



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

**ARI SÜTÜ EKSTRAKTININ t-BHP İLE
UYARILMIŞ OKSİDATİF HASARA KARŞI
KORUYUCU ETKİLERİNİN İNCELENMESİ**

Ali ASGHARI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Prof. Dr. Orhan DEĞER

TRABZON – 2018

ONAY

Bu Tez Yüksek Lisans Tezi Standartlarına Uygun Bulunmuştur.

Prof. Dr. Süleyman Caner KARAHAN

Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Başkanı



Karadeniz Teknik Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Yüksek Lisans öğrencisi Ali ASGHARI'nın hazırladığı "Arı Sütü Ekstraktlarının t-BHP ile Uyarılmış Oksidatif Hasara Karşı Koruyucu Etkilerinin İncelenmesi" başlıklı tez KTÜ Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca kapsam ve bilimsel kalite yönünden değerlendirilerek Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

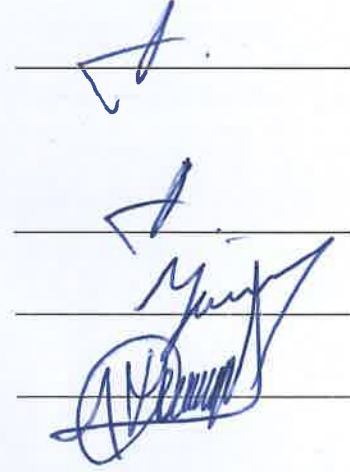
Danışman Prof. Dr. Orhan DEĞER

Yüksek Lisans Sınavı Jüri Üyeleri

Prof. Dr. Orhan DEĞER

Prof. Dr. Yüksel ALİYAZICIOĞLU

Doç. Dr. Hüseyin Avni UYDU



Tarih: 06/07/2018

Bu tez KTÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun/....../.... tarih ve sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Prof. Dr. Ersan KALAY

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdür V.

BEYAN

Bu tez çalışmasının KTÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü tez yazım kılavuzu standartlarına uygun olarak yazıldığını, tezin akademik ve etik kurallara bağlı kalınarak gerçekleştirilmiş özgün bir bilimsel araştırma eserim olduğunu, tezde yer alan ve bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen tüm bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi, kaynakların kaynaklar listesinde yer aldığını, tezin çalışılması ve yazımı aşamalarında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

06.07.2018

Ali ASGHARI

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim süresinde bilimsel, akademik ve insani yönden daima örnek aldığım, tez çalışmamın gerçekleymesinde bilgi ve tecrübeleriyle her zaman yardımcı olan danışman hocam sayın Prof. Dr. Orhan DEĞER'e,

Yüksek lisans eğitim hayatı boyunca gelişimimde çok büyük katkı ve emekleri olan değerli hocalarım; Prof. Dr. E. Edip KEHA, Prof. Dr. Asım ÖREM, Prof. Dr. Ahmet ALVER, Prof. Dr. Birgül VANIZOR KURAL, Doç. Dr. Ahmet MENTEŞE ve Dr. Öğr. Üyesi Fulya BALABAN YÜCESAN'a

Bilgi ve tecrübelerinden her zaman faydalandığım K.T.Ü. Sağlık Bilimleri Fakültesi Beslenme ve Diyetetik Bölümü Öğretim Üyesi Doç. Dr. Selim DEMİR'e

Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı'nda Arş. Gör Kübra AKBULUT ÇAKIROĞLU, Dr. Tuğba Nigar ÇAKIROĞLU, Arş. Gör Ertuğrul YIGIT, Dr. Akın BODUR, Arş. Gör. Serap ÖZER YAMAN, Doktora Öğrencisi Katip KORKMAZ, Yüksek Lisans Öğrencisi Pınar AYGÜN, Arş. Gör. Dr. Mehmet Akif BİLİCİ, olmak üzeri tüm lisansüstü öğrenci arkadaşlarıma, Bu günlere gelmemde hiçbir zaman desteğini esirgemeyen başta ailem olmak üzeri tüm sevdiklerime sonsuz teşekkür ederim.

Ali ASGHARI

Trabzon, 2018

İÇİNDEKİLER DİZİNİ

Sayfa

ONAY

BEYAN

TEŞEKKÜR

TABLolar DİZİNİ

vi

ŞEKİLLER DİZİNİ

vii

KISALTMALAR, SİMGELER ve FORMÜLLER DİZİNİ

viii

1. ÖZET

1

2. SUMMARY

2

3. GİRİŞ ve AMAÇ

3

4. GENEL BİLGİLER

6

4.1. Arı Sütü

6

4.1.1. Arı Sütünün Fiziksel Özellikleri

6

4.1.2. Arı Sütünün Kimyasal Özellikleri ve İçeriği

6

4.1.3. Arı Sütünün Biyolojik Özellikleri

7

4.1.4. Arı Sütün Etkileri

8

4.1.4.1. Antioksidan Etki

8

4.1.4.2. Nörotropik Etki

8

4.1.4.3. İnsülin Benzeri Etkisi

8

4.1.4.4. Arı Sütü ile İlgili İnsanlar Üzerinde Yapılan Çalışmalar

8

4.2. Serbest Radikaller

9

4.2.1. Serbest Radikallerin Oluşumu

9

4.2.2. Serbest Radikal Türleri

11

4.2.2.1. Süperoksit Radikalleri ($O_2^{\cdot-}$)

11

4.2.2.2. Hidroksil Radikali ($OH^{\cdot}$)

11

4.2.2.3. Hidrojen Peroksit (H_2O_2)

11

4.2.2.4. Tersiyer Bütil Hidroperoksit (t-BHP)

12

4.2.3. Serbest Radikallerin Etkileri

12

4.3. Oksidatif Stres

13

4.3.1. Antioksidan Etki Mekanizmaları

13

4.3.1.1 Süpürücü (Scavenging) Etki

13

4.3.1.2 Bastırıcı (Quencher) Etki	13
4.3.1.3 Onarcı (Repair) Etki	13
4.3.2.2 Katalaz (CAT)	14
4.3.2.3. Glutasyon Peroksidaz (GSH-Px)	14
5. GEREÇ ve YÖNTEM	15
5.1. Gereç	15
5.1.1. Kullanılan Cihazlar, Alet ve Malzemeler	15
5.1.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Çözeltiler	15
5.2. Yöntem	16
5.2.1. Arı Sütü Ekstraktının Hazırlanması	16
5.2.2. Eritrosit Hücre İzolasyonu	17
5.2.3. Tersiyer Bütil Hidroperoksit (t-BHP) Hazırlanması	17
5.2.4. Kuersetin Hazırlanması	17
5.2.5. Deneyde Kullanılacak t-BHP Konsantrasyonunun Belirlenmesi	18
5.2.6. Deneyde Kullanılacak Arı Sütü Konsantrasyonunun Belirlenmesi	18
5.2.7. Deneyde Kullanılacak Kuersetin Konsantrasyonunun Belirlenmesi	18
5.2.8. Deney Grupları	18
5.2.9. Eritrosit Süperoksit Dismutaz (SOD) Aktivitesi Tayini	19
5.2.10. Eritrosit Katalaz (CAT) Aktivitesi Tayini	22
5.2.11. Eritrosit MDA Seviyesinin Belirlenmesi	23
5.2.12. Eritrosit TOK Seviyesinin Belirlenmesi	25
5.2.13. Eritrosit TAK Seviyesinin Belirlenmesi	25
5.3. İstatiksel Analizler	25
6. BULGULAR	27
6.1. Eritrosit Toplam Oksidan Kapasite (TOK) Seviyesi	27
6.2. Eritrosit Toplam Antioksidan Kapasite (TAK) Seviyesi	27
6.3. Eritrosit MDA Seviyeleri	28
6.4. Eritrosit Süperoksit Dismutaz (SOD) Aktivitesi	29
6.5. Eritrosit Katalaz (CAT) Aktivitesi	31
7. TARTIŞMA ve SONUÇ	32
8. KAYNAKLAR	35
9. EKLER	41

9.1. Ek 1. Deneyde Kullanılacak t-BHP Konsantrasyonunun Belirlenmesi	41
9.2. Ek 2. Deneyde kullanılacak Arı Sütün Konsantrasyonunun Belirlenmesi	42
9.3. Ek 3. Gönüllü Onam Formu	43
10. ETİK KURUL ONAYI	44
11. ÖZGEÇMİŞ	45



TABLolar DİZİNİ

	Sayfa
Tablo 1. Arı sütünün bileşimi	7
Tablo 2. Biyolojik öneme sahip olan reaktif oksijen türleri	10
Tablo 3. Çalışmada kullanılan cihazlar, laboratuvar gereçleri ve malzemeler	15
Tablo 4. Çalışmada kullanılan kimyasal maddeler ve çözeltiler	16
Tablo 5. Deney grupları	19
Tablo 6. SOD aktivitesi ölçümü	20
Tablo 7. CAT aktivitesi ölçümü ve yapılan işlemler	23
Tablo 8. Eritrosit MDA ölçümü ve yapılan işlemler	24
Tablo 9. Eritrosit TOK seviyeleri	27
Tablo 10. Eritrosit TAK seviyeleri	28
Tablo 11. Eritrosit MDA seviyeleri	29
Tablo 12. Eritrosit SOD aktiviteleri	30
Tablo 13. Eritrosit CAT aktiviteleri	31

ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa
Şekil 1. Arı sütü	6
Şekil 2. t-BHP'nin açık kimyasal formülü	12
Şekil 3. Standart SOD aktivitesi ve % inhibisyon grafiği	21
Şekil 4. Log standart SOD aktivitesi ve % inhibisyon grafiği	22
Şekil 5. MDA standart absorbans grafiği	25
Şekil 6. Eritrosit TOK seviyeleri	27
Şekil 7. Eritrosit TAK seviyeleri	28
Şekil 8. Eritrosit MDA sonuçları	29
Şekil 9. Eritrosit SOD aktivitesi	30
Şekil 10. Eritrosit CAT seviyeleri	31

KISALTMALAR, SİMGELER ve FORMÜLLER DİZİNİ**Kısaltmalar**

ATP	Adenozintrifosfat
ABTS	2, 2'-Azino-Bis-3-Etilbenzotilazolin-6-Sülfonik asit
BCL-2	B Cell Lenfoma-2
CAT	Katalaz
DMSO	Dimetil Sülfoksit
DNA	Deoksiribo Nükleik Asit
EDTA	Etilendiamin Tetraasetik Asit
ETS	Elektron Transport Zinciri
GPx	Glutasyon Peroksidaz
GR	Glutasyon Redüktaz
GSH	Glutasyon
Hb	Hemoglobin
Hct	Hematokrit
MDA	Malondialdehit
NBT	Nitroblue Tetrazolium
PBS	Fosfat Tamponlu Tuz Çözeltisi
PC-3	Prostat Kanseri Hücre Serisi
RNA	Ribo Nükleik Asit
RNS	Reaktif Azot Türleri
ROS	Reaktif Oksijen Türleri
SOD	Süperoksit Dismutaz
TAK	Toplam Antioksidan Kapasite
TBA	Tiyobarbitürik Asit
t-BHP	Tersiyer Bütil Hidroperoksit
TCA	Trikloroasetik Asit
TOK	Toplam Oksidan Kapasite
XO	Ksantin Oksidaz

Simgeler

A	Alfa
μ	Mikro
g	RCF (Rölatif Santrifüj Güç)

Formüller

CuCl₂	Bakır (II) Klorür
COOH	Karboksil Grubu
H₂O₂	Hidrojen Peroksit
KH₂PO₄	Potasyum Dihidrojen Fosfat
Na₂CO₃	Sodyum Karbonat
Na₂HPO₄	Disodyum Hidrojen Fosfat
NaHCO₃	Sodyum Bikarbonat
NaOH	Sodyum Hidroksit

1. ÖZET

Arı Sütü Ekstraktının t-BHP ile Uyarılmış Oksidatif Hasara Karşı Koruyucu Etkilerinin İncelenmesi

Arı sütü bal arıları tarafından değişik bitkilerden toplanarak üretilen yapışkan reçinemsi bir maddedir. Arı sütünün etkisi arıların bitkilerden topladığı antioksidan etkili bileşenlerine bağlıdır. Fenolik bileşikler antioksidan özellikler göstermektedir. Polifenoller indirgeyici ajan olma, metal şelatlama ve serbest radikal süpürücü özellik gösterir. Araştırmacıların son çalışmalarına göre eritrosit membranlarının dış yüzeyinde bulunan proteinler serbest radikaller için kolay hedeftirler. Bu çalışmadaki amacımız hasarlı eritrosit hücre modellerini kullanarak arı sütü ekstraktının koruyucu etkisini araştırmaktır. Bu çalışmada kolay elde edilebilmesi ve akut oksidatif hasar çalışmalarında sıklıkla kullanılan bir model olmasından dolayı eritrosit hücreleri seçildi. Organik bir hidroperoksit olan t-BHP, oksidatif hücre hasarı mekanizmalarını kapsayan çalışmalarda sıklıkla kullanılan bir bileşiktir. Sağlıklı bireylerden etik kurul onayı ile alınan kanlardan eritrosit hücreleri izole edildi. Elde edilen eritrosit paketi kontrol, arı sütü ekstraktı, pozitif kontrol (kuersetin) ve negatif kontrol (t-BHP) olarak dört gruba ayrıldı. Eritrosit paketlerine öncelikle ekstrakt muamelesi ve ardından t-BHP muamelesi uygulandı. Daha sonra negatif kontrolde oluşacak hasara karşı arı sütünün koruyucu etkilerini görmek için malondialdehit (MDA) düzeyleri ve antioksidan enzim aktiviteleri çalışıldı. Arı sütü grubunda MDA değerleri negatif kontrole göre anlamlı derecede düşük bulundu ($p<0.05$). Sonuç olarak ilk defa arı sütü ekstraktının *in vitro* şartlarda insan eritrosit hücrelerinde t-BHP ile uyarılmış oksidatif hasara karşı koruyucu etkiye sahip olabileceği belirlenmiştir. Bu çalışmanın gelecekte yapılacak *in vitro* ve *in vivo* çalışmalara yardımcı olabileceği düşünülmektedir.

