



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

**SULU TÜRK POLEN EKSTRAKTININ
t-BHP İLE UYARILMIŞ OKSİDATİF HASARA
KARŞI KORUYUCU ETKİLERİNİN
İNCELENMESİ**

Katip KORKMAZ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Prof. Dr. Orhan DEĞER

TRABZON-2017



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

**SULU TÜRK POLEN EKSTRAKTININ
t-BHP İLE UYARILMIŞ OKSİDATİF HASARA
KARŞI KORUYUCU ETKİLERİNİN
İNCELENMESİ**

Katip KORKMAZ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Prof. Dr. Orhan DEĞER

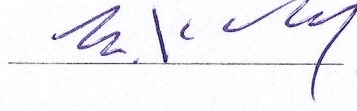
TRABZON – 2017

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 Katip KORKMAZ'ın hazırladığı "Sulu Türk Polen Ekstraktının 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.

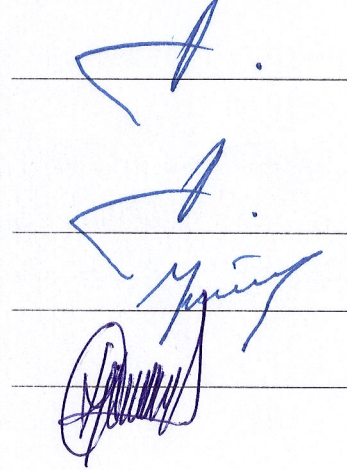
Danışman Prof. Dr. Orhan DEĞER

Yüksek Lisans Sınavı Jüri Üyeleri

Prof. Dr. Orhan DEĞER

Prof. Dr. Yüksel ALİYAZICIOĞLU

Doç. Dr. Hüseyin Avni UYDU



Tarih: 08/06/2017

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

Prof. Dr. Ali Osman KILIÇ
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

BEYAN

Bu tez çalışmasının Karadeniz Teknik Üniversitesi 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 ve kaynakların kaynaklar listesinde yer aldığını, tezin çalışılması ve yazımı aşamalarında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

08/06/2017

Katip KORKMAZ

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim sürecinde bilimsel, akademik ve insani yönden daima örnek aldığım, tez çalışmamın gerçekleşmesinde 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. Süleyman Caner KARAHAN, Prof. Dr. Yüksel ALİYAZICIOĞLU, Prof. Dr. Ahmet ALVER, Prof. Dr. Birgül VANİZOR KURAL, Doç. Dr. Ahmet MENTEŞE ve Yrd. Doç. Dr. Fulya BALABAN YÜCESAN'a,

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

Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı'ndaki Arş. Gör. Kübra AKBULUT ÇAKIROĞLU, Dr. Tuğba Nigar ÇAKIROĞLU, Ertuğrul YİĞİT, Akın BODUR, Arş. Gör. Serap ÖZER YAMAN, Ali ASGHARİ, Pınar AYGÜN, Mehmet ERDEM, Dr. Mehmet Akif BİLDİRİCİ, Esat KARAL ve Yunus Emre ÖNAL olmak üzere tüm lisansüstü öğrenci arkadaşlarıma,

Bu günlere gelmemde hiçbir zaman desteğini esirgemeyen başta ailem olmak üzere tüm sevdiklerime sonsuz teşekkürler ederim.

Katip KORKMAZ

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
KABUL ve ONAY	
BEYAN	
TEŞEKKÜR	
TABLolar DİZİNİ	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ	ix
KISALTMALAR, SİMGELER ve FORMÜLLER DİZİNİ	x
1. ÖZET	1
2. SUMMARY	2
3. GİRİŞ ve AMAÇ	3
4. GENEL BİLGİLER	5
4.1. Polen	5
4.1.1. Polenin Tarihçesi	5
4.1.2. Polenin Fiziksel Özellikleri	6
4.1.3. Polenin Kimyasal Özellikleri ve İçeriği	7
4.1.3.1. Polendeki Fenolik Bileşikler	9
4.1.4. Polenin Biyolojik Etkileri	12
4.1.4.1. Antioksidan etkiler	12
4.1.4.2. Anti-inflamatuvar etkiler	13
4.1.4.3. Antikarsinojen etkiler	13
4.1.4.4. Antibakteriyel ve antifungal etkiler	14
4.1.4.5. Antiaterosklerotik etkiler	15
4.1.4.6. Antianemik Etkiler	15
4.1.4.7. Besinsel etkiler	15
4.2. Serbest Radikaller	16
4.2.1. Serbest Radikallerin Oluşumu	17
4.2.2. Serbest Radikal Türleri	18
4.2.2.1. Süperoksit Radikali	18
4.2.2.2. Tersiyer Bütil Hidroperoksit	18
4.2.2.3. Hidroksil Radikalleri	19
4.2.2.4. Hidrojen Peroksit	19

4.2.3. Serbest Radikallerin Etkileri	20
4.3. Oksidatif Stres	20
4.3.1. Antioksidan etki mekanizmaları	21
4.3.1.1. Süpürücü (<i>scavenging</i>) etki	21
4.3.1.2. Bastırıcı (<i>quencher</i>) etki	21
4.3.1.3. Onarıcı (<i>repair</i>) etki	21
4.3.1.4. Zincir kırıcı (<i>Chain breaking</i>) etki	21
4.3.2. Antioksidan Enzimler	22
4.3.2.1. Süperoksit Dismutaz	22
4.3.2.2. Katalaz	22
4.3.2.3. Glutasyon Peroksidaz	22
5. GEREÇ ve YÖNTEM	23
5.1. Gereç	23
5.1.1. Kullanılan Cihazlar, Alet ve Malzemeler	23
5.1.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Çözeltiler	24
5.2. Yöntem	25
5.2.1. Sulu Türk Polen Ekstraktının Hazırlanması	25
5.2.2. Eritrosit Hücre İzolasyonu	25
5.2.3. Tersiyer Butil Hidroperoksit Hazırlanması	25
5.2.4. Kuersetin Hazırlanması	26
5.2.5. Deneyde Kullanılacak t-BHP Konsantrasyonunun Belirlenmesi	26
5.2.6. Deneyde Kullanılacak Sulu Türk Polen Konsantrasyonunun Belirlenmesi	26
5.2.7. Deneyde Kullanılacak Kuersetin Konsantrasyonunun Belirlenmesi	26
5.2.8. Deney Grupları	27
5.2.9. Eritrosit Süperoksit Dismutaz Aktivitesi Tayini	27
5.2.10. Eritrosit Katalaz Aktivitesi Tayini	30
5.2.11. Eritrosit Malondialdehit Seviyesinin Belirlenmesi	31
5.2.12. Eritrosit Toplam Oksidan Kapasite Seviyesinin Belirlenmesi	32
5.2.13. Eritrosit Toplam Antioksidan Kapasite Seviyesinin Belirlenmesi	33
5.3. İstatistiksel Analizler	33

