamin C in human health and disease is stil a mystery? An overview, Nutr J., 2:7.
- Nasuti, C., Gabbianelli, R., Falcioni, G. ve Cantalamessa, F., 2006. Antioxidative and gastroprotective activities of anti-inflammatory formulations derived from chestnut honey in rats, Nutr Res., 26, 130– 137.
- Necas, J., Bartosíková, L., Benes, L., Janostíková, E., Bartosík, T., Klusáková, J., Florian, T., Frydrych, M. ve Jurica, J., 2005. Biomed. Pap. Med. Fac. Univ. Palacky Olomouc Czech Repub., 149, 2, 385-388.
- Nenadis, N., Wang, L.F., Tsimidou, M. ve Zhang, H.Y., 2004. Estimation of scavenging activity of phenolic compounds using the ABTS^{•+} assay, J Agr Food Chem., 52, 4669–4674.
- Oeser, A., Tolbert, N.E. ve Schnarrenberger, C., 1973. Two isoenzymes each of G-6PD and 6-PGD in spinach leaves, Arch Biochem Biophys., 154, 438-48.
- Ogeturk, M., Kus, I., Pekmez, H., et al., 2008. Inhibition of carbon tetrachloride-mediated apoptosis and oxidative stress by melatonin in experimental liver fibrosis, Toxicol Ind Health 24, 201-208.
- Ohkawa, H., Ohishi, N. ve Yagi, K., 1979. Assay for lipid peroxides in animal tissue by thiobarbituric acid reaction, Anl. Biochem., 95, 351-358.
- Orhan, F., Sekerel, B., E., Kocabas, C., N., Sackesen, C., Adalioğlu, G. ve Tuncer, A., 2003. An Aller, Asthm. Immun., 90, 611–615.
- Orzáez, Villanueva, M. T., Díaz Marquina, A., Bravo Serrano, R. ve Blazquez Abellán, G., 2002. The importance of bee-collected pollen in the diet: a study of its composition. Int J Food Sci Nutr., 53, 217-224.
- Ouchemoukh, S., Louaileche, H. ve Schweitzer, P., 2007. Physicochemical characteristics and pollen spectrum of some Algerian honeys, Food Control, 18, 52–58.
- Ögetürk, M., Çolakoğlu, N., Kuş, M. A., Kuş, İ. 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.
- Ötles, S., 1995. Bal ve bal teknolojisi (Kimyası ve Analizleri). Alaşehir Meslek Yüksek Okulu Yayınları No:2, İzmir, 89s.
- Özcan, M., Ceylan, A., Ünver, A. ve Yetişir, R., 2003. Antifungal Effect of Pollen and Propolis Extracts Collected from Different Regions of Turkey, Uludağ Arıcılık Dergisi, 3, 33-36.
- Özdamar, K., 1999. Paket Programlar İle İstatistiksel Veri Analizi, Kaan Kitabevi, Eskişehir.

- Öztürk, N., Tuncel, M. ve Tuncel, N.B., 2007. Determination of phenolic acids by a modified HPLC: Its application to various plant materials, J Liq Chromatogr Relat Techno., 30, 587–596.
- Parola, M., Rubio, M., Varela, G., et al., 1996. Effects of S-adenosylmethionine on lipid peroxidation and liver fibrogenesis in carbon tetrachloride-induced cirrhosis, J Hepatol, 25, 2000- 2005.
- Pernal, S. F. ve Currie, R. W., 2001. The influence of pollen quality on foraging behavior in honeybees (*Apis mellifera* L.), Behavioral Ecology and Sociobiology., 51, 53-68.
- Persano Oddo, L. ve Piro, R., 2004. Main European unifloral honeys: descriptive sheets, Apidologie, 35, 38-81.
- Pirone, B. N., Ochoa, R.M., Kessler, G.A. ve Michelis, A.D., 2007. Chemical characterization and evolution of ascorbic acid concentration during dehydration of Rosehip (*Rosa eglanteria*) fruits, Amer J Food Techn., 2, 377-387.