Anahtar Kelimeler: Antioksidan, Arı sütü, Eritrosit, Oksidatif Stres, t-BHP

2. SUMMARY

Investigation of Protective Effect of Royall Jelly Against Oxidative Damage Induced by t-BHP

Royal jelly is an adhesive resinous matter produced by bees picking from various plants. Major parts of royal jelly contain flavonoids, phenolic compounds and essential oils. Phenolic compounds exhibit antioxidant properties. Polyphenols have reductive agent property, metal chelating and free radical scavenging properties. The proteins on the outer surface of the resultant erythrocyte membranes are easy to target by free radicals. It is also an efficient model for the oxidative damage due to the ease of erythrocyte elution and its use as a cell model in studies. The aim of this study is to investigate the protective capacity of royal jelly extract using damaged erythrocyte cell models. Tert-butyl hydroperoxide (t-BHP) is an organic peroxide that causes oxidative damage in human erythrocyte cells. Erythrocyte cells were isolated from blood taken by healthy ethics committee approval. The obtained erythrocyte package was divided into four groups as control, Royal jelly extract, positive control (quercetin) and negative control (t-BHP). Erythrocyte packages were first treated with extract and then with t-BHP treatment. Malondialdehyde (MDA), enzyme activite were evaluated to determine the protective effects of the Royal jelly against the negative control. MDA values were significantly lower in the Royal jelly group than in the negative control group ($p < 0.05$). In this study, we first observed that the Royal jelly extract was protective against oxidative damage caused by *in vitro* conditions in t-BHP-induced erythrocyte cells. It is thought that this work will guide future *in vitro* and *in vivo* experiments. Tertiary butylated hydroperoxide (t-BHP) is a substance used in studies on mechanism of oxidative cell damage. As a result, it has been determined for the first time that aqueous Turkish royal jelly extract may have protective effect against t-BHP induced oxidative damage in human erythrocyte cells *in vitro*. The obtained data is the pioneer of various *in vitro* and *in vivo* studies. It is envisaged that pollen may be used as an alternative food supplement without this work.

Key Words: Antioxidants, Erythrocyte, Oxidative Stress, Royal jelly, t-BHP.

3. GİRİŞ ve AMAÇ

Son yıllarda insan sağlığını artırmada ve hastalıkların oluşumunu önlemede etkili "fonksiyonel gıda" ürünlere karşı tüketicilerin ilgisi giderek artmaktadır. Fonksiyonel gıdalar arasında popüler olan ve diyetle alınan arı ürünlerinin içerdikleri fizyolojik aktif bileşenler nedeniyle hastalıklara karşı etkinliği ile ilgili yapılan araştırmaların sayısı gün geçtikçe artmaktadır (1-3).

Bu fonksiyonel arı ürünleri arasında yaygın olarak kullanılanlardan biri de arı sütüdür. Arı sütü (royal jelly), genç işçi bal arılarının hipofarengal (yutak altı) ve mandibülar (alt çene) bezlerinde yapılan ve salgılanan, arı kovanının özel bir maddesidir. Genç larvaların ve erişkin kraliçe arıların temel gıda kaynağıdır. İşçi arının kraliçe arıya dönüşümünün yegane sorumlusudur. Arı sütünün bileşiminin % 50-60'ı sudur. Kuru ağırlığın yaklaşık % 17-45'ini proteinler, % 18'sini karbohidratlar, % 3-6'sını lipidler ve % 1-2'sini de mineraller oluşturmaktadır. Yapılan bilimsel çalışmalarda arı sütü'nün nörotrofik, hepatoprotektif, hipotensif, antitümör, antibiyotik ve anti-inflamatuvar gibi farmakolojik aktiviteleri belirtilmiştir. Ayrıca arı sütünün içeriğinde yer alan flavonoidler sayesinde yüksek antioksidan potansiyele sahip olduğu da bilinmektedir. Bu arı ürünlerinin yanı sıra fenolik içerik bakımından zengin bazı bitki türlerinin antioksidan kapasitelerinin belirlenmesine yönelik birçok çalışma yapılmış ve yapılmaya da devam edilmektedir. Arı sütü çok eski yıllardan beri geleneksel tıpta çeşitli hastalıkların tedavisinde kullanıldığı, antioksidan, antibakteriyel, antifungal, yara iyileştirici ve antikarsinogenik gibi biyolojik aktivitelere sahip olduğu birçok bilimsel çalışma ile gösterilmiştir. Bu arı ürünlerinin yanı sıra fenolik içerik bakımından zengin bazı bitki türlerinin antioksidan kapasitelerinin belirlenmesine yönelik birçok çalışma yapılmış ve yapılmaya devam edilmektedir (4-7).

Biyolojik sistemlerde elektron alıcı moleküller "serbest radikaller" olarak adlandırılırlar. Serbest radikallerin aktif oksijen türevlerine de "oksidanlar" denir. Oksidanların hedef moleküllerden elektron alma yetenekleri nedeniyle, bu hedef moleküllerin yapısını ve fonksiyonlarını değiştirerek hücre membranını, DNA ve RNA gibi genetik materyali ve değişik enzimatik olayları etkileyerek hücre hasarlarına yol açtığı bilinmektedir. Serbest radikallerin diyabet, iskemi reperfüzyon hasarı, kanser, yaşlanma ve kas hastalıkları gibi patolojik tablolara yol açtığına dair bulgular

bulunmaktadır. Biyolojik membranlar oksidanların saldırılarına karşı duyarlıdırlar. Lipid peroksidasyonun en önemli ürünlerinden olan malondialdehit (MDA), hücre membranlarından iyon alışverişine etki ederek membrandaki bileşiklerin çapraz bağlanmasına yol açar ve iyon geçirgenliğinin ve enzim aktivitesinin değişimi gibi olumsuz sonuçlara neden olabilir (8-10).

Canlı organizmalarda serbest radikal hasarına karşı organ ve dokuları korumak için süperoksit dismutaz (SOD), glutatyon peroksidaz (GPx), glutatyon S-transferaz (GST) ve katalaz (CAT) enzim sistemleri ile flavonoidler, seruloplazmin, transferrin, indirgenmiş glutatyon (GSH), askorbik asit (vitamin C), β -karoten ve alfa-tokoferol gibi son derece kompleks enzimatik olmayan antioksidan sistemler mevcuttur (10, 11).

Oksidatif stres; oksidan-antioksidan dengenin oksidan yönüne kayması sonucu potansiyel hücresel hasarların oluşabilmesi durumudur. Oksidatif stres, serbest radikal üretiminin artışı ve/veya antioksidan savunmanın azalması sonucu oluşabilmektedir (12). Günümüzde fenolik bileşiklere ilgi antioksidan özellikleri nedeniyle oldukça fazladır. Birçok araştırmacı polifenollerin indirgeyici ajan olma, metal şelatlama ve serbest radikal süpürücü özellik gösterdiğini ortaya koymuştur. Flavonoidler, biyoaktif polifenoller olup lipid peroksidasyonunu önlediği, antiviral, antialerjik ve anti-inflamatuvar gibi birçok biyolojik aktivitesinin olduğu bilinmektedir. İnsan diyetindeki arı ürünlerinin antioksidan kapasiteleri içeriğindeki fenolik bileşiklerin bir sonucu olduğu bilinmektedir. Serum ve eritrosit örneklerinde oluşturulan oksidatif hasarın tek tek flavonoid ilavesiyle azaltıldığını gösteren çalışmalar mevcut olmakla birlikte kuersetin bu tarz yayınlarda ön plana çıkmaktadır (13-15).

Organik bir hidroperoksit olan t-BHP, oksidatif hücre hasarı mekanizmalarını kapsayan çalışmalarda sıklıkla kullanılan bir bileşiktir. Organik hidroperoksitler alkil radikallerine bir oksijen eklenmesi ve/veya peroksil radikallerinden bir hidrojen atomunun çıkarılması sonucu oluşurlar. t-BHP sonradan diğer alkoksil ya da peroksil radikallerine ayrışabilir ve bu durum lipid peroksidasyon zincir reaksiyonlarını hızlandırabilir (16, 17).

Hidrojen peroksit reaktif oksijen türleri arasında yer alıp çeşitli mekanizmalarla kendisinden daha reaktif olan reaktif oksijen türlerine dönüşebilir ve hücre membranlarını kolayca geçebilme kapasitesine sahiptir (18, 19).

Yüksek oranda H_2O_2 üretimi çok etkili antioksidan sistemlerle dengededir. Dehidratasyon, düşük ve yüksek sıcaklıklar, aşırı radyasyona maruz kalma bu dengeyi bozar. Artan H_2O_2 protein, lipid ve nükleik asitlere hasar vermekle birlikte enzim aktivasyonu, gen ekspresyonu, programlanmış hücre ölümü ve hücre hasarı içeren sinyal tepkilerini başlatmaktadır. Hücrelerde H_2O_2 'nin üretimi süperoksit radikalinden SOD enzimi katalizörlüğü ile gerçekleştirilirken, eliminasyonu ise CAT ve GPx enzimleri tarafından sağlanmaktadır. Bu sebeple antioksidan enzim aktivitesinin değerlendirilmesi amacıyla yapılan çalışmalarda SOD, CAT ve GPx seviyelerine çeşitli yöntemlerle bakıldığı görülmektedir (20-22).

Son yıllarda sistemik oksidatif stres derecesini belirlemek için serum ve eritrositlerde; lipid peroksidasyonu son ürünü MDA, protein oksidasyonu göstergesi olarak nitrotirozin, DNA hasarı belirteci olarak 8-oksoguanin, toplam oksidan kapasite (TOK) ve toplam antioksidan kapasite (TAK) gibi belirteçler kullanılmaktadır (23-25).

Yapılan literatür araştırmalarında biyolojik membranlardaki serbest radikal indüklü oksidatif hasarlar ve bu hasarlara karşı arı sütü ekstraktlarının etkinliğini değerlendirmek için *in vitro* insan eritrositlerinde yapılmış sınırlı sayıda çalışmaya rastlanılmaktadır (26, 27).

Yapılan literatür araştırmalarında insan eritrosit hücrelerinde, serbest radikal indüklü oksidatif hasarlar ve bu hasarlara karşı arı sütü ekstraktının etkinliğini değerlendirmek amacıyla yapılan bir çalışmaya rastlanmamıştır. Buradan hareketle hazırlanan arı sütü ekstraktlarının biyomolekülleri oksidatif hasara karşı koruma kapasiteleri bu çalışma kapsamında değerlendirilecektir.

4. GENEL BİLGİLER

4.1. Arı Sütü

Bir arı kovanında yetişkin kraliçe ve genç larvaları beslemek için genç işçi arılar hipofaringeal bezinden salgılanan beyaz madde royal jelly olarak adlanır. Bu madde daima kraliçe ve larvalar tarafından tüketilir ve depolanmaz. Bu yüzden geleneksel bir arıcılık ürünü olmamıştır. Kraliçe ve işçi arılar arasındaki fark beslenmeleri ile ilgilidir. Kraliçe ömür boyu arı sütü tüketirken, diğer arılar sadece hayatların ilk 4 gününe kadar arı sütü tüketirler ve bu yüzden kraliçe arısı fiziksel olarak ve güç olarak diğer arılardan farklılığa sahiptir (28). Arı sütünün görünümü Şekil 1’de verilmiştir.



Şekil 1. Arı sütün fizyolojik görünümü (28)

4.1.1. Arı Sütünün Fiziksel Özellikleri

Arı sütü oldukça sıvı ve homojen bir maddedir. Macun kıvamında sarı veya bej renkli, keskin bir fenolik kokusu ve karakteristik bir ekşi tadı vardır. Yaklaşık 1.1 g/cm^3 yoğunluğa sahiptir ve suda kısmen çözünürdür. Oda sıcaklığında ve üzeri sıcaklıklarda saklandığında yavaş yavaş viskoz hale gelir (28).

4.1.2. Arı Sütünün Kimyasal Özellikleri ve İçeriği

Arı sütünün kimyasal olarak çoğunlukla azotlu maddelerden oluşmuştur. Bu azotlu maddenin yaklaşık % 73.9’u proteinlerdir. Arı sütünde 6 ana proteinden 4’ü

glikoprotein yapısındadır. Azotlu maddelerin bileşenleri ise; % 2.3'ü serbest aminoasitler ve % 0.16'sı ise peptidlerdir. Bunlardan aspartik asit ve glutamik asit en fazla bulunmaktadır. Serbest amino asitler içinde ise prolin ve lizin en fazla miktarda bulunurlar. Arı sütünde bağışıklık sisteminin anahtar bir elemanı yani gamma globulin bulunmaktadır. Kollajen ve glukoz oksidaz, fosfataz ve kolinesteraz gibi çok sayıda enzim ve insülin benzeri bir madde bulunmaktadır (29-31).

Serbest yağ asitleri (FFA), lipid fraksiyonun % 80-90'ını oluşturur. Bunların çoğu kısa zincirli (8-10 karbon atomlu) hidroksi yağ asitleri veya dikarboksilik asitlerdir. Arı sütünün toplam taze ağırlığının yaklaşık % 1'i ve kuru ağırlığı yaklaşık % 2-3'üdür. K, Ca, Na, Zn, Fe, Cu ve Mn arı sütünün temel mineralleridirler. Bol miktarda vitamine sahiptir. Her gram taze ağırlık başına, 159-265 mg pantotenik asit, 80-350 µg inozitol ve 1.1-19.8 µg biotin içermektedir. Eser miktarda C vitamini bulunur. A, D, E ve K vitaminleri arı sütünde bulunmaz. Ayrıca radyoimmünojenik metodlarla çok küçük miktarda testosteron (0.012 g/g taze ağırlık) varlığı tespit edilmiştir (29).