6. BULGULAR	34
6.1. Eritrosit Toplam Oksidan Kapasite Seviyeleri	34
6.2. Eritrosit Toplam Antioksidan Kapasite Seviyeleri	35
6.3. Eritrosit Malondialdehit Seviyeleri	36
6.4. Eritrosit Süperoksit Dismutaz Aktivitesi	37
6.5. Eritrosit Katalaz Aktivitesi	38
7. TARTIŞMA ve SONUÇ	40
8. KAYNAKLAR	45
9. EKLER	55
9.1. EK 1 Deneyde kullanılacak t-BHP konsantrasyonunun belirlenmesi	55
9.2. EK 2 Deneyde kullanılacak polen konsantrasyonunun belirlenmesi	56
9.2. EK 3 Deneyde kullanılacak kuersetin konsantrasyonunun belirlenmesi	57
9.3. EK 4 Gönüllü onam formu	58
10. ETİK KURUL ONAYI	59
11.ÖZGEÇMİŞ	60

TABLOLAR DİZİNİ

Tablo		Sayfa
Tablo 1.	Polenin genel bileşimi	8
Tablo 2.	Serbest reaktif oksijen türleri	17
Tablo 3.	Serbest radikal kaynakları	18
Tablo 4.	Çalışmada kullanılan cihazlar, laboratuvar gereçleri ve malzemeler	23
Tablo 5.	Çalışmada kullanılan kimyasal maddeler ve çözeltiler	24
Tablo 6.	Deney grupları	27
Tablo 7.	Süperoksit Dismutaz aktivitesi ölçümü	29
Tablo 8.	Katalaz aktivitesi ölçümü ve yapılan işlemler	30
Tablo 9.	Eritrosit Malondialdehit ölçümü ve yapılan işlemler	31
Tablo 10.	Eritrosit Toplam Oksidan Kapasite seviyeleri	34
Tablo 11.	Eritrosit Toplam Antioksidan Kapasite seviyeleri	35
Tablo 12.	Eritrosit Malondialdehit sonuçları	36
Tablo 13.	Eritrosit Süperoksit Dismutaz aktivitesi	37
Tablo 14.	Eritrosit Katalaz aktivitesi	38
Tablo 15.	Ölçülen Oksidatif Stres Biyobelirteçlerinin Korelasyon Tablosu	39

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil	Sayfa
Şekil 1. Arının arka bacaklarındaki polenler ve farklı renkteki polen pelletler	7
Şekil 2. Fenolik asitlerin temel yapıları	9
Şekil 3. Flavonoidlerin temel yapısı	10
Şekil 4. Temel flavonoidlerin yapısı	11
Şekil 5. Reaktif oksijen türlerinin oluşumu	17
Şekil 6. t-BHP'nin açık kimyasal formülü	19
Şekil 7. MDA kimyasal yapısı	21
Şekil 8. Standart SOD aktivitesi ve % inhibisyon grafiği	29
Şekil 9. Log (Standart SOD aktivitesi) ve % inhibisyon grafiği	30
Şekil 10. MDA standart absorbans grafiği	32
Şekil 11. Eritrosit TOK seviyeleri	34
Şekil 12. Eritrosit TAK seviyeleri	35
Şekil 13. Eritrosit MDA seviyeleri	36
Şekil 14. Eritrosit SOD seviyeleri	37
Şekil 15. Eritrosit CAT seviyeleri	38

KISALTMALAR, SİMGELER ve FORMÜLLER DİZİNİ

Kısaltmalar

ATP	Adenozintrifosfat
ABTS	2, 2'-Azino-Bis-3-Etilbenzotilazolin-6-Sülfonik asit
BCL-2	Brassica Kampestris Linn
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	Prostaglandin-3
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

α	Alfa
μ	Mikro
g	RCF (Rölatif Santrifüj Güç)

Formüller

CuCl_2	Bakır (II) Klorür
COOH	Karboksil
H_2O_2	Hidrojen Peroksit
KH_2PO_4	Potasyum Dihidrojen Fosfat
Na_2CO_3	Sodyum Karbonat
Na_2HPO_4	Disodyum Hidrojen Fosfat
NaHCO_3	Sodyum Bikarbonat
NaOH	Sodyum Hidroksit

1. ÖZET

Sulu Türk Polen Ekstraktının t-BHP ile Uyarılmış Oksidatif Hasara Karşı Koruyucu Etkilerinin İncelenmesi