- Polyakov, N. E., Leshina, T.V., Konovalova, T. A. ve Kispert, L. D., 2001. Carotenoids as Scavengers of Free Radicals in a Fenton Reaction, Antioxidants, Pro-Oxidants, Free Radical Biol Med, 31, 398-404
- Pozo-Bayón, M.A., Pueyo, E., Martin-Alvarez, P.J. ve Polo, M.C., 2001. Polymethylsiloxane solid-phase microextraction-gas chromatography method for the analysis of volatile compounds in wines: its application to the characterization of varietal wines, J. Chrom. A, 922, 267-275.
- Ray, B. ve Daeschel M. 1992. Food biopreservatives of microbial origin. In: Bacteriocins of Starter Culture Bacteria as Food Biopreservatives:An Overview. CRC Press, Boca Raton, FL, 177-205.
- Recknagel, R., Glende, E.A., Dolak, J.A. ve Waller, R.L., 1989. Mechanisms of carbon tetrachloride toxicity, Pharma Ther, 43, 139-154.
- Rice-Evans, C.A., Miller, N.J. ve Paganga, G., 1997. Antioxidant Properties of Phenolic Compounds, Trends Plant Sci., 2,4, 152-159.
- Rice-Evans, C.A., Miller, N.J. ve Paganga, G., 1996. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. Free Radical Biology and Medicine, 20, 933–956.
- Robards, K., Prenzler, P.D., Tucker, G., Swatsitang, P. ve Glover, W., 1999. Phenolic compounds and their role in oxidative processes in fruits, Food Chem., 66, 401–436.
- Russell, J. M., Stephen, T. L., Dale, R. G., Kip, E. P. ve Lynn, F. J., 2007. Phytochemicals: The Good, the Bad and the Ugly, Phytochemistry, 68, 2973-2985.

- Russo, A., Cardile, V., Sanchez, F., Toroncoso, N., Vanella, A. ve Garbarino, J.A., 2004. Chilean Propolis: Antioxidant Activity and Antiproliferative Action in Human Tumor Cell Lines, Life Sci., 76, 5, 545-558.
- Samur, G., 2006. Vitaminler Mineraller ve Sağlığımız, Sinem Matbaacılık, 1.basım, Ankara, 1-2.
- Sarıkaya, A. O., Ulusoy, E., Öztürk, N., Tuncel, M., Kolayli, S., 2009. Antioxidant activity and phenolic acid content of chestnut honey and propolis, J Food Biochem, 33, 471-481.
- Sarıkaya, A.O., Ulusoy, E., Kolaylı, Tunçel, M., 2007. İki Farklı Yöntemle Toplanan Kestane Propolislerinin HPLC İle Fenolik Asitlerinin Tayini Ve Antioksidan Aktivitelerinin Karşılaştırılması, 21. Ulusal Kimya Kongresi.
- Šarić, A. Balog, T., Soboc̃anec, S., Kušić, B., Šverko, V., Rusak, G., Likic, S., Bubalo, D., Pinto, B., Reali, D. ve Marotti, T., 2009. Antioxidant effects of flavonoid from Croatian *Cystus incanus* L. rich bee pollen. Food Chem Toxicol., 47, 547–554.
- Scalbert, A., 1991. Antimicrobial properties of tannin, Phytochemistry, 30, 3875–3883.
- Schmidt, J. O., 1997. Bee product: Chemical composition and application. International Conference on Bee product Properties, Applications and Apitherapy. p 15-26. Israel.
- Schmidt, J.O. ve Buchmann, S.L., 1992. Other products of the hive. In: The hive and the honeybee J.M. Graham, ed. Dadant & Sons, Hamilton, Illinois, USA., 927-988.
- Schumann, J., Prockl, 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.
- Scott, W.A., 1975. Glucose-6-phosphate dehydrogenase from *Neurospora crassa*, Methods Enzymol, 41, 177-82.
- Seven A. ve Candan G., 1996. Antioksidan Savunma Sistemleri, Cerrahpaşa J. Med., 27, 41-50.