Arı sütünün diğer bileşikleri; biopeptin ve neopterin (iki heterosiklik madde), serbest halde bazı nükleotidler, adenozin, üridin, guanozin ve sitidin, AMP, ADP ve ATP, asetil kolin (1 mg/g kuru ağırlık) ve glukonik asit (taze ağırlığın % 0.6'sı)'dir (29). Arı sütünün bileşimi Tablo 1'de verilmiştir.

Tablo 1. Arı sütünün bileşimi (29, 30)

	Minimum	Maksimum
Su	% 57	% 70
Proteinler (N*6.25)	Kuru ağırlığın % 17'si	Kuru ağırlığın % 45'i
Şekerler	Kuru ağırlığın % 18'si	Kuru ağırlığın % 52'si
Lipidler	Kuru ağırlığın % 3.5'i	Kuru ağırlığın % 19'u
Mineraller	Kuru ağırlığın % 2'si	Kuru ağırlığın % 3'ü

4.1.3. Arı Sütünün Biyolojik Özellikleri

Arı sütü çok sayıda biyolojik aktiviteye sahiptir. Örneğin; antitümör, antihiperkolesterolemik, antioksidatif, antihipertansif, anti-inflammatuvar, yara iyileştirici, immünolojik, antibakteriyel ve insülin benzeri etkilere sahiptir. Bu etkilere dolaylı olarak yaklaşık otuz yıldır arı sütü ticari olarak tıbbi ürünler, beslenme ve

kozmetikte geniş oranda kullanılmaktadır. Arı sütü ile ilgili ilk kez 1950 yılında Fransız arı yetiştiricileri tarafından arı sütünün özelliklerini inceleyen makaleler yayınlanmıştır. Arı sütü günümüzde geniş ölçüde bilinmekte ve tüketilmektedir. Ama klinik etkileri ile ilgili bilimsel olarak ciddi derecede eksikler vardır (32).

4.1.4. Arı Sütünün Etkileri

4.1.4.1. Antioksidan Etki

Son zamanlarda arı sütünün antioksidan etkisi ile ilgili önemli çalışmalar gerçekleştirilmiştir. Hayvan çalışmalarında özellikle arı sütünün antioksidan etkisi üzerinde lipid peroksidasyonunu inhibe ettiği ispatlanmıştır. Arı sütünün DNA'yı oksidatif hasardan muhafaza ettiği ortaya çıkmıştır (33).

4.1.4.2. Nörotropik Etki

Hafıza geliştirici, yaşlılık önleyici, enerji arttırıcı, hiperaktifliği azaltıcı gibi etkilerden dolayı arı sütünün nörotropik etkileri vardır (33).

4.1.4.3. İnsülin Benzeri Etkisi

Diyabet ile mücadele eden hastalarda kan şekerini normal seviyede tutmak için arı sütü kullanılır. Bu çalışmalar Çin ve Japonya'da ileri seviyede yapılmaktadır. İnsüline benzer peptidler ve farklı bileşikler arı sütünde olduğu için kan şekeri seviyesi azaltır. Memelilerde bulunan insülin yapısı arı sütünde bulunan insüline çok benzerdir (33).

4.1.4.4. Arı Sütü ile İlgili İnsanlar Üzerinde Yapılan Çalışmalar

İnsanlar üzerindeki ilk çalışmalar 1959-1962 yıllarında başlamış ve ilk adımlar çok zor olduğu için arı sütünün üzerindeki çalışmaların ayrıntıları ve kullandığı parametreler ve yan etkileri anlamakta çok zorlanılmıştır. Arı sütü kalp ve damar hastalarında serum lipit seviyesinin azalmasına neden olur. Ayrıca insanlarda cinsel isteği arttırır. Lösemi ve lenf bezi kanseri olan 4-7 yaş aralığındaki 8 çocuk üzerinde yapılan bir çalışmada kahvaltı öncesinde günlük bir gram arı sütü tüketiminin bu çocukların kanlarında nötrofil, lökosit ve lenfosit hücrelerinin sayısını anlamlı olarak arttığı ve bu çocukların genel durumlarının iyileştiği ve kilo aldıkları gözlemlenmiştir (34).

Diğer bir çalışmada Yamada ve arkadaşları tarafından arı sütünün insan lenfositlerindeki immünoglobülin yapısını uyardığı ve meme kanserli kadınlarda IgM ve IgG'yi artırdığı gösterilmiştir (35).

Nagai ve arkadaşları propolis ve arı sütü gibi arı ürünlerinin antioksidan etkilerini araştırdıkları bir çalışmada, saf bal ve propolisin antioksidan aktivitesinin arı sütüne göre daha fazla olduğunu göstermişlerdir. Serbest radikallerin uzaklaştırılmasında ise propolis ve arı sütünün en etkili ürünler olduğunu göstermişlerdir (36).

4.2. Serbest Radikaller

Bazı atomların son orbitallerinde eşlenmemiş elektronlar mevcuttur ki bu moleküllere serbest radikaller denir. Bu moleküllerdeki çiftlenmemiş elektronlar oldukça yüksek enerjiye sahip olup oldukça kararsız ve reaktiftirler. Diğer moleküllerden elektron alarak veya vererek kararlı hale geldikleri için katyon, anyon veya nötral formda olabilirler (37).

Katyon ve anyon molekülleri serbest radikallere sahip oldukları zaman R harfi ile gösterirler. Negatif ve pozitif işareti ile alıcı veya verici radikal olarak tanımlanırlar. Serbest radikaller canlı bir hücreye veya membran içine giriş yapabilmesi için bazı enzimler tarafından taşınması gerekiyor, bu durumda, serbest radikaller hedef molekülden elektron alarak taşınırlar ve o molekülün yapısı ve işleminin değişmesine sebep olurlar (38).

Serbest radikaller bazı durumlarda hücrelerin lipid, protein, DNA, karbohidratlar ve diğer önemli moleküllere hasar verebilirler ki, bu hasar bazı önemli kalp ve damar hastalıkları, kanser, bağışıklık sistemin zayıflaması ve beyin hastalıkları gibi bozukluklara neden olabilirler. Oksijen molekülü serbest radikallerin kaynağı olarak tanımlanır. Hücre metabolizmasında, elektron taşıma sisteminde, reaktif oksijen ve nitrojen türleri (ROS, RNS) rutin olarak üretilir (39).

4.2.1. Serbest Radikallerin Oluşumu

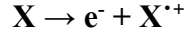
Serbest radikaller farklı bileşiklerin oluşumuna neden olabilirler.

1. İki serbest radikalın yan yana gelmesi ile ortaklaşmamış elektronlar birbirine yaklaşır ve bir kovalent bağ oluştururlar ve her iki molekül de özelliklerini kaybederler (40).

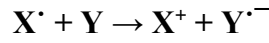


2. Serbest radikal, bir serbest olmayan molekülle reaksiyona girer ve yeni bir radikal oluşturur.

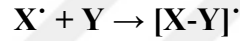
Serbest radikalın ortaklaşmamış elektronu başka bir molekülden elektron alabilir ve eşleşir hale gelir (okside edici radikal).



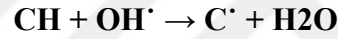
3. Serbest radikal, ortaklaşmamış elektronunu diğer bir radikal olmayan moleküle verebilir (redükte edici radikal).



4. Radikal bir bileşik, radikal olmayan bir bileşiğe katılabilir.



5. Radikal, hidrojen bağından (C-H) bir hidrojen atomu koparabilir.



Bundan dolayı serbest radikaller, radikal olmayan bileşiklerle zincirleşme reaksiyonları ile birbirine dönüşebilirler (41).

Bu nedenlerden dolayı reaktif oksijen türleri iki ana başlığa ayrılır: Radikaller ve non-radikaller (42). Tablo 2’de biyolojik öneme sahip olan reaktif oksijen türleri verilmiştir (43).

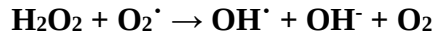
Tablo 2. Biyolojik öneme sahip olan reaktif oksijen türleri (43)

Radikaller	Non-Radikaller
Süperoksit ($\text{O}_2^\bullet$)	Hidrojen peroksit
Hidroksil ($\text{OH}^\bullet$)	Hipoklöröz asit
Peroksil ($\text{ROO}^\bullet$)	Ozon
Alkoksil ($\text{RO}^\bullet$)	Singlet oksijen
Hidroperoksit ($\text{HO}_2^\bullet$)	Peroksinitrit
Nitrik oksit ($\text{NO}^\bullet$)	Hidroperoksit

4.2.2. Serbest Radikal Türleri

4.2.2.1. Süperoksit Radikalleri ($O_2^{\cdot}$)

Oksijen molekülü indirgenmiş olduğu zaman, özellikle mitokondriyal solunum zincirinde, önemli bir reaktif radikal moleküle dönüşür ki bu reaktif molekül süperoksit radikali olarak adlanır. Bu reaktif radikal molekülü birçok biyomoleküllerin dönüşümsüz zarar görmesine yol açar. Özellikle membran'daki lipidlerin doymamış yağ asit bileşenlerine saldırarak membran yapısını bozar (44).



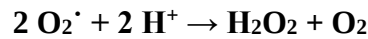
4.2.2.2. Hidroksil Radikali ($OH^{\cdot}$)

En güçlü serbest radikal molekülüdür. Oldukça reaktiftir ve özellikle lipidler, proteinler, nükleik asitler gibi makromoleküllerin yapılarını hemen bozabilir. Hidroksil ($OH^{\cdot}$), redoks zincirin metal iyonlarını oluşturmak için, H_2O_2 ile reaksiyona girer (45). Süperoksit radikalinden, hidroksil radikali Haber-Weiss reaksiyonu ile elde edilebilir (46).



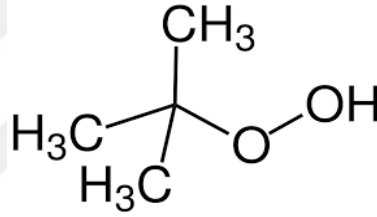
4.2.2.3. Hidrojen Peroksit (H_2O_2)

Hidrojen peroksit eşlenmemiş elektrona sahip olmadığı için genellikle reaktif Oksijen türleri başlığı altında yer alır. Yani normalde serbest radikal değildir. H_2O_2 zayıf bir oksidasyon ajanıdır bu yüzden proteinler ve enzim içeren tiyol gruplarını direk etkileyebilir. H_2O_2 'nin en önemli özelliği bu ki kolaylıkla hücre membranından geçebilir, süperoksit bu özelliğe sahip değildir. Bu yüzden H_2O_2 , verdiği hasardan dolayı hücreler ve hücre membranların arasında bir taşıyıcı görevi vardır. Süperoksit radikali diğer radikaller gibi kısa yarı ömre sahiptir bu nedenle süperoksit dismutaz enziminin katalizlediği dismutasyon reaksiyon sonucunda hidrojen peroksit ve oksijene dönüşür (47).



4.2.2.4. Tersiyer Bütıl Hidroperoksit (t-BHP)

t-BHP, hidroksit olan organik bir peroksit bileşiktir. Kimya endüstrisinde yaygın olan çeşitli oksidasyon proseslerinde kullanılır. Organik peroksitler doymamış kimyasal bağlarla patlayıcı polimerizasyona neden olabilirler ve güçlü inorganik beyazlatma ajanlarıdır. t-BHP memeli hücrelerinde hızla nüfuz eder ve sitokrom P₄₅₀ veya hemoglobin ile serbest radikal ara ürünlerine metabolize edilebilir. Bunlar daha sonra lipid peroksidasyonunu başlatabilir, hücre bütünlüğünü etkiler ve hücresel moleküller ile kovalent bağlar oluşturabilirler. t-BHP ile maruz kalan hücrelerde kalsiyum kaybı ve serbest sitozolik kalsiyum konsantrasyonun hızlı bir şekilde artmasına sebep olur ve endonükleazların aktivasyonunda sitoteksisitenin başlangıcında rol alır. t-BHP'nin membran değişiklikleri, GSH tükenmesi, hücre proteinlerine zarar vermesi ve çoğunlukla DNA hasarına neden olabilir (10).



Şekil 2. t-BHP'nin açık kimyasal formülü

Şekil 2'deki organik hidroperoksitler alkil radikallerine bir oksijen eklenmesi veya peroksil radikallerinden bir hidrojen atomunun çıkarılması sonucu oluşurlar.

4.2.3. Serbest Radikallerin Etkileri

Serbest radikaller, hücreler ve dokuların yapısını bozarak DNA ve nükleotit yapılı koenzimlerin yapılarını tahrip ederler. Enzim aktivitesinde ve lipid metabolizmasında değişikliklere neden olurlar. Membran proteinlerine hasar vererek taşıma sisteminin bozulmasına neden olurlar. Serbest radikaller birçok hastalıklarda rol alırlar. İskemi hasarı, Parkinson, Alzheimer, akut renal yetmezliği, diyabet, böbrek yetmezliği, bronşit, kanser, yaşlanma gibi bozukluklara neden olurlar. Son yıllarda yapılan araştırmalara göre, serbest radikaller, miyokard enfarktüsü, nörolojik ve kas hastalıkları, katarakt ve astım gibi hastalıklarla ilgili olduğu ortaya çıkmıştır (48).

4.3. Oksidatif Stres

Serbest radikallerin oluşma hızı ve ortadan kaldırma hızı bir organizmada denge halindedir. Bu dengenin bozulmasıyla hasar verici bir durum ortaya çıkar ki bu duruma oksidatif stres denir (49).