Polen çiçekli bitkilerden arılar tarafından toplanarak nektar ve arı salgıları ile karıştırılıp üretilen, fitokimyasallar bakımından zengin içeriğe sahip toz benzeri doğal bir arı ürünüdür. Bu doğal ürünün içeriğinde lipidler, karbohidratlar, proteinler, karotenoidler ve polifenoller gibi bileşikler bulunmaktadır. Polenin bileşimi toplandığı bölgenin iklimine ve coğrafik özelliklerine bağlı olarak farklılık göstermektedir. Eski çağlardan beri insanoğlu poleni soğuk algınlığı, ülser ve anemi gibi pek çok hastalığın tedavisinde kullanmakta olup bu ürününün antioksidan özelliği içeriğindeki flavonoidlerden kaynaklanmaktadır. Araştırmalar sonucu elde edilmesi kolay ve akut oksidatif hasar çalışmaları için model hücre olarak eritrositler seçildi. Tersiyer bütül hidroperoksit (t-BHP) insan eritrosit hücrelerinde oksidatif hasara neden olan organik bir peroksittir. Sağlıklı bireylerden etik kurul onayı ile alınan kanlardan eritrosit hücreleri izole edildi. Elde edilen eritrosit paketi kontrol, sulu Türk polen ekstraktı, pozitif kontrol ve negatif kontrol olarak dört gruba ayrıldı. Eritrosit paketlerine öncelikle ekstrakt muamelesi ve ardından t-BHP muamelesi ile birlikte negatif kontrolde oluşacak olan hasara karşı sulu Türk polenin koruyucu etkileri lipid peroksidasyonunun son ürünü olan malondialdehit (MDA), toplam oksidan kapasite (TOK), toplam antioksidan kapasite (TAK) ve süperoksit dismutaz (SOD) ve katalaz (CAT) enzim aktivitelerine göre değerlendirildi. Sulu Türk polen ekstrakt grubunda negatif kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı fark bulundu ($p < 0.05$). Sonuç olarak, ilk defa sulu Türk polen ekstraktının *in vitro* şartlarda insan eritrosit hücrelerinde t-BHP ile uyarılmış oksidatif hasara karşı koruyucu etkiye sahip olabileceği belirtilmiştir. Elde edilen veriler çeşitli *in vitro* ve *in vivo* çalışmaların öncüsü niteliğindedir. Bu çalışmadan polenin alternatif, gıda takviyesi olarak kullanılması öngörülmektedir.

Anahtar Sözcükler: Antioksidan, Eritrosit, Oksidatif Stres, Polen, t-BHP

2. ABSTRACT

Investigation of Protective Effects of Water Extracts of Turkish Pollen Against Oxidative Damage Induced by t-BHP

Pollen, collected by bees from flowering plants by mixing with nectar and bee secretions is a natural bee product which rich in phytochemicals. This natural product contains compounds such as lipids, carbohydrates, proteins, carotenoids and polyphenols. The pollen composition differs depending on the climate and geographical characteristics of the area in which it is collected. Since ancient times, mankind has been used in the treatment of many diseases such as pollen colds, ulcers and anemia, and it is known that the antioxidant properties of this product originate from the flavonoids in the contents. As a result of the investigations, erythrocytes were selected as model cells for easy and acute oxidative damage studies. Tert-butyl hydroperoxide (t-BHP) is an organic peroxide that causes oxidative damage in human erythrocyte cells. The erythrocyte cells were isolated from the blood obtained by the ethical committee approval from health individuals. The obtained erythrocyte package was divided into four groups as control, aqueous Turkish pollen extract, positive control and negative control group. Red blood cell package was made first extraction treatment and then t-BHP treatment which will occur in the negative control with damage to aqueous of Turkish pollen extracts protective effects of lipid peroxidation of the final product as malondialdehyde (MDA), total oxidant capacity (TOC), total antioxidant capacity (TAC) and superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) enzyme activities. There was a statistically significant difference in the aqueous of Turkish pollen extract group and the negative control ($p < 0.05$). As a result, it has been stated for the first time that aqueous Turkish pollen 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 will be used as an alternative food supplement without this work.

Key Words: Antioxidants, Erythrocyte, Oxidative Stress, Pollen, t-BHP

3.GİRİŞ ve AMAÇ

Arı ürünleri insanlar tarafından eski çağlardan beri önemli bir besin maddesi ve ilaç olarak kullanılmaktadır. Bu ürünler üretildiği bölgenin coğrafik yapısı ve bitkisel özelliklerine bağlı olarak değişiklik göstermektedir. Arı ürünleri birçok hastalığın ilerlemesini durdurmada, ağrıların azaltılmasında ve hastalıkların tedavisinde kullanılmıştır. Günümüzde kullanılan sentetik ilaçların olumsuz etkileri insanları yeni arayışlara itmiştir ve alternatif tamamlayıcı gıdalar ortaya çıkmıştır. Tamamlayıcı gıdalar arasında popüler olan ve diyetle alınan arı ürünlerinin içerdikleri fizyolojik aktif bileşenler nedeniyle hastalıklara karşı etkileri üzerine yapılan araştırmaların sayısı sürekli artmaktadır (1, 2).

Bu fonksiyonel arı ürünleri arasında yaygın olarak kullanılanlardan biri de polendir. Polen, çiçekli bitkilerden arılar tarafından toplanıp nektar ve arı salgıları ile karıştırılarak üretilen, fitokimyasallar bakımından zengin içeriğe sahip toz benzeri doğal bir arı ürünüdür. Polen arıların büyüyüp gelişimlerini tamamlamalarında ve salgı bezlerinin gelişmesinde gerekli olan başlıca protein kaynaklarından biridir. Polen yokluğunda arı kolonisinin yavru üreterek koloninin devamlılığını sağlanması zordur. Polen aynı zamanda insan metabolizması için çok değerlidir. Polen insan vücudu için gerekli olan aminoasitlerin de tamamını içermektedir ancak polenin dış kabuğundaki eksin adı verilen bir tabakadan dolayı sindirimi zordur. Polen besinsel ve tıbbi özellikleri nedeniyle geleneksel tıpta, alternatif diyetlerde ve ilave besinlerde uzun yıllardır kullanılmaktadır (3-5).

Polen ayrıca soğuk algınlığı, grip, ülser, anemi, kolit, enterit ve alerjik reaksiyonların giderilmesi amacıyla yıllardır halk tedavisinde kullanılmaktadır. Polenin sağlık üzerine etkileri ve çeşitli alanlarda kullanımını incelemek adına bilimsel çalışmalar ve klinik testler yoğun bir şekilde devam etmektedir (6).

Polenin yapısında lipidler, karbohidratlar, proteinler, karotenoidler ve polifenoller gibi bileşenler bulunmaktadır. Polen tanecikleri 6-200 µm çapında, pek çok farklı renk ve şekilde olabilir. Genellikle sarı, kırmızı, turuncu, mor, yeşil, siyah vb. renklerde görülür. Polen, besin değerini kaybetmemesi için kuru, karanlık ve soğuk yerlerde muhafaza edilmelidir. Polen -15 °C'de yıllarca bozulmadan muhafaza edilebilir (7).