- Shahidi, F. ve Naczk, M., 1995. Food Phenolics: Sources, Chemistry, Effects and Applications. Technomic Pub. Co., Basel, Switzerland.
- Sherlock, S. ve Dooley, J., 1987. Diseases of the Liver and Biliary System, Hepatic Cirrhosis, 9th Ed, Blackwell Scientific Publications, 371- 384, London.
- Sherlock, S. ve Dooley J., 1997. Anatomy and Function, In “Diseases of the Liver and Biliary System”. Ed. Sherlock S. And Dooley J., 10th Ed., 8-16, Oxford Blackwell Science Ltd., Oxford.
- Shimizu, I., 2001. Antifibrogenic therapies in Chronic HCV infection. Current Drug Targets, Infectious Disorders, 1, 227-240.

- Shimizu, I., 2003. Impact of estrogens on the progression of liver disease., Liver Int., 23, 63-69.
- Shimoda, M., Nakajin, S., Oikawa, T., et al., 1978. Biochemical studies on vasodilative factor in royal jelly, Yakugaku Zasshi, 98, 139–145.
- Sies, H., 1991. Oxidative Stres, From Basic Research to Clinical Application, Amer J Medic, 91, 3, 31-37.
- Silva, T.M.S., Camara, C.A., Silva Lins A.C., Barbosa-Filho, J.M., Eva Silva, M.S., Freitas, B.M. ve Santos, R.F.A., 2006. Chemical composition and free radical scavenging activity of pollen loads from stingless bee *Melipona subnitida* Ducke, J Food Compos Anal, 19, 507-511.
- Singh, U. ve Jialal, I., 2004. Anti-inflammatory effects of alpha-tocopherol, Ann N Y Acad Sci., 1031,195-203.
- Singleton, V.L. ve Rossi, J.A., 1965. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents, Amer J Enol Viticult., 16, 144-158.
- Sinnet, D., Krajcinovic, M. ve Labuda, D., 2000. Genetic Susceptibility to Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia, Leuk Lym, 38, 447-462.
- Sipes, I.G., Mcquuen Ganddfi, A.J. ve Bond, J.A., 1997. Comprehensive Toxicology, 13-Volume Set: General Principles.
- Slater, T.F., 1982. Free radicals as reactive intermediates in injury. In: R Snyder, DV Parke, JJ Kocsis, DJ Jollow, GG Gebson, CM Witmer (Eds). *Biological Reactive Intermediates II: Chemical Mechanisms and Biological Effects*. New York, Plenum Press, 575-589. New York.
- Slater, T.F.,1984. Free radical mechanisms in tissue injury, Biochem-J, 222, 1-15.
- Smirnoff, N., 1996. The function and metabolism of ascorbic acid in plants, Ann. Bot-London, 78, 661-669.
- Snowdon, J. A. ve Clier, D.O., 1996. Microorganisms in honey, Int. J Food Microbiology, 31, 1-26.
- Sorrells, K.M., Enigl, D.C. ve Hatfield, J.R., 1989. The effect of pH, acidulant, time and temperature on the growth and survival of *Listeria monocytogenes*, J. Food Prot., 52, 571-573.
- Sözmen, E.Y., 2002. Yaşlanma biyokimyası, In: Onat T, Emerk K, Sözmen EY, İnsan Biyokimyası, Palme Yayıncılık, Ankara.
- Spletstoesser, W. D. ve Werner, S.P., 2002. Oxidative stress in phagocytes ‘The Enemy Within’, Microsc Res Technique, 57, 441-455.

- Stanley, R. G. ve Linskens, H. F., 1985. Pollen Biologie, Biochemie Gewinnung und Verwendung, Urs Freund Verlag Greifenberg-Ammersee, 344.
- Steinberg, F.M. ve Chait, A., 1998. Antioxidant vitamin supplementation and lipid peroxidation in smokers, Am J Clin Nutr., 68, 319-327.
- Stolc, S., Bauer, V., Benes, L., Tichy, M., 1983. Medicine with antiarrhythmic, antihypoxic activity and its method of preparation, Patents: CS 229 067, SWED. 8204693-9, BELG. 894148, SWISS 651 754, BRD P-3231088, SPAIN 553017, JAP. 151 4040.