Bu durumda oluşan hasar, DNA yapısına, protein, lipid ve karbohidrat yapılarında modifikasyona sebep olur. Son yıllarda oksidatif stres bazı çok önemli hastalıklara yol açan bir mekanizma olup ve bazen ölüm nedeni olabilir. Ateroskleroz, diyabet, kanser, kronik inflamatuvar hastalıklar, santral sinir sistemi bozukları gibi fizyopatolojik olaylarda, hücre yaşlanması ve hücre yıkımı, hücre hasarı ve hücre ölümü gibi durumlara sebep olabilir (50).

4.3.1. Antioksidan Etki Mekanizmaları

Antioksidanlar 4 yolla oksidan moleküllerin zarar verici işlemlerini engellerler.

4.3.1.1 Süpürücü (Scavenging) Etki

Antioksidan, oksidan bileşiği bir zayıf oksidan bileşiğine çevirir.

4.3.1.2 Bastırıcı (Quencher) Etki

Serbest oksijen radikalleriyle etkileşip onlara bir hidrojen aktararak, aktiviteleini azaltan ve inaktif şekle dönüştüren mekanizmadır. A vitamini ve flavanoidler bu tarz bir etkiye sahiptirler.

4.3.1.3 Onarıcı (Repair) Etki

Oksidanın verdiği hasarı tamamını ortadan kaldırma şeklinde gerçekleşir. Antioksidan özelliğe sahip polifenolik bileşikler, DNA tamir enzimlerinin aktivitelerini ve ekspresyonlarının indüklemesini gerçekleştirirler.

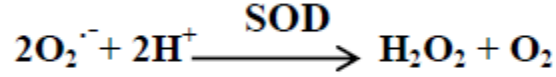
4.3.1.4. Zincir kırıcı (Chain breaking) etki

Antioksidan bileşik, serbest oksijen radikallerini kendilerine bağlayarak, oksidanların fonksiyonlarını engellerler. Bu tür etki hemoglobin, E vitamini ve mineraller de göstermektedir (51).

4.3.2 Antioksidan Enzimler

4.3.2.1. Süperoksit Dismutaz

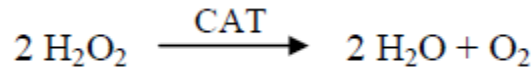
SOD (EC 1.15.1.1) süperoksit serbest radikal anyonun hidrojen peroksitle katalizleyen antioksidan enzimdir.



Süperoksit radikalının detoksifikasyonun ilk aşaması SOD enzimi tarafından gerçekleştirilir. İkinci aşamada katalaz ve glutatyon peroksidaz gibi enzimler H₂O₂'nin suya dönüştürülmesini gerçekleştirirler (52).

4.3.2.2 Katalaz

CAT (EC 1.11.1.6) homotetramerik bir enzimdir. Bu enzimin yapısında dört tane hem grubu ve dört tane de NADPH mevcuttur. Molekül ağırlığı 244 kDa olan bir enzimdir. Tüm alt birimlerde enzim kararlılığında rol oynayan NADPH içermektedir. Tıpkı hemoglobinin hem grupları gibi oksijenle reaksiyona girer bu yüzden saniyede yaklaşık 10⁷ mol H₂O₂'i H₂O ve O₂'e dönüştürebilmektedir (53).



Bu enzimin aktivitesinin yoğun olduğu bölgeler: karaciğer, böbrek, miyokard, çizgili kaslar ve eritrositlerdir (54). CAT fizyolojik şartlarda, H₂O₂ konsantrasyonunu dengede tutar ve hücrelerde H₂O₂'nin birikimini engeller ve oksidatif tehlikelere karşı korur (55).

4.3.2.3. Glutatyon Peroksidaz (GSH-Px)

Glutatyon peroksidaz (EC 1.11.1.9) dört selenyum içeren tetramerik yapıda sitozolik bir enzimdir. Esas biyolojik rolü organizmayı oksidatif hasardan korur. GSH-Px; H₂O₂ ve lipid hidroperoksitlerinin indirgenmesini katalizler. Glutatyonun insanlarda sekiz tanımlanmış farklı izoformu (GPx1-8) mevcuttur (56).

5. GEREÇ ve YÖNTEM

5.1. Gereç

5.1.1. Kullanılan Cihazlar, Alet ve Malzemeler

Bu tez çalışmasında kullanılan cihazlar, laboratuvar gereçleri ve malzemeler Tablo 3’te verilmiştir.

Tablo 3. Çalışmada kullanılan cihazlar, laboratuvar gereçleri ve malzemeler

Kullanılan Cihaz, Alet, Malzeme	Marka
Çalkayıcı	Nüve, SL 350
Dondurucu	Arçelik, Altus (-20 °C), Thermo
Etüv	Gallenkamp
Hassas Terzi	Mettler Toledo, AB204-S
İnkübatör	Shel Lab Shaking Incubator, Heraeus
Karıştırıcı	Ika Vortex Genius 3
Manyetik Karıştırıcı	Ikamag RH
Mikropleyt Okuyucu	Versa Max Microplate Reader
Otomatik Pipet 0.5-10 µL	Eppendorf
Otomatik Pipet 10-100 µL	Eppendorf
Otomatik Pipet 1000 µL	Socorex
Otomatik Pipet 1-5 mL	Socorex
Otomatik Pipet 20-200 µL	Eppendorf
PH-metre	Hanna Instruments HI 2211
Santrifüj	Eppendorf 5810
Soğutmalı Santrifüj	Beckman Coulter Allegra 64R

5.1.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Çözeltiler

Bu tez çalışmasında kullanılan kimyasal maddeler ve çözeltiler Tablo 4’te verilmiştir.

Tablo 4. Çalışmada kullanılan kimyasal maddeler ve çözeltiler

Kullanılan Kimyasal Madde, Çözelti	Marka
Amonyum sülfat	Merck
Bakır (II) klorür (CuCl ₂)	Sigma
Bovine serum albömin (BSA)	Sigma
Disodyum hidrojen fosfat (Na ₂ HPO ₄)	Merck
Dimetil sülfoksit (DMSO)	Sigma
Etanol	Sigma
Etilendiamin tetra asetik asit (EDTA)	Merck
Gliserol	Sigma
Hirojen peroksit (H ₂ O ₂)	Sigma
Kloroform	Merck
Ksantin	Sigma
Ksantin oksidaz	Sigma
Kuersetin	Sigma
Potasyum dihidrojen fosfat (KH ₂ PO ₄)	Merck
Sodyum bikarbonat (NaHCO ₃)	Merck
Sodyum dihidrojen fosfat (NaH ₂ PO ₄)	Merck
Sodyum hidroksit (NaOH)	Sigma
Sodyum karbonat (Na ₂ CO ₃)	Merck
Sodyum klorür (NaCl)	Merck
Sodyum meta-arsenit	Merck
Süperoksit dismutaz (SOD) standardı	Sigma
Tersiyer-bütıl hidroksit (t-BHP)	Sigma
Tiyobar bitükrik asit (TBA)	Sigma
Trikloro asetik asit (TCA)	Sigma

5.2. Yöntem

5.2.1. Arı Sütü Ekstraktının Hazırlanması

Dondurulmuş arı sütü örneği derin dondurucudan alınıp oda sıcaklığında çözünmesi sağlandıktan sonra 4 g tartıldı ve hacmi PBS ile 8 mL'ye tamamlandı (500 mg/mL). 10.000 g'de 30 dakika santrifüjlendi. Bu örnekten 50.000, 40.000, 30.000, 20.000, 10.000 µg/mL'lik dilüsyonlar PBS ile hazırlandı.

5.2.2. Eritrosit Hücre İzolasyonu

Etik kurul onayı alındıktan sonra, KTÜ Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Laboratuvarı'nda çalışan 15 gönüllüden (sigara, alkol, ilaç kullanmayan, kronik rahatsızlığı olmayan, ağır egzersiz yapmayan) onam formu eşliğinde 3'er adet EDTA'lı tüpe (eritrosit eldesi için) kan örneği alındı. Alınan kanlar 1690 x g'de 10 dakika santrifüj edilip süpernatantları ayrıldı. Süpernatantları ayrılan kanlara hacimlerinin 2 katına kadar izotonik tuz çözeltisi ilave edildi, tüpler birkaç defa hafifçe ters-düz edilip santrifüj edildi. Ara yüzeyde beyaz bir tabaka şeklinde duran lökositler ve üst kısım uzaklaştırıldı. Bu yıkama işlemi üst kısım berraklaşana kadar devam ettirilerek eritrosit paketleri hazırlandı. Eritrosit paketlerinin KTÜ Tıp Fakültesi Biyokimya Laboratuvarı'nda hematokrit (Hct) ve hemoglobin (Hb) değerleri ölçüldü. Hematokrit oranı deneylerde % 10 olacak şekilde % 0.9'luk NaCl ile seyreltildi. Hazırlanan eritrosit paketleri aligotlanıp -20 °C'de saklandı.

Kullanılan Çözeltiler

%0.9'luk NaCl: 9 g NaCl tartılıp bir miktar saf su ile çözülüp hacmi 1 L'ye tamamlandı.

5.2.3. Tersiyer Bütil Hidroperoksit (t-BHP) Hazırlanması

1987.8 µL PBS steril 15 mL'lik falkon tüpe alındı. Üzerine stok t-BHP şişesinden (7989 M) 12.5 µL konuldu ve iyice vortekslenerek tamamen çözünmesi sağlandı. Böylece 50.000 µM konsantrasyonda ara stok oluşturuldu.

Kullanılan Çözeltiler

Fosfat Tamponlu Tuz Çözeltisi (PBS): 1.76 mL 0.5 M KH₂PO₄ çözeltisi ve 6.08 mL 0.5 M K₂HPO₄ çözeltisi %0.9'luk NaCl çözeltisinde karıştırılıp pH 7.4'e ayarlandı ve çözeltinin hacmi 1 L'ye tamamlandı.

5.2.4. Kuersetin Hazırlanması

1 mg kuersetin numunesi tartıldı ve 1 mL DMSO çözeltisi ilavesiyle vortekslenerek tamamen çözünmesi sağlandı. 1 000 µg/mL'lik çalışma stoğu hazırlandı. Daha sonra bu stoktan çeşitli konsantrasyonlarda ara stoklar hazırlandı.

5.2.5. Deneyde Kullanılacak t-BHP Konsantrasyonunun Belirlenmesi

Deneyde kullanılacak olan t-BHP dozunun bulunması için farklı dozlarda t-BHP hazırlandı. Optimum hasarı oluşturacak oksidan konsantrasyonunu bulmak için eritrosit paketler üzerin çeşitli konsantrasyonlarda t-BHP eklenip, 1 saat 37°C’de inkübasyona bırakıldı. Daha sonra eritrosit paketlerinde MDA ölçümü gerçekleştirilerek kontrol grubuna göre anlamlı derecede yüksek ($p<0.05$) hasar oluşturan 750 μM t-BHP konsantrasyonu seçildi (Sonuçlar EK 1’de verilmiştir).

5.2.6. Deneyde Kullanılacak Arı Sütü Konsantrasyonunun Belirlenmesi

50 mg/mL’lik arı sütü ekstraktından çeşitli konsantrasyonlarda ara stoklar hazırlandı. Eritrosit paketlerinin üzerine çeşitli konsantrasyonlarda arı sütü ekstraktı eklenip, 2 saat 37°C’de inkübasyona bırakıldı. Önceden belirlemiş olduğumuz dozda t-BHP eklenerek 1 saat daha 37°C’de inkübe edilip, MDA ölçümü gerçekleştirildi. MDA sonuçlarına göre optimum t-BHP’nin oluşturduğu hasarı kontrol grubuna en yakın seviyede sonuç aldığımız konsantrasyon olan 30000 $\mu\text{g/mL}$ seçildi (Sonuçlar EK 2’de verilmiştir).

5.2.7. Deneyde Kullanılacak Kuersetin Konsantrasyonunun Belirlenmesi

1 mg/mL’lik kuersetin ekstraktından çeşitli konsantrasyonlarda ara stoklar hazırlandı. Eritrosit paketlerinin üzerine çeşitli konsantrasyonlarda (1-10 $\mu\text{g/mL}$) kuersetin eklenip, 2 saat 37°C’de inkübasyona bırakıldı. Daha sonra 750 μM t-BHP eklenerek 1 saat daha 37°C’de inkübe edilip, MDA ölçümü gerçekleştirildi. MDA sonuçlarına göre hem t-BHP’nin oluşturduğu hasarı kontrol grubuyla aynı seviyede sonuç aldığımız hem de negatif kontrole göre anlamlı derecede düşük ($p<0.05$) konsantrasyon olan 2 $\mu\text{g/mL}$ seçildi.

5.2.8. Deney Grupları

Deney grupları Tablo 5’te oluşturuldu. Pipetlemeler μL olarak yapıldı.

Tablo 5. Deney grupları

Hacim(μL)	Kontrol Grubu	Arı Sütü Grubu	Pozitif Kontrol (kuersetin)	Negatif Kontrol t-BHP
Eritrosit Paketi (Hct: % 10)	2000	-	1967.6	1969.6
Arı Sütü (50000 μ g/mL)	-	1969.6	-	-
Kuersetin (2 μ g/mL)	-	-	2	-
37°C’de 2 saat karanlıkta inkübasyona bırakıldı.				
t-BHP (750 μ M)	-	30.4	30.4	30.4
37°C’ de 1 saat karanlıkta inkübasyona bırakıldı.				

5.2.9. Eritrosit Süperoksit Dismutaz Aktivitesi Tayini

Süperoksit dismutaz aktivitesi, Sun ve Oberley (57) metoduna göre yapıldı. Bu metod, ksantin-ksantin oksidaz sisteminin oluşturduğu süperoksit radikallerinin nitro blue tetrazolium (NBT)’u indirgeyerek oluşturduğu mavi-mor rengin 560 nm’de verdiği absorbansın spektrofotometrik olarak ölçülmesidir. Eritrositlerdeki SOD’un ortamdaki süperoksit radikallerini uzaklaştırması sonucu optik dansitede meydana gelen azalmadan SOD tarafından katalizlenen reaksiyonun % inhibisyonu hesaplandı.