Biyolojik sistemlerdeki elektron alıcı moleküller olarak adlandırılan serbest radikallerin aktif oksijen türevlerine oksidanlar denir. Oksidanlar hedef moleküllerden elektron alarak hedef molekülün yapısını ve fonksiyonlarını değiştirirler. Oksidanlar hücre zarını, DNA ve RNA gibi genetik materyali ve değişik enzimatik olayları etkileyerek hücre hasarlarına neden olurlar. Oksidanlar canlı organizmalarda sitoplazmik, mitokondriyal ve ekstrasellüler formları olan süperoksit dismutaz (SOD), glutatyon peroksidaz (GPx) ve katalaz (CAT) gibi antioksidan enzim sistemleri ile seruloplazmin, transferrin, indirgenmiş glutatyon (GSH), askorbik asit (vitamin C) ve α -tokoferol gibi antioksidanlar tarafından yıkılırlar (8, 9).

Polen ayrıca çeşitli enzimleri, antibiyotikleri ve biyoflavonoidleri yapısında bulundurduğundan dolayı vücut hücre dokularını reaktif oksijen türleri (ROS) ve çeşitli radikallere karşı savunmada antioksidan bir sisteme sahiptir (10).

Eritrosit örneklerinde oluşturulan oksidatif hasarın flavonoid ilavesiyle azaldığını belirten çalışmalarda çoğunlukla kuersetin ilavesi ön plana çıkmaktadır (11).

Yapılan literatür araştırmalarında insan eritrosit hücrelerinde, serbest radikal indüklü oksidatif hasarlar ve bu hasarlara karşı sulu Türk polen ekstraktının etkinliğini değerlendirmek amacıyla yapılan bir çalışmaya rastlanılmamıştır. Buradan hareketle hazırlanacak olan sulu Türk polen ekstraktının biyomolekülleri oksidatif hasara karşı koruma kapasitesi bu çalışma kapsamında değerlendirilecektir.

4. GENEL BİLGİLER

4.1. Polen

Polen, çiçekli bitkilerden arılar tarafından toplanarak nektar ve arı salgıları ile karıştırılıp üretilen, fitokimyasallar bakımından zengin içeriğe sahip toz benzeri doğal bir arı ürünüdür (6).

Arılar poleni çeşitli bitki ve çiçeklerden toplarlar, tükürük salgılarındaki amilaz ve katalaz gibi enzimlerle karıştırırlar, kısmen sindirilmiş bal ile yoğurarak renkli pellet yapıları oluştururlar. Pellet haline getirilen polenler, oğul arılar tarafından besin olarak kullanılır. Arılar yiyecek bulamadıklarında poleni besin kaynağı olarak, ayrıca arı ekmeği ve arı sütü yapımında da kullanırlar. Arıların gelişimleri için gerekli protein kaynağı polendir (3, 12).

Polenin bileşimi bulunduğu bölgedeki bitki türlerine, bölgesel kökene, ekolojik habitata ve hatta mevsimlere bağlı olarak değişir. Bu nedenle, polenin kimyasal bileşenleri minimum ve maksimum değerler arasında büyük farklılık göstermektedir. Polen tanelerinin içeriği mikroskopik ışık altında analiz edilebilir (4).

Polen; arıların doku, salgı bezi ve diğer organlarının gelişimi için gerekli olan protein, lipid, sterol, vitamin ve mineralleri sağlamada en önemli besin maddesidir (5).

Arıcılıktan elde edilen ürünler arasında eldesi en kolay ürün olan polenin kullanım alanları sürekli çoğalmaktadır. Arılar ayrıca bitkilerin tozlaşmasına da katkı sağlarlar, arıcılık geliştikçe tarımsal üretimde gelişecek ve çiçeklerdeki tozlaşmanın artmasıyla polen sayısı da artmış olacak (13).

4.1.1. Polenin Tarihçesi

Yeryüzünde yapılan birçok arkeolojik kazıda Avrupa ve Asya'daki mezolitik kayaların üzerinde bulunan resimlerde insanların yaklaşık sekiz bin yıl öncesinde arıcılıkla uğraştığı görülmektedir (14).

Polenin insanlar tarafından kullanımı uzun bir tarihi süreci barındırmaktadır. Polen; ilk olarak Çin, Mısır ve Yunanistan'da kullanılmaya başlanmıştır. Bu dönemlerde polen ilaç olarak hekimler tarafından verilmiştir. Ibn el-Beithar poleni afrodisyak olarak tanımlamış ve aynı zamanda mide, bağırsak ve kalbe yararlı etkileri olduğunu, ateş düşürücü ve bazı yiyecekler ile yenildiğinde ödemi azalttığını öne

sürmüştür. Mısır Sultanı'nın doktoru poleni kanama durdurucu, ağrı kesici sedatif bir tonik olarak kullanmıştır (13).

Arthur Dobbs 1750'li yıllarda arıların bir çiçekten diğerine poleni taşıdığını keşfetmiştir. İsveçli botanikçi Linne 1760 yılında "Polen" kelimesini kullanmıştır. Latince'de polen "ince toz, un" anlamına gelmektedir (15).

4.1.2. Polenin Fiziksel Özellikleri

Polen taneleri renk, koku ve şekil bakımından üretildikleri bitkiye göre farklı özellikler göstermektedir. Bu tür özelliklerle polenin hangi bitkiye ait olduğu mikroskobik incelemelerle belirlenebilir (12).

Renk: Polen taneleri pek çok farklı renkte olabilir. Renklerini ait olduğu bitki taneciklerinden alır, ancak polen yükünün heterofloral yapısı, atmosferik nem ve arılar tarafından eklenen salgılar ile renklerinde kısmi değişiklikler olabilir (16).

Polen tanelerinin rengi, çoğunlukla sarı tonlarında olmakla birlikte siyah, mor, mavi, turuncu, yeşil, beyaz, kırmızı ve daha birçok farklı renkte ve tonlarda olabilir. Polen tanelerinin % 80'i sarı ve % 20'si diğer renk çeşitlerini içerir. Renkler polenden polene farklılık göstererek polenin kimliğini açıklar. Polene rengini veren maddeler karotenoidler olup polende klorofil bulunmaz.