- Sullivan, J.L., 1989, The iron paradigm of ischemic heart disease, Am Heart J, 117, 1177-88.
- Sun., Y., Oberley, L. W. ve Ying., L., 1998. A simple Method for clinical of Superoxide Dismutase. Clin. Chem., 34/3, 497-500.
- Suschetet, M., 1975. Influence of tannic acid on the hepatic content of vitamin A in rats fed a vitamin A containing diet or a vitamin A deficient diet, C. R. Seances Soc. Biol. Fil., 169, 970.
- Şahinler, N., 2000. Arı Ürünleri ve İnsan Sağlığı Açısından Önemi , MKÜ Ziraat Fakültesi Dergisi, 5, 139-148, 2000.
- Şimşek, F., 1999. Serbest Oksijen Radikalleri, Antioksidanlar Velipit Peroksidasyonu, Türkiye Klinikleri, J. Pediatr., 8, 42-47.
- Talpay, B., 1985. Spezifikationen für Trachthonige, Dtsch. Lebensmittel Rundschau, 81, 148-152.
- Tamura, T., Fujii, A. ve Kumoyama, N., 1987. Antitumor effect of royal jelly, Folia Pharmacol, 89, 73-80.
- Tandoğan, B. ve Ulusu, N.N., 2005. Glukoz-6-fosfat dehidrogenaz: moleküler özellikleri ve klinik önemi, Hacettepe Tıp Dergisi, 36, 13-18.
- Tanker, M., Çitoğlu, G. ve Soner, O., 1996. Rosa meyvelerinde pektin içeriği. Kuşburnu Sempozyumu Bildiriler Kitabı, Ekspres Ofset, 297-299, Gümüşhane.
- Tapiero, H., Tew, K. D., Ba, N. ve Mathe', G., 2002. Polyphenols: Do they play a role in the preventioan of Human pathogies? Biomed and Pharmacotherapy, 56, 200- 207.
- Tatlıdil, H., 1996. Uygulamalı Çok Değişkenli İstatistiksel Analiz, Akademi, Ankara.
- Thrall, K.D., Vucelick, M.E., Gies, R.A., et al., 2000. Comparative metabolism of carbon tetrachloride in rats, mice, and hamsters using gas uptake and PBPK modeling, J Toxicol Environ Health A, 60, 531-548.
- TSE, 1989a. Polen. Türk Standartları Enstitüsü. Ankara.

- TSE Arı sütü, 1989b. Arı Sütü. Türk Standartları Enstitüsü. Ankara.
- TSE Arı zehiri, 1989c. Arı Zehiri Tasarisi. Türk Standartları Enstitüsü. Ankara.
- Tunçok, Y., 2003. Toksikoloji Tanımı Ve Tarihçesi, *Farmakoloji Özel Dergisi*, 1, 1.
- Uchida, K., 2000. Role of reactive aldehyde in cardiovascular diseases, *Free Radical Biol Med.*, 28, 1685-1696.
- Uchida, K., 2003. 4-Hydroxy-2-Nonenal: A product and mediator of oxidative stress, *Progr. Lip. Res.*, 569, 1-26.
- Ulusoy, E., Sarıkaya, A. O. ve Kolaylı, S., 2007. Kestane Ballarının Hplc İle Fenolik Asitlerinin Tayini ve Antioksidan Aktiviteleri, 21. Ulusal Kimya Kongresi.
- Ulus, N.N., Sahilli, M., Avcı, A., Canbolat, O., Ozansoy, G., Arı, N., Balı M., Stefek, M., Stolc, S., Gajdosik, A. ve Karasu, C., 2003. Pentose phosphate pathway, glutathione-dependent enzymes and antioxidant defense during oxidative stress in diabetic rodent brain and peripheral organs: effects of stobadine and vitamin E, *Neurochem. Res.*, Jun, 28, 815-823.