Kullanılan Çözeltiler

Etanol: kloroform karışımı (5:3): 50 mL etanol 30 mL kloroformla karıştırıldı.

0.3 mmol/L ksantin çözeltisi: 3.65 mg ksantin 80 mL deiyonize suda çözöldü.

0.6 mmol/L EDTA Çözeltisi: 8.93 mg EDTA 40 mL deiyonize suda çözöldü.

150 μ L NBT Çözeltisi: 4.9 mg NBT 40 mL deiyonize suda çözöldü. NBT günlük olarak taze hazırlandı.

400 mM Na₂CO₃ Çözeltisi: 1.01 g Na₂CO₃ 24 mL deiyonize suda çözöldü.

0.5 g/L BSA: 24 mL deiyonize suda 12 mg BSA çözöldü.

167 U/L ksantin oksidaz çözeltisi: 3.3 U/mL’lik orjinal şişeden 101 µL alınıp 2 mL’ye amonyum sülfatla tamamlandı. Ksantin oksidaz günlük hazırlandı.

0.8 mmol/L CuCl₂ çözeltisi: 5.37 mg CuCl₂ 50 mL deiyonize suda çözüldü. Günlük taze hazırlandı.

2 mol/L amonyum sülfat: 2.64 g amonyum sülfat 10 mL deiyonize suda çözüldü.

SOD standartları: 20, 16, 0.5, 0.313, 0.125 U/mL’lik SOD standartları ve kör çözeltisi hazırlandı.

Reaksiyon karışımı: 80 mL 0.3 mM ksantin çözeltisi, 40 mL 0.6 mM EDTA çözeltisi, 40 mL 150 µM NBT çözeltisi, 24 mL 400 mM Na₂CO₃ çözeltisi, 12 mL 1g/L

BSA karıştırıldı. Reaksiyon karışımı hazırlanırken hacimler hesaplanıp bütün maddeler aynı kapta karıştırıldı.

Deneyin Yapılışı

100 µL eritrosit paketi 900 µL soğuk saf su ile karıştırılıp hemoliz edildi. Elde edilen hemolizata 800 µL etanol:kloroform (5:3) karışımı eklenip vortekslendi. 18000 g’de 4°C’de bir saat santrifüj edildi. Elde edilen süpernatant SOD ve CAT aktivitesinin yanı sıra TAK ve TOK ölçümünde kullanıldı. Tablo 6’da SOD’un aktivitesi ölçümü verilmiştir.

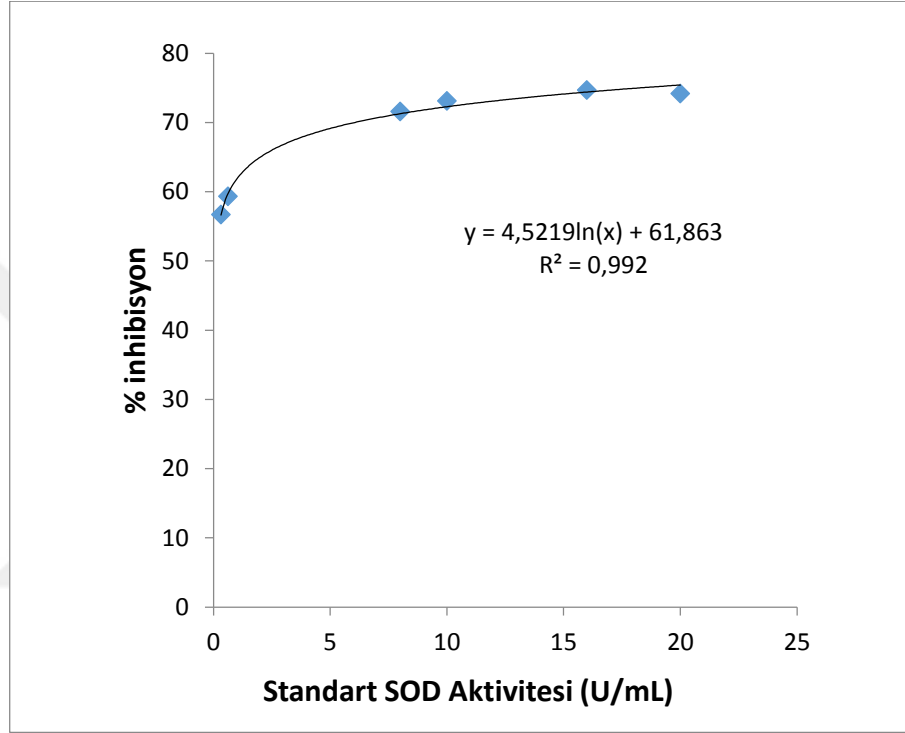
Tablo 6. SOD aktivitesi ölçümü

Çözeltiler	Hacim (mL)
Reaksiyon Karışımı	1.225
Süpernatant	0.25
Ksantin Oksidaz	0.025
25°C’de 20 dakika inkübasyona (karanlıkta) bırakıldı.	
Bakır Klorür	0.5
560 nm’de absorbans ölçüldü.	

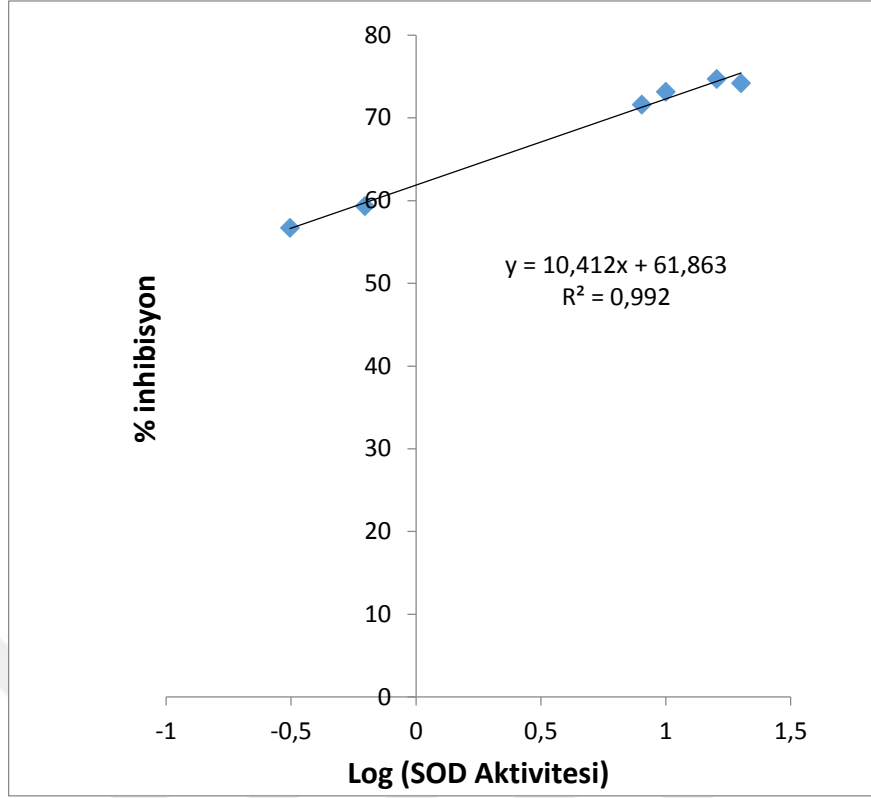
Tablo 6’de ifade edildiği gibi çeşitli işlemler yapıldı ve 560 nm de absorbanslar ölçüldü. Hesaplamalar % inhibisyon olarak hesaplandı. Şekil 3’deki standart grafiği SOD aktivitesinin logaritması alınarak Şekil 4’daki lineer standart grafiğine

dönüştürüldü. Bu grafikten yararlanılarak % inhibisyonlar SOD aktivitesine dönüştürüldü. Sonuçlar hemoglobin miktarına bölünerek U/g Hb olarak hesaplandı.

$$\% \text{ İnhibisyon} = \frac{(A \text{ Kör} - A \text{ numune})}{A \text{ Kör}} \times 100$$



Şekil 3. Standart SOD aktivitesi ve % inhibisyon grafiği



Şekil 4. Log standart SOD aktivitesi ve % inhibisyon grafiği

5.2.10. Eritrosit Katalaz Aktivitesi Tayini

Katalaz aktivitesi, temel prensibi amonyum molibdatın hidrojen peroksit ile oluşturduğu sarı renkli kompleksin 405 nm’de absorbansının ölçülmesi esasına dayanan Goth (58) metoduna göre yapıldı.

Kullanılan Çözeltiler

60 mM sodyum potasyum fosfat tamponu (pH 7.0): 5.37 g KH_2PO_4 ve 3.65 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ yaklaşık 750 mL saf suda çözüldü, pH 7.0’a ayarlandı ve hacmi 1 L’ye tamamlandı.

32.4 mM amonyum molibdat çözeltisi: 1.89 g amonyum molibdat, 50 mL saf suda çözüldü.

65 mM H_2O_2 çözeltisi: 327 μL % 30’luk H_2O_2 , 50 mL fosfat tamponunda çözüldü. H_2O_2 çözeltisi taze hazırlandı.

Tablo 7. CAT aktivitesi ölçümü ve yapılan işlemler

Çözeltiler	Numune	Kör 1	Kör 2
Numune	20 µL	-	-
Tampon	-	20 µL	120 µL
t-BHP'li tampon	100 µL	100 µL	-
37°C'de 1 dakika bekletildi			
Amonyum molibdat çözeltisi	100 µL	100 µL	100 µL
405 nm'de absorbansları okundu.			

Tablo 7'de ifade edilen işlemler yapıldı. Ölçülen absorbans değerleri aşağıdaki denklemde yerlerine konularak katalaz aktivitesi hesaplandı. Sonuçlar hemoglobin miktarlarına bölünerek U/g Hb olarak ifade edildi.

$$\text{Katalaz aktivitesi (U/(mL))} = \frac{(A_{Kör_2} - A_{numune}) \times 271}{(A_{Kör_2} - A_{Kör_1})}$$

5.2.11. Eritrosit Malondialdehit Seviyesinin Belirlenmesi

Eritrosit MDA seviyesi Stocks ve Dormandy metoduna göre gerçekleştirildi. Bu metod MDA'nın asidik ortamda tiyobarbitürik asit (TBA)'in ısıtılması sonucu oluşan pembe renkli kompleksin 532 nm'de absorbansının ölçülmesi esasına dayanır.

Kullanılan Çözeltiler:

Fosfat tamponlu tuz çözeltisi (PBS): 1.76 mL 0.5 M KH₂PO₄ çözeltisi ve 6.08 mL 0.5 M K₂HPO₄ çözeltisi % 0.9'luk NaCl çözeltisinde karıştırılıp pH 7.4'e ayarlandı ve çözeltinin hacmi 1 L'ye tamamlandı.

0.4 M Sodyum azid: 2.6 g NaN₃ 100 mL PBS'de çözüldü.

TBA çözeltisi: 0.1 g TBA 500 µL 1N NaOH çözeltisinde çözülerek bir miktar saf su ilave edilip ısıtıldı. İyice çözüldükten sonra hacmi 10 mL'ye tamamlanır.

% 28'lik trikloro asetik asit çözeltisi: 14 mg TCA 50 mL saf suda çözüldü.

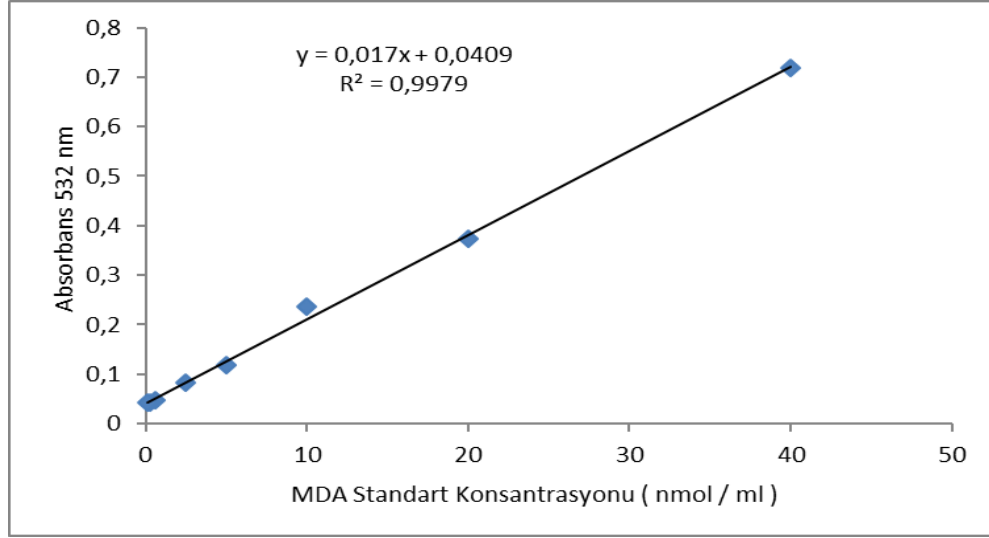
Sodyum arsenit çözeltisi: 0.52 g sodyum meta-arsenit 20 mL % 28'lik TCA'da çözüldü.

Standart çözeltileri: MDA standartları 40, 20, 10, 5, 2.5, 1.25, 0.625, 0.313 nmol/mL konsantrasyonlarda hazırlandı.

Tablo 8. Eritrosit MDA ölçümü ve yapılan işlemler

Çözeltiler	Hacim(µL)
Eritrosit paketi	300
Azitli PBS çözeltisi	2700
37°C’de 10 dakika karıştırılır.	
PBS çözeltisi	3000
37°C’de 2 saat çalkalayıcı üzerinde inkübasyona bırakıldı. Hücre süspansiyonu oluşturuldu.	
Süspansiyon	900
TCA – Arsenit	600
1690 x g’de 10 dakika santrifüj edildi ve süpernatant atıldı.	
Süpernatant ve Standartlar	300
TCA	100
TBA	100
15 dakika kaynar su banyosunda bekletildi.	
Soğutulduktan sonra mikropleyte aktarıldı ve 532 nm’de absorpsanları okundu.	