Koku: Polende bulunan uçucu yağ asitleri arıları ve diğer böcekleri çiçeklere çeken hoş bir koku yayarlar. Polen taze iken hoş kokulu olup, parlak bir görünüme sahiptir. Kurduğunda matlaşır ve kokusunu kaybeder (17).

Büyüklik ve şekil: Polen taneleri 6-200 µm çapında olup bitkiden bitkiye farklılık gösterir. Polen taneleri o kadar küçüktür ki 1 gramında en az 14 000 polen tanesi bulunabilir. Polenin fiziksel özellikleri bitki türüne, bitkinin yetiştiği koşullara, yer ve toprak karakterine göre değişmektedir (3).

Polenin besin değerini kaybetmemesi için güneş ışığından korunması gerekir. Polen kuru, karanlık ve soğuk yerlerde muhafaza edilmelidir. Polen oda sıcaklığında aylarca, -15 °C'de yıllarca bozulmadan muhafaza edilebilir (7).



Şekil 1. Arının arka bacaklarındaki polenler ve farklı renkteki polen pelletleri (anonim)

4.1.3. Polenin Kimyasal Özellikleri ve İçeriği

Polen bileşiminde insan sağlığı açısından önemli maddeler ihtiva eder ve kimyasal içeriği bitkiden bitkiye değişiklik gösterir. Kromatografi ve spektrofotometri gibi ileri analitik tekniklerle çeşitli bitkisel türlerden yaklaşık 200 kimyasal polen bileşeni belirlenmiştir. Polenin temel bileşenleri % 5-60 protein, % 13-55 karbohidrat, % 4-7 lipid, vitamin ve minerallerden oluşmaktadır (18).

Polenin bileşimi incelendiğinde mükemmel bir tamamlayıcı gıda takviyesi olarak kabul edilmektedir (19).

Polende histidin, lösin, izolösin, lizin, metiyonin, fenilalanin, treonin, triptofan ve valin gibi arıların ihtiyaç duyduğu esansiyel aminoasitler ile esansiyel olmayan ancak gelişime katkısı olan prolin, glisin ve serin gibi aminoasitler de bulunmaktadır (20).

Polendeki karbohidratlar; glukoz, fruktoz ve sakkaroz gibi basit şekerlerin yanı sıra nişasta, pektin, selüloz ve lignin gibi polisakkaritlerden oluşmaktadır (17).

Doğada bulunan önemli yağ asitlerinden biri olan palmitik asit ve ayrıca miristik, linoleik, oleik, stearik ve diğer yağ asitlerini de bulundurmaktadır (21).

Polende başlıca; Provitamin A (karotenoidler), B₁ vitamini (tiamin), B₂ vitamini (riboflavin), B₃ vitamini (niasin), B₅ vitamini (pantotenik asit), B₆ vitamini (piridoksin), B₁₂ vitamini (siyamoko balamin), C vitamini (askorbik asit), D vitamini, E vitamini, H vitamini (biyotin) ve K vitamini bulunmaktadır. Bunlar bağışıklık sistemini uyarır, dış etkenlere karşı hücreleri korur, canlının genç ve zinde kalmasını sağlarlar (22, 23).

Minerallerden ise kalsiyum, potasyum, magnezyum, fosfor, demir ve sodyum polende bulunmaktadır (10).

Polenin yapısında ayrıca çeşitli enzimler, antibiyotikler ve biyoflavonoidler de bulunur. Polen polifenol ve diğer antioksidan bileşikleri içerdiği için Almanya Federal Sağlık Komisyonu tarafından ilaç olarak kabul edilmiştir (12).

Polenin kimyasal yapısı, bitki türüne, çevresel şartlara, bitkinin yaşı ve besin değerine göre değişmektedir (24).

2010'daki Bilimsel Gıda Komitesi'nin raporlarına göre RDI (Günlük Gerekli Alım Miktarı) değerleri hesaplanarak ortalama RDI tablosu oluşturulmuştur (3, 18).

Polenin genel bileşimi Tablo 1'de gösterilmektedir.

Tablo 1. Polenin genel bileşimi (Campos, 3)

ANA BİLEŞENLER	100 g'daki g*	15 g'daki g*	RDI* (g/gün)
Karbohidratlar (fruktoz, glukoz, sakkaroz, lifler)	13 - 55	1 - 4.6	320
Ham Lifler	0.3 - 20	0.3 - 18	30
Protein	10 - 40	5.4 - 22	50
Yağ	1 - 13	0.1 - 4	80
VİTAMİNLER	100 g'daki mg*	15 g Polen'in % RDI	RDI* (mg/gün)
Askorbik Asit (C)	7 - 56	2 - 15	100
β-Karoten (Provitamin A)	1 - 20	30 - 600	0.9
Tokoferol (Vitamin E)	4 - 32	8 - 66	13
Niasin (B ₃)	4 - 11	7 - 20	15
Piridoksin (B ₆)	0.2 - 0.7	4 - 13	1.4
Tiamin (B ₁)	0.6 - 1.3	15 - 32	1.1
Riboflavin (B ₂)	0.6 - 2	12 - 42	1.3
Pantotenik Asit	0.5 - 2	2 - 9	6
Folik Asit	0.3 - 1	20 - 67	0.4
Biyotin (H)	0.05 - 0.07	30 - 42	0.045
MİNARELLER			
Potasyum (K)	400 - 2000	5 - 27	2000
Fosfor (P)	80 - 600	---	1000
Kalsiyum (Ca)	20 - 300	0.5 - 7	1100
Magnezyum (Mg)	20 - 300	2 - 23	350
Çinko (Zn)	3 - 25	10 - 79	8.5
Manganez (Mn)	2 - 11	15 - 85	3.5
Demir (Fe)	1.1 - 17	2 - 37	12.5
Bakır (Cu)	0.2 - 1.6	4 - 36	1.2