- URL-1.. http://www.genetikbilimi.com/gen/serbest_radikaller.htm, Erişim:Mayıs, 2011.
- URL-2: <http://www.vcbio.science.ru.nl/en/virtuallessons/pollenmorphology/>, Erişim:Mayıs, 2011.
- URL-3. http://www.alergen.info.pl/alergen/atlas-roslin/c/castanea_sativa.html Erişim:Mayıs, 2011.
- Üstündağ, B., Bahçecioğlu, İH., Şahin, K., Gülcü, F., Düzgün, S., Özeran, İH. ve Gürsu, MF., 2005. *F.Ü. Sağlık Bil. Dergisi*, 19, 263-271.
- Valencia-Barrera, R.M., Herrero, B. ve Molnar, T., 2000. Pollen and organoleptic analysis of honeys in Leon province (Spain), *Grana*, 39, 133- 140.
- Van Haaften, R.I., Evelo, C.T., Penders, J., Eijnwachter, M.P., Haenen, G.R. ve Bast, A., 2001. Inhibition of human glutathione S-transferase P1-1 by tocopherols and alpha-tocopherol derivatives, *Biochim Biophys Acta.*, 1548, 23-28.
- Van Ye, T.M., Roza, A.M., Pieper, G.M., Henderson, J. Jr., Johnson, J.P. ve Adams, M. B., 1993. Inhibition of intestinal lipid peroxidation does not minimize morphological damage, *J. Surg. Res.*, 55, 553-558.
- Vas, G.Y., Koteleky, K., Farkas, M., Dobo, A., ve Vékey, K., 1998. Fast screening method for wine headspace compounds using solid-phase microextraction (SPME) and capillary GC technique, *Am. J. Enol. Vitic.*, 49, 100-104.

- Vaya, J., Belinky, P.A. ve Aviram, M., 1997. Antioxidant constituents from licorice roots: Isolation, structure elucidation and antioxidative capacity toward LDL oxidation, Free Radical Bio. Med., 23, 302-313.
- Viliers, A., Lynen, F., Crouch ve Sandra, P., 2004. Development of a Solid-Phase Extraction Procedure for the Simultaneous Determination of Polyphenols, Organic Acids and Sugar in Wine, Chromatographia., 59, 403-409.
- Vincent, A.M., Russell, J.W., Low, P. ve Feldman, E.L., 2004. Oxidative Stress in the Pathogenesis of Diabetic Neuropathy, Endocrine Rev., 25, 612-628.
- Vural, N., 1984. Toksikoloji, Ankara Üniv. Eczacılık Fak. Yay., No: 56, Ankara.
- Wang, H., Wei, W., Wang, N.P., et al., 2005. Melatonin ameliorates carbontetrachloride-induced hepatic fibrogenesis in rats via inhibition of oxidative stres, Life Sci., 77, 1902-1915.
- Weber, L.W., Boll M. ve Stampfl, A., 2003. Hepatotoxicity and mechanism of action of haloalkanes: carbon tetrachloride as a toxicological model, Crit Rev Toxicol, 33, 105-136.
- Whalen, R. ve Boyer, T.D., 1998. Human Glutathione S-Transferases. Sem Liver Dis, 18,4.
- White, J. W., 1979. A Comprehensive survey, Heinemann, London, 157-158.
- Williams, M. H., 1994. The use of nutritional ergogenic aids in sports: Is it an ethical issue?, Int J Sport Nutr., 4, 120- 131.
- 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.
- Wood, T., 1986. Distribution of the pentose phosphate pathway in living organisms, Cell Biochem Funct, 4, 235-40.
- Wrolstad, R.E., Durst, R. ve Lee, W., 2005. Tracking color and pigment changes in anthocyanin products, J. Trends in Food Sci.Tech., 16,423.
- Wu, D. ve Cederbaum, A.I., 2003. Alcohol, oksidative stres and free radical damage, Alcohol Res Health, 27, 277-284.
- Yagi, K., 1994. Lipid peroxides and related radicals in clinical medicine, In Free Radicals in Diagnostic Medicine, 1st edition, Plenum Press, New York.