Tablo 8’da ifade edildiği gibi işlemler gerçekleştirildi. Şekil 10’daki MDA standart grafiğinden yararlanılarak örneklerdeki MDA konsantrasyonu hesaplandı. Belirlenen MDA düzeyleri hemoglobin değerlerine bölünerek ifade edildi.



Şekil 5. MDA standart grafiği

5.2.12. Eritrosit Toplam Oksidan Kapasitesi Seviyesinin Belirlenmesi

Örneklerin toplam oksidan kapasitesi, Rel Assay marka ticari kitler kullanılarak ölçüldü. Ölçüm, testin çalışma prensibinde ifade edildiği üzere örneklerin içerdiği oksidan moleküllerin ferröz iyonu ferrik iyonla kümülatif olarak oksitlemesine dayanan, kolorimetrik yöntemle yapıldı. Sonuçlar $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ eşdeğeri/L olarak belirtildi (59).

5.2.13. Eritrosit Toplam Antioksidan Kapasitesi Seviyesinin Belirlenmesi

Örneklerin total antioksidan kapasitesi, Rel Assay marka ticari kitler kullanılarak ölçüldü. Ölçüm yöntemi örnekteki tüm antioksidan moleküllerin renkli ABTS* katyonik radikalini redüklemesi sonucu renkli radikalın antioksidan moleküllerin toplam konsantrasyonlarıyla orantılı olarak dekolorize olması esasına dayanmaktadır. Kalibratör olarak E vitamininin suda çözünür bir analogu olan troloks kullanıldı. Sonuçlar mmol troloks eşdeğeri/L olarak ifade edildi (59).

5.3. İstatiksel Analiz

Veriler SPSS 22 (Statistical Package for the Social Sciences) bilgisayar paket programına aktararak, istatistiksel olarak değerlendirildi. Normal dağılıma uygunlukları Kolmogorov-Smirnov testi ile kontrol edildi. Normal dağılıma uyan ikiden fazla bağımsız grupların değerlendirmesinde One Way ANOVA ve post-hoc Tukey testleri, normal dağılıma uymayan ikiden fazla parametrenin değerlendirilmesinde ise Kruskal-Wallis testi ve ikili parametre için Mann Whitney-U testi uygulandı. Elde

edilen deęerler, aritmetik ortalama $\pm$ standart sapma ($\bar{x} \pm S.D$) olarak ifade edildi ve $p<0.05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.



6. BULGULAR

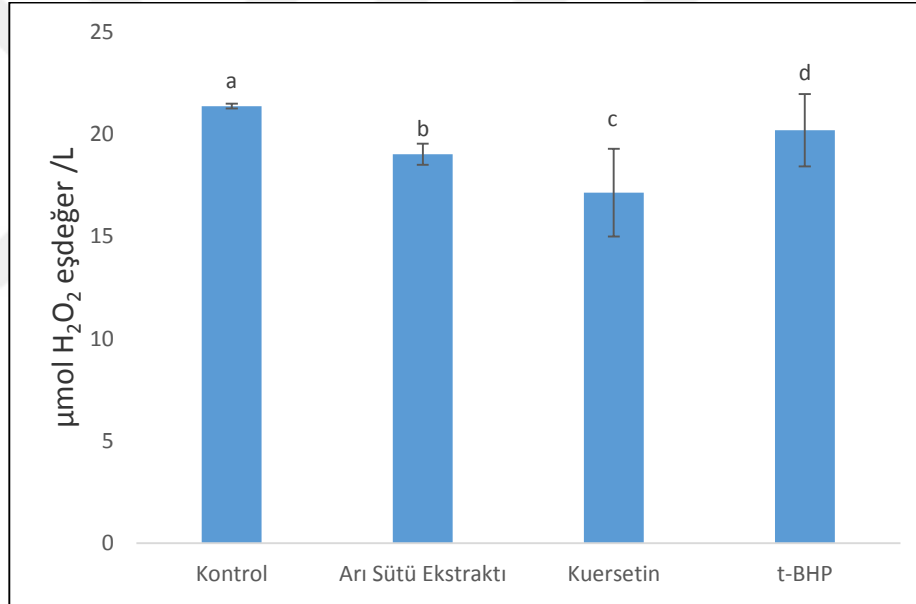
6.1. Eritrosit Toplam Oksidan Kapasite (TOK) Seviyesi

Grupların toplam antioksidan kapasite seviyeleri, Tablo 9 ve Şekil 6’da gösterildi.

Tablo 9. Eritrosit TOK seviyeleri

Grup (n=3)	Eritrosit TOK ($\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ eşdeğeri/L)	ANOVA, p
Kontrol	21.38 ± 1.77^a	0.032
Arı Sütü Ekstraktı	19.02 ± 0.52	
Pozitif Kontrol (Kuersetin)	17.14 ± 2.14^c	
Negatif Kontrol (t-BHP)	20.20 ± 0.12	

a-c Post-hoc Tukey testine göre anlamlı fark bulundu ($p < 0.05$).



Şekil 6. Eritrosit TOK seviyeleri

Çalışmamızda elde edilen bulgulara göre, arı sütü ekstraktı grubunda negatif kontrol grubuna göre toplam oksidan kapasite anlamlı derecede düşük bulundu.

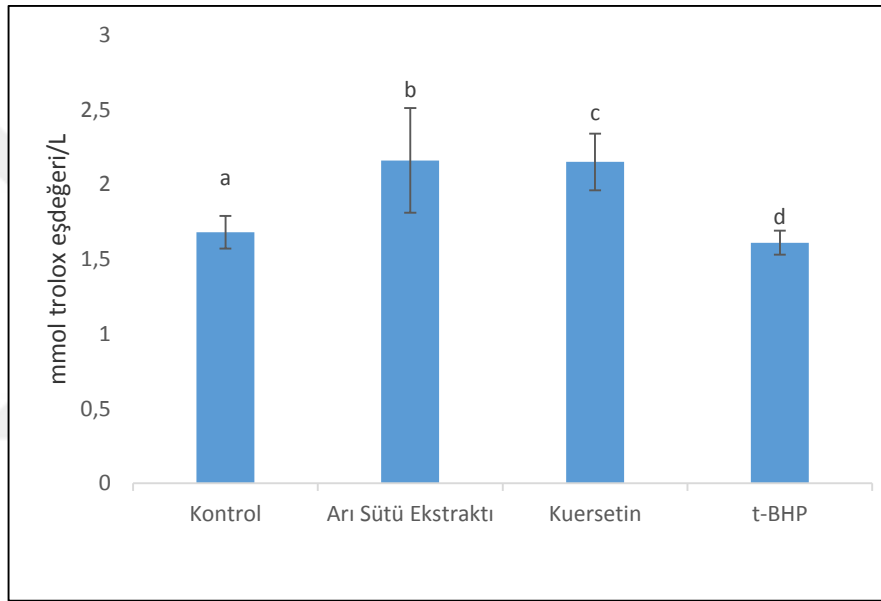
6.2. Eritrosit Toplam Antioksidan Kapasite (TAK) Seviyesi

Grupların TAK seviyeleri, Tablo 10 ve Şekil 7’de gösterildi.

Tablo 10. Eritrosit TAK Seviyeleri

Grup (n=3)	Eritrosit TAK (mmol trolox eşdeğeri/L)	ANOVA, p
Kontrol	1.68 ± 0.11	0.021
Arı Sütü Ekstraktı	2.16 ± 0.35 ^b	
Pozitif Kontrol (Kuersetin)	2.14 ± 0.18 ^c	
Negatif Kontrol (t-BHP)	1.60 ± 0.08 ^d	

b-d, c-d Post-hoc Tukey testine göre anlamlı fark bulundu ($p < 0.05$).



Şekil 7. Eritrosit TAK seviyeleri

Çalışmamızda elde edilen bulgulara göre; arı sütü ekstrakt grubu negatif kontrol grubuna göre toplam antioksidan kapasite anlamlı derecede yüksek bulundu.

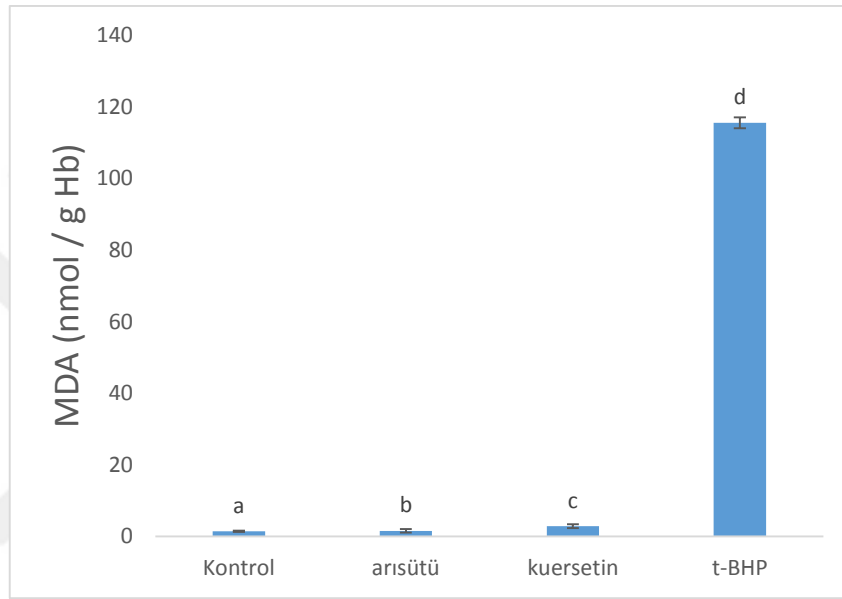
6.3. Eritrosit MDA Seviyeleri

Grupların MDA seviyeleri, Tablo 11 ve Şekil 8’de gösterildi.

Tablo 11. Eritrosit MDA Seviyeleri

Grup (n=3)	Eritrosit MDA (nmol/g Hb)	Kruskal-Wallis, p
Kontrol	1.41 ± 0.17 ^a	0.023
Arı Sütü Ekstraktı	1.53 ± 0.47 ^b	
Pozitif Kontrol (Kuersetin)	2.82 ± 0.54 ^c	
Negatif Kontrol (t-BHP)	115.55 ± 1.50 ^d	

a-c, a-d, b-c, b-d, c-d Mann-Whitney U testine göre anlamlı fark bulundu ($p < 0.05$).

**Şekil 8.** Eritrosit MDA seviyeleri

Çalışmamızda elde edilen bulgulara göre; eritrosit paketlerinde arı Sütü ekstrakt grubunun MDA seviyesi, negatif kontrole göre anlamlı derecede düşük bulundu. MDA seviyesinin anlamlı derecede düşük olması oksidatif hasarı önlemek için verilen 30000 µg/mL arı sütü ekstraktının antioksidan etki göstererek, reaktif oksijen radikallerinin temizlenmesi sonucu, lipid peroksidasyonunu önleyici yönde etki ettiğini göstermektedir.

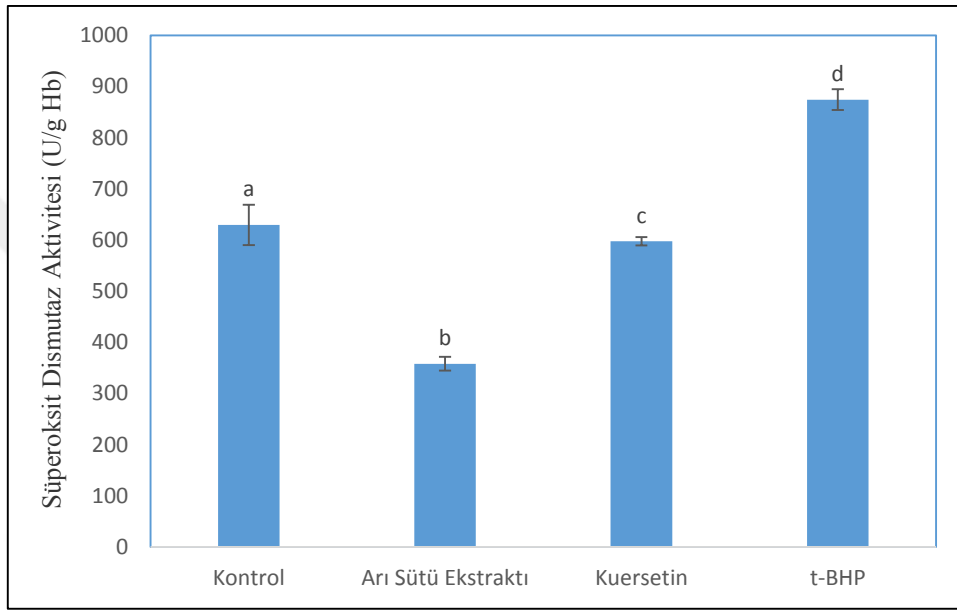
6.4. Eritrosit Süperoksit Dismutaz (SOD) Aktivitesi

Grupların SOD aktiviteleri, Tablo 12 ve Şekil 9’da gösterildi.

Tablo 12. Eritrosit SOD Aktiviteleri

Grup (n=3)	Eritrosit SOD Aktivitesi (U/g Hb)	ANOVA, p
Kontrol	629.7 ± 39.40 ^a	0.0001
Arı Sütü Ekstraktı	358 ± 13.53	
Pozitif Kontrol (Kuersetin)	597.8 ± 8.15 ^c	
Negatif Kontrol (t-BHP)	874.2 ± 50.96 ^d	

a-c, a-d Post-hoc Tukey testine göre anlamlı fark bulundu ($p < 0.05$).