4.1.3.1. Polendeki Fenolik Bileşikler

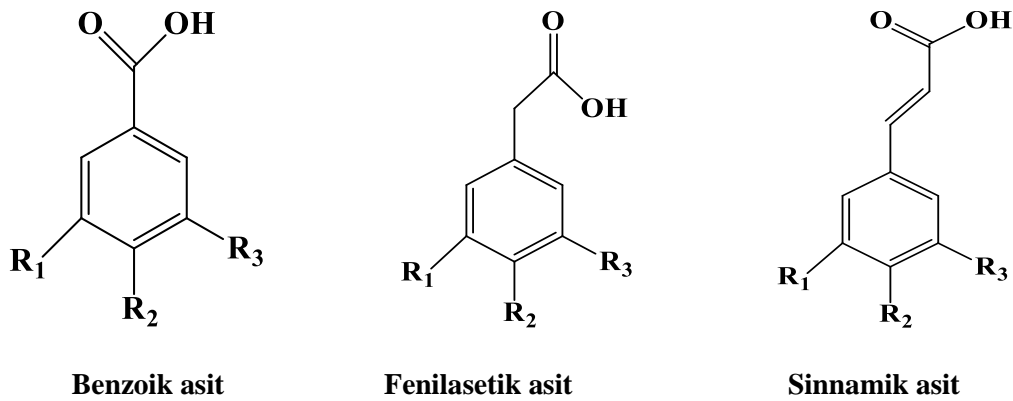
Polenin biyolojik aktivitesinden sorumlu fenolik asitler ve flavonoidler doğal antioksidan kaynağıdır. Son yıllarda, polifenol içeren bitkilerden biyoaktif bileşenlerin eklenmesine ilgi giderek artmaktadır. Polifenoller ile zenginleştirilmiş besinler birçok hastalığın çoğalmasının önlenmesinde etkilidir (25).

Polifenoller, arıların çiçeklerdeki polenin antioksidatif etkinliğini belirlediği bileşenlerdir. Bunların içeriği % 3-5 arasında değişir ve ham maddelerin kaynağına bağlı olarak önemli derecede farklılık gösterir (26).

Etkili antioksidan olan polifenoller vücudumuzun kanser, diyabet, kardiyovasküler hastalıklar ve ateroskleroz gibi hastalıklardan korunmasını sağlarlar. Polen fenolik bileşiklerden fenilasetik asit, sinnamik asit, benzoik asit, kafeik asit ve esterleri içerisinde yer almaktadır (27).

Polendeki fenolik bileşikler özgüllük, nitelik ve niceliksel kararlılık bakımından polen yüklerinin kalitesinin önemli bir göstergesidir. Onların yapılarına göre, polendeki fenolik bileşikler, flavonoid ve fenolik asitler arasında ayırım yapılabilmektedir (28).

Fenolik Asitler: Fenolik asitler polenin biyoaktif bileşenleridir. Polen içerikleri ortalama % 0.19'dur. Bunlar, çeşitli yapı ve özellikte bir grup oluşturmaktadır. Fenolik asit molekülleri bir aromatik halka ve bir karboksil grup içerir. Bunlar arasında şekil 2'de belirtilen benzoik asit, fenilasetik asit ve sinnamik asiti ayırt edebiliriz.



Şekil 2. Fenolik asitlerin temel yapıları (Gawlik, 29)

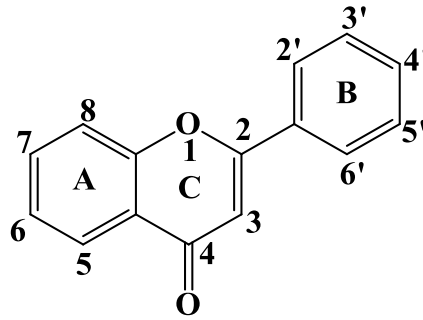
Sinnamik ve benzoik asitin türevleri çok büyük önem taşır. Hidroksile edilmiş sinnamik asit türevleri, benzoik asit türevlerine göre daha etkili antioksidandır. Fenolik asitlerin antioksidatif aktivitesi; hidroksil gruplarının sayısı, fonksiyonel grupların

yerleştirilmesi ve bunlardan kaynaklanan herhangi bir sterik etkiyle belirlenir. Sinnamik asit türevleri, fenil halkası ve karboksil grubu arasında bir etilen grubunun eklenmesi nedeniyle benzoik asit türevlerine kıyasla daha etkili antioksidandır ve bu da hidrojen verme yeteneğini artırmaktadır (29).

Benzoik asitin monohidroksi türevleri, meta-hidroksilasyonda en iyi antioksidatif özelliklere sahipken, benzoik asitin dihidroksi türevleri orto ve meta hidroksilasyonda yüksek antioksidatif aktivite ile karakterize olmuştur. Karboksil (-COOH) grubunun orto-difenolik fonksiyonel gruplara yakın olması, meta pozisyonundaki hidrojene erişilebilirliği etkiler ve bu da en büyük antioksidatif etkinliği garanti eder (30).

Polen içerisinde bulunan fenolik bileşikler içerisinde ayrıca 3,4-dihidroksibenzoik asit ve 4-hidroksibenzoik asit gibi fenilpropanoidler ve benzoik asit türevleri de belirlenmiştir (31).

Flavonoidler: Polende bulunan polifenoller arasında flavonoidler en önemli bileşik grubunu oluşturur. Flavonoidlerin kimyasal yapısı Şekil 3'te gösterilen benzo- γ -piron iskeletine sahip bir difenil propan halka sistemi (C₆-C₃-C₆) varlığı ile karakterize edilir.