- Yalçın, A.S., 1998. Antioksidanlar, Klinik Gelişim, 11, 342-6.
- Yalın, S., Yalın, E. ve Aksoy, K., 2002. Türkiye’de saptanan glukoz- 6-fosfat dehidrogenaz varyantları, 11, 1-14.

- Yao, T, Esposti, S.D. ve Huang, L., 1994. Inhibition of carbon tetrachloride-induced liver injury by liposomes containing vitamin E, Am J Physiol, 267, 476-484.
- Yatsunami, K., Echigo, T., 1985. Antibacterial action of royal jelly, Bull Fac Agr., 25, 13–22.
- Yetim, H. ve Kesmen, Z., 2008. Gıda Analizleri, Erciyes Üniv. Ders Yayınları, Yay.no:163, Kayseri.
- Yıldız, Ş.M., Arıyürek, S.Y. ve Aksoy, K., 2010. Glukoz-6-Fosfat Dehidrogenaz Genindeki Akdeniz Mutasyonunun Mikroarray Tekniğiyle Saptanması, Turk J Biochem, 35, 1, 63–66.
- Young, I.S. ve Woodside, J.V., 2001. Antioxidants in health and disease, J Clin Pathol, 54, 176-186.
- Yüksel, İ., 2002. Sürücü Davranışlarının Stres Oluşturucu Değişkenlere Bağlı Olarak Öngörülmesi, Erciyes Üniversitesi İktisadi ve İdari Bilimler Fakültesi Dergisi, 19, 173-182.
- Yüksek, N., Altuğ, N., Ağaoğlu, Z. T., Karasu, A., 2005. Köpeklerde Karbontetraklorür İntoksikasyonunda Serum ve Karaciğer Dokusu Mineral Madde Düzeylerinin Araştırılması, YYÜ Vet Fak Derg. 16, 43-46.
- Zaheer, N., Tewari, K.K. ve Krishan, P.S., 1967. Mitochondrial forms of glucose-6-phosphate dehydrogenase and 6-phosphogluconic acid dehydrogenase in rat liver, Arch Biochem Biophys, 120, 22-34.
- Zimmerman, H. J. ve Maddrey, W.C., 1987. Toxic and Drug-Induced Hepatitis, In “Diseases of the Liver”. Ed. L. Schiff and E.R. Schiff, &th Ed., 591-668, J. B. Lippincott, Philadelphia.

ÖZGEÇMİŞ

10/09/1981 yılında Gümüşhane, Torul'da doğdu. İlk ve orta öğrenimini Şiran'da tamamladı. 2002 yılında İnönü Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Gıda Mühendisliği bölümünden lisans, 2005 yılında yüksek lisans derecesi aldı. Ocak 2007'de K. T. Ü Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim dalında doktora programına başladı. Özel sektörde çeşitli gıda fabrikalarında (Gümüşsu A.Ş.; Kral Pestil-Köme; Büyükbayraktar Ltd. Şti.) mühendislik, yöneticilik ve danışmanlık yaptı. Dünya Bankası, Tarım Bakanlığı, A.B., DPT, Kalkınma Ajansları, SODES, BAP gibi programlar kapsamında araştırma, fabrika kurulumları, proses tasarımları, ürün geliştirme, eğitim ve sosyal içerikli projeler yaptı. SCI ve diğer indekslere kayıtlı yayınları vardır. Belli dönemlerde Kalkınma Ajansları ve Avrupa Birliği Eğitim ve Gençlik Programları Merkezi Başkanlığında bağımsız dış uzman ve değerlendirici olarak görev almaktadır. 2005 yılından bu yana Cumhuriyet Üniversitesi, Şebinkarahisar Meslek Yüksekokulu, Giresun Üniversitesi, Şebinkarahisar Meslek Yüksekokulunda görev yaptı. Halen Karadeniz Teknik Üniversitesi Maçka Meslek Yüksekokulunda öğretim görevlisi olarak görev yapmaktadır. Evli ve bir kız çocuk babası olup İngilizce bilmektedir.