Şekil 9. Eritrosit SOD Seviyeleri

Çalışmamızda elde edilen bulgulara göre; eritrosit lizatında, arı sütü ekstrakt grubunun negatif kontrole göre SOD enzim aktivitesinin anlamlı derece düşük bulunması, oksidatif hasarı önlemek için verilen 30000 µg/mL arı sütü ekstraktının antioksidan etki göstererek ortamdaki serbest oksijen radikallerini uzaklaştırarak ya da metabolize ederek, SOD enzimin aktivitesinin bu radikallerden etkilenmesini engellemek suretiyle tüketimini azalttığı ve endojen antioksidan sistemi güçlendirdiğini göstermektedir.

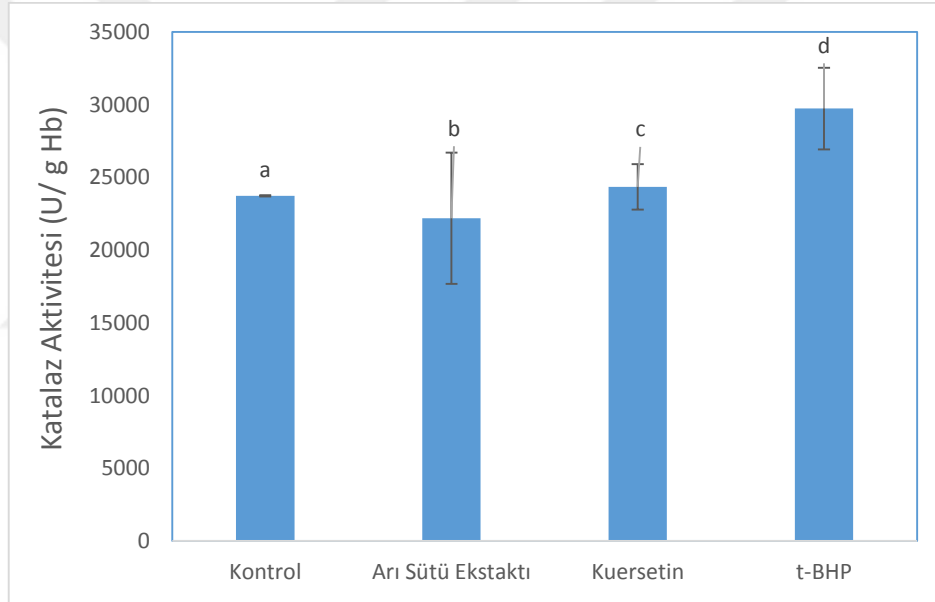
6.5. Eritrosit Katalaz (CAT) Aktivitesi

Grupların CAT aktiviteleri, Tablo 13 ve Şekil 10’da gösterilmiştir.

Tablo 13. Eritrosit CAT Aktiviteleri

Grup (n=3)	Eritrosit CAT Aktivitesi (U/g Hb)	ANOVA, p
Kontrol	23738 ± 41.02 ^a	0.042
Arı Sütü Ekstrakt	22191 ± 4510 ^b	
Pozitif Kontrol (Kuersetin)	24559 ± 971 ^c	
Negatif Kontrol (t-BHP)	29736 ± 2806 ^d	

b-d Post-hoc Tukey testine göre anlamlı fark bulundu (p<0.05).



Şekil 10. Eritrosit CAT seviyeleri

Çalışmamızda elde edilen bilgilere göre, eritrosit lizatında, arı sütü ekstrakt gurubunu negatif kontrole göre CAT enzim aktivitesinin anlamlı derece düşük bulunması, oksidatif hasarı önlemek için verilen 30000 µg/mL arı sütü ekstraktının antioksidan etki göstererek ortamdaki serbest oksijen radikallerini uzaklaştırarak ya da metabolize ederek, CAT enzimin aktivitesinin bu radikallerden etkilenmesini engellemek suretiyle tüketimini azalttığı ve endojen antioksidan sistemi güçlendirdiği göstermektedir.

7. TARTIŞMA ve SONUÇ

İnsanoğlu eski zamanlardan beri doğal ürünlerden farklı yöntemlerle faydalanmaktadır. Bu doğal ürünlerden biride arı ürünleridir. Arı ürünleri eski zamanlardan beri önemli besin maddesi olarak ve tedavi amaçlı kullanılmıştır. Bu ürünler coğrafi olarak farklı bölgelerde yetişirler ve bunun için farklı içeriğe sahip olabilirler. Yani her bölgenin kendine has arı ürünleri üretilmektedir. Günümüzde bu arı ürünleri hem tedavi amaçlı ve hem gıda olarak tüketilir. Bu ürünlerden biri arı sütüdür (4-7).

Tarihi kayıtlara göre arı sütünün insanlar tarafından ilk kullanımı Antik Yunan dönemine dayanmakta olup Olympus Tanrılarına sunulan ölümsüzlük yiyeceği içerisinde kullandığı belirtilmiştir. Aynı dönemde tarihçiler insanların bal petekleri içerisinde bal, larva, polen ve arı sütü varken kıyıp taze olarak tükettiğini rapor etmişlerdir. Aristo arı sütünün arı topluluğundaki fonksiyonunu ve kraliçe arıya etkisini ilk keşfeden kişi olup, fiziksel gücü ve düşünme kapasitesini artırmak için özellikle okulunda kahvaltıda bal ve arı sütü karışımını hazırlattığı, Antik Mısırdaki Kleopatra'nın kozmetik olarak arı sütü kullandığı ve kendisinin güzelliğini arı sütüne borçlu olduğunu, firavun'un genellikle arı sütü tükettiği ve aynı dönemlerde arı sütünün gücün sembolü olduğunu bildirilmiştir (60).

Arı sütü antioksidan, nörotropik, insülin benzeri, kan düzenleyici, antitümör, antibiyotik, antialerjik, anti-inflammatuar aktivite ve yara iyileştirici gibi birçok etkiye sahiptir. Arı sütü farklı fizyolojik ve farmakolojik aktivitelere sahip birçok özellik barındırır. Birçok hastalığın oluşumunda rol alan oksidan molekülleri yok ederek, antioksidan enzimlerin aktivitelerini uyararak, intrasellüler oksidatif stresi azaltarak, nitrik oksit ve peroksit radikallerini de direkt olarak temizleyerek etkili olmaktadır. Ayrıca endojen savunma sistemlerini harekete geçirerek ve farklı fizyolojik süreçleri düzenleyerek dolaylı koruma sağlayabilir (60).

Bizde bu çalışmada arı sütü ekstratlarının etkisini eritrositler üzerinde inceledik ve arı sütüne farklı konsantrasyonlarda t-BHP ilave ederek eritrositler üzerindeki etkisini gözlemledik. Çalışmamızdan elde edilen sonuçlara göre eritrosit paketlerinde arı sütü ekstrakt grubunun MDA seviyesi, negatif kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı derecede düşük bulundu. MDA seviyesinde anlamlı fark olması bu sonucu ele verir ki,

oksidatif hasarı önlemek için verilen 50000 µg/mL'lik konsantrasyonda kullanılan arı sütü ekstraktlarının antioksidan etki göstererek reaktif oksijen radikallerini temizlemesi sonuç, lipid peroksidasyonunu önleyici yönde etki ettiğini göstermektedir. Buna benzer çalışmalara göre arı sütünün güçlü bir antioksidan aktiviteye sahip olduğu doğrulanmıştır.

Meltem Uçar'ın yaptığı bir çalışmada (2017), arı sütü insan sağlığına pozitif etkileri olan bir arı ürünüdür. Fonksiyonel Bir besin maddesi olarak arı sütü bileşenlerinin insan ve hayvanlarda büyüme, yaşlanma ve üreme üzerindeki etkisini belirtmişti (61).

Zeyneb Aslan'ın yaptığı bir çalışmada (2014), ratlarda etilen glikolün oluşturulduğu ürolitiazise karşı arı sütünün antiürolitiatik etkileri incelenmiştir. Elde edilen sonuçlara göre arı sütünün anioksidatif sistemi desteklediği, lipid peroksidasyoun azaltıcı etki ve en önemli göstergesi olan MDA düzeyini tüm koruyucu ve tedavi gruplarında önemli şekilde azaltmış olması, oksidatif hasara karşı arı sütünün etkili olabileceğini ortaya koymuştur. Dikkat çekici bir özellik bu ki arı sütünün etkili olabileceğini ortaya koymuştur (62).

Azab ve arkadaşları (2011) yapılan bir çalışmada, ratları gama ışınlarına maruz bıraktıktan sonra doku hasarı ve oksidatif stresin değerleri oluşturuldu, daha sonra gama ışınları maruz kalan ratları arı sütü ile modüle edildiğinde sadece arı sütü uygulanan gruplarda böbrek NO değerleri önemli derecede düşük olmuştur. Gama ışınlarından sonra arı sütü verilmiş olan grubların NO değerleri de sadece ışınlanmış ratların NO değerlerinden düşük bulunmuştur (63).

El-Nekeety ve arkadaşları (2010) yapılan bir çalışmada sıçanlara oksidatif stres ile hasar verdikten sonra bu sıçanları tedavi ve kontrol grupları olarak arı sütü ile 3 hafta boyunca 100 mg/kg veya 150 mg/kg oral şekilde verdikten sonra MDA seviyesinde anlamlı bir şekilde düzelme gözlenmiştir (64).

Kanbur ve arkadaşları (2010) farklı çalışmada farklı oksidatif stres ajanları hasar verici olarak kullandılar ve arı sütünün etkisini incelediler. Bu çalışmalarda birinde sodyum florid ve diğerinde ise parasetamol ile oksidatif stres oluşturdular.bu 3 çalışmada da arı sütü ilave edilen gruplarda MDA değeri diğer gruplara göre anlamlı derecede düşük bulmuştur (65).

Arı sütü normal fizyolojik Şartlarda ve hem de oksidatif stres Şartlarda antioksidatif enzim aktivitesini artırdığını ispatlamaktadır. Enzim aktivitelerindeki artış arı sütün konsantrasyonu arttıkça daha belirgin hale gelmektedir. Literatürde arı sütü yararlı rolü bazı çalışmalarda görülse de t-BHP ile oksidatif stres, gerçekleştirildiğinde ve arı sütün koruyucu etkisine dair bir çalışmaya rastlanıl mıştır. Yapılan bu çalışmada ise t-BHP etkisine karşı arı sütünün koruyucu ve tedavi edici etkisi araştırılmıştır.

Sonuç olarak bu çalışmada ilk defa arı sütü ekstraktının in vitro Şartlarda, insan eritrosit hücrelerinde t-BHP ile indüklenmiş oksidatif hasara karşı koruyucu etkinliği ortaya konuldu. Elde edilen bulgular in vitro ve in vivo çalışmaların öncüsü niteliğindedir. Bu çalışmalardan elde edilecek olumlu verilerle arı sütü alternatif, tamamlayıcı doğal bir ürün olarak kullanılabileceğin öngörülmektedir.

8. KAYNAKLAR

1. Agüero MB, Svetaz L, Sanchez M (2011). Argentinean Andean propolis associated with the medicinal plant *Larrea nitida* Cav. HPLC–MS and GC–MS characterization and antifungal activity. *Food Chem Toxicol* 49: 1970-8.
2. Osés SM, Pascual-Maté A, Fernández-Muiño MA (2016). Bioactive properties of honey with propolis. *Food Chem* 196: 1215-23.
3. Graikou K, Kapeta S, Aligiannis N (2011). Chemical analysis of Greek pollen-Antioxidant, antimicrobial and proteasome activation properties. *Chem Cent J* 5(1): 33.
4. Viuda-Martos M, Ruiz-Navajas Y, Fernandez-Lopez J (2008). Functional properties of honey, propolis, and royal jelly. *J Food Sci* 73: R117-24.
5. Kahkonen MP, Hopia A, Vuorela HJ, Rauha JP (1999). Antioxidant Activity of Plant Extracts Containing Phenolic Compounds. *Agric Food Chem* 47: 3954-3962.
6. Balch, Phyllis A. (1997). Prescription for nutritional healing. Part One: Elements Of Health. Page: 59, Second Edition. Printed in United States Of America.
7. Sabatini AG, Marazzan GL, Caboni MF, Bogdanov S, de Almeida-Muradian LB (2009). Quality and standardisation of Royal Jelly. *Journal of ApiProduct and ApiMedical Science* 1: 1-6.
8. Valko M, Rhodes CJ, Moncol J (2006). Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem Biol Interact* 160: 1-40.
9. Valko M, Leibfritz D, Moncol J (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem cell Biol* 39: 44-84.
10. Mercan U (2004). Toksikolojide serbest radikallerin önemi. *YYU Vet Fak Derg* 15(1-2): 91-6.
11. Demir S (2010). Propolis ekstraktlarının fibroblast hücre serilerinde H₂O₂ ile uyarılmış DNA hasarı (genotoksisite) üzerine etkisinin comet assay yöntemi ile araştırılması. Yüksek Lisans Tezi, Karadeniz Teknik Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Trabzon.