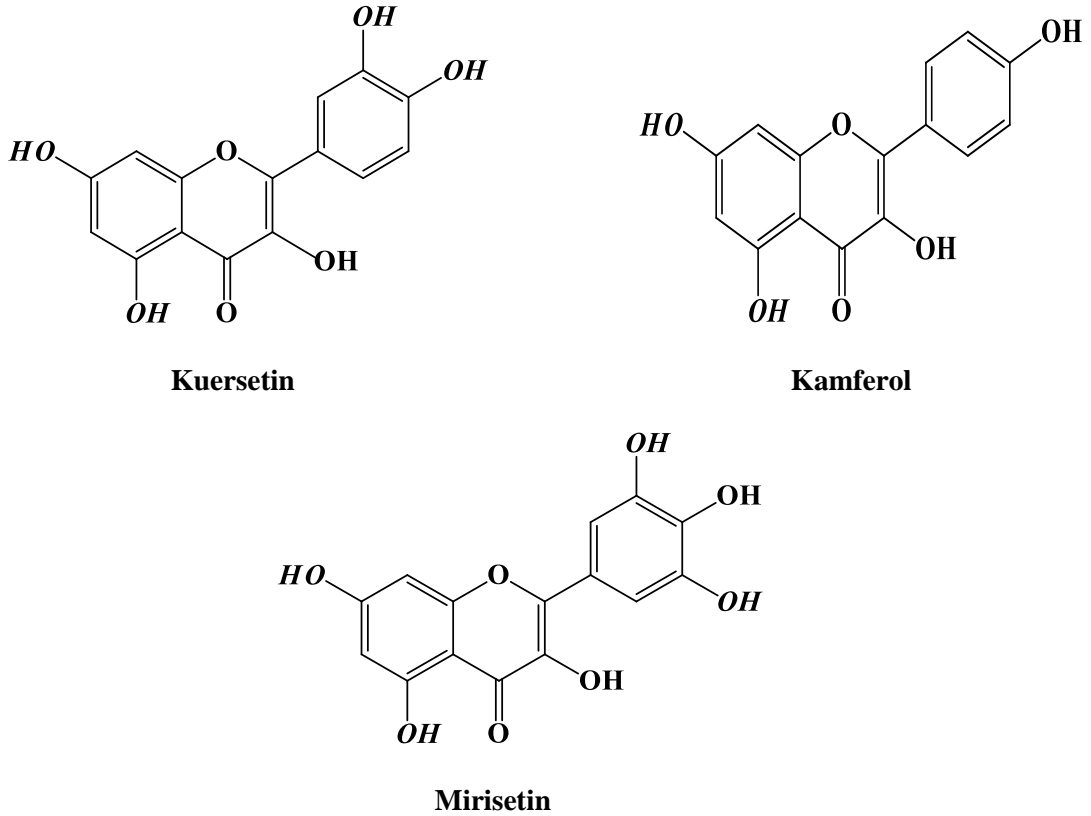
Şekil 3. Flavonoidlerin temel yapısı (Iriti, 32)

Bir flavonoid yapıda C halkasında C₂ ve C₃ arasında çift bağ bulunduğunda flavonoidin antioksidatif özellikleri etkilenir. C₄ konumundaki bir karbonil grubu, bileşiklerin hidroksil radikallerini süpürmesini sağlar. C halkasında C₃ konumunda bir hidroksil (-OH) grubunun bulunması lipidlerin peroksidasyonunu engellemesine izin verir. Hidroksil radikal temizleme kabiliyeti B halkasında, özellikle 3' ve 4' konumlarında bulunan hidroksil gruplarının sayısı ile artmaktadır. A halkasında C₅ ve

C₇ pozisyonlarında hidroksil gruplarının varlığı B halkasındaki C₃ ve C₄'ün yanı sıra C halkasındaki C₃'te lipid peroksidasyonunun inhibisyonunu artırır (32).

Flavonoidler kimyasal yapıları nedeniyle yedi gruba ayrılırlar; flavonlar, flavonoller, flavanonlar, flavanlar, antosiyanlar, izoflavonlar ve kalkonlardır. Flavonoidler, polende ağırlıklı olarak glikozitler şeklinde, yani bir şeker grubuna sahip olan flavonol glikozit molekülleri şeklinde bulunur. Bir glikozit bağının varlığı, sterik etkiler nedeniyle antioksidatif özelliklerini azaltır (33).

Polen içeriğinde belirli flavonoidlerin varlığı, polenin geldiği bitki türlerine göre değişir. Polenin kimyasal bileşimi üzerine yapılan araştırmalarda, çeşitli tür ve şekillerde flavonoidler keşfedilmiştir. Poleninin temel flavonoidleri şekil 4'te gösterilen kuersetin, kamferol, mirisetin ve onların glikozitleridir.



Şekil 4. Temel flavonoidlerin yapısı (Rzepecka, 34)

Kuersetinin glikozitler arasındaki ortak kombinasyonu rutin (*rutinoside*)'dir, yani kuersetin (*3-o-rutinoside*)'dir. Şeker kısmını glukoz ve ramnoz disakkarit oluşturur. Kuersetinin yapısı, onun biyolojik özelliklerinden sorumludur. Rutin içeriğinin uygun seviyesi, polen çeşitlerinin biyolojik ve beslenme kalitesini belirler (31, 34).

4.1.4. Polenin Biyolojik Etkileri

Polendeki temel biyolojik bileşenler fenolik asitler, polifenolik bileşikler ve en çok da glikozit türevleri olarak sıralanır. Günümüzde fenolik bileşiklerin antioksidan özellikleri nedeniyle önemi artmıştır. Birçok araştırmacı polifenollerin indirgeyici ajan olma, metal şelatlama ve serbest radikal süpürücü özellik gösterdiğini keşfetmiştir (35).

Polen farklı fizyolojik ve farmakolojik aktivitelere sahip birçok özellik barındırmaktadır. Bunlar; antioksidan, anti-inflamatuvar, antikarsinojen, antibakteriyel, antifungal, antiateroskleroz ve besinsel etkiler gibi çeşitli biyolojik özelliklerdir. Ayrıca, endojen savunma sistemlerini etkileyerek ve farklı fizyolojik süreçleri düzenleyerek dolaylı koruma sağlayabilirler (34, 36).

4.1.4.1. Antioksidan Etkiler

Polenin biyolojik aktivitesini belirleyen özellikler yüksek antioksidan potansiyele sahip olmasıdır. Birçok hastalığın nedeni ROS'un artmasından kaynaklanmaktadır (27).