12. Blumberg J (2004). Use of biomarkers of oxidative stress in research studies. *J Nutr* 134: 3188S-3189S.
13. Sandhar HK, Kumar B, Prasher S. (2011). A review of phytochemistry and pharmacology of flavonoids. *IPS* 1(1): 25-41.
14. Gao K, Henning SM, Niu Y (2006). The citrus flavonoid naringenin stimulates DNA repair in prostate cancer cells. *J Nutr Biochem* 17: 89-95.
15. Krukowski DW, Comar SR, Claro LM (2009). Effect of vitamin C, deferoxamine, quercetin and rutin against tert-butyl hydroperoxide oxidative damage in human erythrocytes. *Hematology* 14(3): 168-72.
16. Lima CF, Fernandes-Ferreira M, Pereira-Wilson C (2006). Phenolic compounds protect HepG2 cells from oxidative damage: Relevance of glutathione levels. *Life Sci* 79: 2056-68.
17. Smart RC, Hodgson E (2008). *Molecular and biochemical toxicology*. Wiley fourth edition, p. 342-3.
18. Bienert GP, Schjoerring JK, Jahn TP (2006). Membrane transport of hydrogen peroxide. *Biochim Biophys Acta* 1758: 994-1003.
19. Kariya S, Sawada K, Kobayashi T (2009). Combination treatment of hydrogen peroxide and X-rays induces apoptosis in human prostate cancer PC-3 cells. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 75: 449-54.
20. Grisham MB (2013). Methods to detect hydrogen peroxide in living cells: Possibilities and pitfalls. *Com Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 165: 429-38.
21. Neill S, Desikan R, Hancock J (2002). Hydrogen peroxide signalling. *Curr Opin Plant Biol* 5: 388-95.
22. Myhre O, Andersen JM, Aarnes H (2003). Evaluation of the probes 2', 7'-dichlorofluorescein diacetate, luminol, and lucigenin as indicators of reactive species formation. *Biochem Pharmacol* 65: 1575-82.
23. Maria LU, Priscilla MC (2003). Oxidative stress, exercise and antioxidant supplementation. *Toxicology* 189: 41-54.

24. Erel O (2004). A novel automated method to measure total antioxidant response against free radical reactions. Clin Biochem 37(2): 112-9.
25. Erel O (2005). A new automated colorimetric method for measuring total oxidant status. Clin Biochem 38: 1103-11.
26. Valente MJ, Baltazar AF, Henrique R (2011). Biological activities of Portuguese propolis: protection against free radical-induced erythrocyte damage and inhibition of human renal cancer cell growth in vitro. Food Chem Toxicol 49: 86-92.
27. Baydar T, Girgin G, Tuylu AO (2008). Ex vivo effects of Turkish propolis extracts on erythrocyte superoxide dismutase and catalase activities. Mellifera 8-15: 19-25.
28. Anonim 2016. (<http://www.fao.org/docrep/w0076E/w0076e16.htm>). erişim tarihi, 13.07.2017
29. Piana L, Manzi L, Krell R. Royal Jelly. <http://www.fao.org/docrep/w0076E/w0076e16.htm>.
30. Lecker G, Capella P, Conte LS, Ruinji F, Giordani G (1981). Components of royal jelly. I. Identification of organic acids. Lipids 16: 912-919.
31. Takenaka T (1982). Chemical composition of royal jelly. Honeybee Science 3: 69-74.
32. Lannuzzi J (1990). Royal Jelly Mystery Food. American Bee Journal 8: 532-534.
33. Pavel CI, Marghita LA, Bobi O, Dezmirean DS, gapcaliu A, Radoi I, Mada MN (2011). Biological Activities of Royal Jelly Scientific Papers Animal Science and Biotechnologies, 44 (2): 108-118.
34. Kattanoglu O, Tanyeli A (1977). The use of royal jelly during treatment of childhood malignancies. In bee products: properties, applications, and apitherapy. Edited by Avshalom Mizrahi and Yaacov Lensky. Plenum pres New York PP.197-184.
35. Yamada K, Ikeda I, Maeda M, Shirahata S, Murakami H (1990). Effect of immunoglobulin production stimulating factors in foodstuffs on immunoglobulin production of human Iymphocytes. Agric Biol Chem 54:1087-9.

36. Nagai T, Sakai M, Inoue R, Inoue H, Suzuki N (2001). Antioxidant activities of some commercially honeys, royal jelly and propolis. *Food. Chem.*, 75: 237-240.
37. Betteridge DJ (2000). What is oxidative stress? *Metabolism* 49: 3-8.
38. Aliyazıcıoğlu Y, Değer O, Ovalı E, Barlak Y, Hosver I, Tekelioglu Y, Karahan SC (2005). Effects of turkish pollen and propolis extracts on respiratory burst for K- 562 cell lines. *International Immuno* 5: 1652-1657.
39. Eroğlu Doğan E (2008). Bazı flavonoidlerin drosophila melanogaster’de antigenotoksik aktivitesi ve antioksidan etkilerinin araştırılması. Doktora Tezi, İnönü Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Malatya.
40. Halliwell B (1994). free radicals and antioxidants: A personal view. *Nutrition Reviews*, 52:253-265.
41. Halliwell B (1991). Reactive oxygen species in living systems: Source, biochemistry and role in human disease. *American Journal of Medicine*, 91: 14-22.
42. Southorn P, Powis G (1988). Free radical in medicine. I.Chemical nature and biological reactions. *Mayo Clinic Proceedings* 63(3): 381-388.
43. Özden S (2006). Bazı pestisidlerin oksidatif stres oluşturma potansiyellerinin ve antioksidan sistemler üzerine etkilerinin sıçanlarda araştırılması, İstanbul Üniversitesi. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, İstanbul.
44. Brent JA, Rumack HH (1993). Role of free radicals in toxic hepatic injury I.free radical chemistry. *Journal of Clinical Toxicology* 49(4): 481-493.
45. Fantel AG (1996). Reactive oxygen species in developmental toxicity: review and hypothesis. *Teratology* 53: 196-217.
46. Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol* 39: 44-84.

47. Akyol MA (2007). Tavşan modelinde laparoskopik iskemik prekondisyon manevrasının oksidatif stres üzerine etkisinin araştırılması. Afyon Kocatepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Uzmanlık Tezi, Afyonkarahisar.
48. Dinçer Y, Akçay T (2000). DNA Hasarı Türk Biyokimya Dergisi 25(2): 73-79.
49. Pinnell SR (2003). Cutaneous photodamage, oxidative stress and topical antioxidant protection. J Am Acad Dermatol 48:1-19.
50. Sorg, O (2004). Oxidative stress: A theoretical model or a biological reality? Comptes Rendus Biologies, 327: 649-662.
51. Meral R, Doğan IS, Kanberoğlu G (2012). Fonksiyonel gıda bileşeni olarak antioksidanlar. Iğdır Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi 2: 45-50.
52. Harris ED (1992). Regulation of antioxidant enzymes. FASEB J 6: 2675-2683.
53. Goyal MM, Basak A (2010). Human catalase: looking for complete identity. Protein Cell 1: 888-897.
54. Akkuş İ (1995). Serbest Radikal ve Fizyolojik Etkileri. Mimoza Yayınları, Konya 1-128.
55. Lardinois OM, Mestdagh MM, Rouxhet PG (1996). Reversible inhibition and irreversible inactivation of catalase in presence of hydrogen peroxide. Biochim Biophys Acta 1295: 222-238.
56. Halliwell B (1996). Cellular stress and protection mechanisms. Biochemical Society Transactions. 24: 1023-1027.
57. Sun Y, Oberley LW, Li Y (1988). A simple method for clinical assay of superoxide dismutase. Clin Chem 34: 497-500.
58. Goth L (1991). A simple method for determination of serum catalase activity and revision of reference range. Clin Chem Acta 196: 143-151.
59. Erel O (2004). A novel automated direct measurement method for total antioxidant capacity using a new generation, more stable ABTS radical cation. Clin Biochem 37: 277-285.
60. Fratini F, Cilia G, Mancini S, Felicioli A (2016). Royal Jelly: An ancient remedy with remarkable antibacterial properties. Microbiological Research, 192: 130-141.

61. Uçar M (2018). The Effect Of Royal Jelly On Development, Aging And Reproduction Health. *Gümüşhane University Journal Of Health Sciences* 7(1): 193-202.
62. Aslan Z (2014). Investigation of Antiurolithiatic Effects Of Royal Jelly On Ethylene Glycol Induced Urolithiasis In Rats. *Afyon Kocatepe University*
63. Azab KS, Bashandy M, Salem M, Ahmed O, Tawfik Z, Helal H (2011). Royal jelly modulates oxidative stress and tissue injury in gamma irradiated male Wister Albino rats. *North American Journal of Medical Sciences*, 3(6): 268-276.
64. El-Nekeety AA, El-Kholy W, Abbas NF, Ebaid A, Amra AH, Abdel-Wahhab MA (2007). Efficacy of royal jelly against the oxidative stress of fumonisin in rats. *Toxicon*, 50: 256-269.
65. Eraslan G, Kanbur M, Silici S (2007). Evaluation of propolis effects on some biochemical parameters in rats treated with sodium fluoride. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 88: 273–283.

9. EKLER

9.1. Ek 1. Deneyde Kullanılacak t-BHP Konsantrasyonunun Belirlenmesi

	MDA (nmol/g Hb) (X $\pm$ SD)
Kontrol * (0 mM t-BHP)	4 $\pm$ 0.9
250 μ M t-BHP	14 $\pm$ 1.6
500 μ M t-BHP	201 $\pm$ 2.1
750 μ M t-BHP	272 $\pm$ 3.6
1000 μ M t-BHP	304 $\pm$ 16.7
2000 μ M t-BHP	101 $\pm$ 6.9

*Negatif kontrol

9.2. Ek 2. Deneyde kullanılacak Arı Sütü Konsantrasyonunun Belirlenmesi

	MDA (nmol/gHb) (X $\pm$ SD)
Kontrol	4 $\pm$ 0.9
35000 μ g/Ml Arı Sütü	127.65 $\pm$ 0.85
40000 μ g/Ml Arı Sütü	173.91 $\pm$ 0.37
45000 μ g/Ml Arı Sütü	197.8 $\pm$ 0.67
50000 μ g/Ml Arı Sütü	222.2 $\pm$ 0.56
Negatif kontrol* (t-BHP)	272.27 $\pm$ 3.6

*Negatif Kontrol: 750 μ M t-BHP

9.3. Ek 3. Gönüllü Onam Formu

	ASGARİ BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU	
---	---	---

Ben Karadeniz Teknik Üniversitesi Tıp Fakültesinde yürütülmekte olan “Çeşitli arı ürün ve bitki ekstraktlarının H₂O₂ ve/veya t-BHP ile uyarılmış oksidatif hasara karşı koruyucu etkilerinin incelenmesi” adlı araştırmaya denek olarak katılmayı gönüllülükle kabul ediyorum.

Bana, Arş. Gör. Kübra AKBULUT tarafından doğal antioksidan maddelerin vücuttaki antioksidan sisteme olan katkısı ve önemi anlatıldı. Bu çalışmada geleneksel tedavi amaçlı olarak kullanılan doğal ürünlerin (propolis, polen, arı sütü ve çeşitli bitkilerin) oksidan hasara karşı koruyuculuğunun araştırılacağı ve beklenen sonuçların alınması halinde bu doğal ürünlerin kullanımının oksidatif hasarla ilişkili hastalıkların tedavisinde ve/veya önlenmesinde kullanılabilirliğinin önünün açılacağı vurgulandı.

Yapılacak olan bu çalışma için bir defaya mahsus bir gecelik açlık sonrasında kan vereceğim, farklı olarak herhangi bir işlem uygulanmayacağı ve daha sonra bu kanlarda, konu ile ilgili biyokimyasal analizler yapılacağı anlatıldı.

Kan alma işlemi esnasında gözlenebilecek istenmeyen etkiler arasında bayılma, ağrı ve/veya morarma gibi olası bir soruna karşı gerekli tedbirlerin alınacağı, doktoruma haber vererek araştırmadan çekilme hakkım olduğumu ve kendimle ilgili bir olumsuzluk hissettiğimde Arş. Gör. Kübra AKBULUT’ a (05399877262) nolu telefondan 24 saat ulaşabileceğimi biliyorum.

Araştırmanın 15 kişiyi kapsayan bir çalışma olduğunu biliyorum.

Araştırma sonuçlarının, eğitim ya da bilimsel amaçlarla kullanılması sırasında benim mahremiyetime saygı gösterileceğine inanıyorum. Gönüllü olarak katılmaya karar verdiğim araştırmanın ekonomik sorumluluğunun bana ait olmadığını biliyorum.

Bu açıklamaları anladım ve gönüllülükle bu onamı verdim. Söz konusu araştırmaya, hiçbir baskı ve zorlama olmaksızın kendi rızamla katılmayı kabul ediyorum.

Tanık / Vekil :	Hasta/Denegin :
Adı Soyadı :	Adı Soyadı :
İmzası :	İmzası :
Telefonu :	Adresi :
	Telefon :

Aydınlatan Hekim Adı Soyadı ve İmzası:

10. ETİK KURUL ONAYI



T.C.
KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ REKTÖRLÜĞÜ
KTÜ TIP FAKÜLTESİ
BİLİMSEL ARAŞTIRMALAR ETİK KURUL
BAŞKANLIĞI

Sayı : 24237859-673
Konu: Etik kurul onay belgesi

01/12/2016

Sayın; Prof.Dr.Orhan DEĞER
Tıbbi Biyokimya ABD.

"Çeşitli Arı Ürün ve Bitki Ekstraktlarının H_2O_2 ve/veya t-BHP ile Uyarılmış Oksidatif Hasara Karşı Koruyucu Etkilerinin İncelenmesi" başlıklı etik kurul 2016/163 no.lu çalışması raportör ve etik kurul görüşleri doğrultusunda; tıbbi etik açıdan uygun olduğuna karar verilmiştir.

Bilginizi ve gereğini rica ederim.

Prof.Dr.Faruk AYDIN
Etik kurul Başkanı

11. ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Soyadı, Adı	ASGHARI, Ali
Uyruğu	İran
Doğum tarihi ve yeri	16.04.1988
Medeni hali	
Telefon	
Faks	
E-Posta	aliasghari.edu@gmail.com
Yazışma adresi	KTÜ SABE, Tıbbi Biyokimya AD, Trabzon

EĞİTİM BİLGİLERİ

Derece	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mezuniyet Yılı
Yüksek Lisans	KTÜ Tıbbi Biyokimya	(2018)
Lisans	Urmia Payame Noor	(2011)
Lise	Urmia İbnisina Lisesi	(2006)

YABANCI DİL

İngilizce, Farsça