Oksidatif stres ile ilişkili bu hastalıklar; iltihaplar, iskemi sonrası reperfüzyon, romatoid artrit, ateroskleroz, hipertansiyon, diyabet, merkezi sinir sistemi hastalıkları, gastrointestinal sistem inflamasyonları ve ülserasyonları, tümörler, AIDS, oto-immünolojik hastalıklar, kistik fibrozis, böbrek hastalıkları ve hızlandırılmış yaşlanma sendromları olarak sayılabilir (37).

Oksidatif stres, hücrelerdeki ROS konsantrasyonundaki artışa bağlı olarak ortaya çıkar. ROS hem ekzojen hem de endojen faktörler tarafından üretilebilir. ROS seviyelerindeki artış hücre membranı, DNA hasarı veya kronik inflamasyonu indükleyen çeşitli hücrel tepkilerle bağlantılıdır (38).

Polen yapısında bulunan en önemli antioksidan moleküller polifenoller, özellikle de flavonoidlerdir. ROS'ları süpürme ve organik radikalleri ortadan kaldırabilme yeteneklerinden başka, oksidasyon reaksiyonlarını katalizleyen metal iyonlarını bağlayarak kompleksleştirebilirler (39).

İnsan eritrosit hücrelerinde ROS'a karşı birçok savunma sistemi vardır. Örneğin, endojenik antioksidanlara CAT, SOD ve GSH'ı örnek verilebilir. Çalışmalarda ekzojen beslenme antioksidanları tarafından oksidatif stresin azaldığı görülmüştür (40, 41).

Polenin antioksidan etkisi; fenolik maddeler, C ve E vitamini, karotenoidler ve glutasyon gibi ikincil bitki metabolitlerinin içeriğinin yanısıra antioksidan enzimlerin aktivitesine katkı sağlar. Polende bulunan flavonoidler elektrofillerin inaktivasyonunu sağlar, ayrıca serbest radikalleri süpürür, ROS ve mutajenleri önler (40, 42).

Sinnamik asit türevlerinin en etkin fenoliklerden olduğu ve eksikliklerinde antioksidan aktivitenin çarpıcı bir şekilde azaldığı görülmüştür. Sinnamik asidin bu antioksidan aktivitesi sayesinde polen tüketen canlıların vücutları yenilenmiş ve hayatta kalma süreleri uzamıştır (3).

Polen ekstraktlarının, antioksidan aktiviteleri sayesinde eritrositlerde lipid peroksidasyonunu inhibe ettiği bildirilmiştir. (43).

4.1.4.2. Anti-inflamatuvar Etkiler

Polen bileşenleri; makrofajlar, B ve T lenfositleri, hepatositler, mast hücreleri, bazofiller, nötrofiller ve eozinofiller gibi birçok hücrede patojenlere ve inflamatuvar süreçlere karşı konakçı savunmada önemli bir rol üstlenmişlerdir (42).

Flavonoidlerin anti-inflamatuvar etkisi, araşidonik asit metabolizmasını inhibe edebilen kuersetinden kaynaklanabilir. Araşidonik asit seviyesindeki düşüş, pro-inflamatuvar prostaglandin seviyesini düşürür ve anti-inflamatuvar etki sağlar (44).

Anti-inflamatuvar etki mekanizması, bu süreçte aktif olan yağ asitleri ve fitosterollerin varlığı ile de ilişkilidir. Polenin kardiyovasküler ve böbrek kaynaklı şişliklerin giderilmesinde etkili olduğu görülmüştür (45).

Genel olarak polenin anti-inflamatuvar aktivitesi, naproksen, analgin, fenilbütazon ve indometasin gibi steroidal olmayan anti-inflamatuvar ilaçlarla karşılaştırılır. Polen konvansiyonel tedavide astımı olan hastalar için faydalıdır (42).

4.1.4.3. Antikarsinojen Etkiler

Polen özleri fenolik bileşenlerin yanısıra fenolik olmayan antioksidanlar sayesinde birçok tümöre karşı sitotoksik özellikler sergiler. *Brassica campestris* Linn (Bcl-2) polen ekstraktlarının insan prostat kanseri hücrelerinin canlılığı üzerindeki etkileri üzerine yapılan bir çalışmada, bir kloroform ekstraktının steroid fraksiyonun kaspaz-3 enzim aktivitesini önemli ölçüde arttırdığını ve anti-apoptotik proteinlerden Bcl-2 ekspresyonunda azalmaya neden olduğu görülmüştür. Bu sonuçlar sayesinde, insan

androjenden bağımsız prostat kanserinin prostaglandin-3 (PC-3) hücrelerine karşı sitotoksositeye neden olduğu, bunun da apoptoza yol açtığı belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlar, Bcl-2'nin polen kloroform ekstraktının steroid fraksiyonunun ileri prostat kanseri tedavisi için umut verici bir aday olabileceğini göstermiştir (46).

Polen bazı kanser tiplerinde antimitojenik özellikler göstermektedir. Antikarsinojenik aktiviteler, ROS'un kaldırılması veya inaktivasyonu ile yapılabilir. Polen ile tedavi edilen kanser hücreleri içindeki solunum patlamasının inhibisyonu muhtemelen antioksidan potansiyeli ile ilişkilidir (42).

Polen ekstraktlarının farklı hücre dizilerinin inhibisyonu üzerindeki etkisi, K-562 hücreleri ve lösemi hücrelerinde çalışılmıştır (47).

Hücre kültürlerinden elde edilen sonuçlara uygun olarak, farklı türde bileşiklere özellikle fenolik asitler ve flavonoidlere sahip polen özlerinin hücre büyümesinin kontrolüne yardımcı olduğu ileri sürülebilir. Polen bağışıklık sistemini güçlendirmede ve geliştirmede etkilidir (48).

4.1.4.4. Antibakteriyel ve Antifungal Etkiler

Polenin etanol ekstraktları, patojenik gram (+) ve gram (-) bakterilere ve patojenik mantarlara karşı oldukça güçlü antibiyotik özellikler gösterir. Flavonoidlerin bakteriler üzerindeki etkileri, metabolizmalarındaki bozulmalar ile bağlantılıdır. Bu mekanizma hücre duvarı bütünlüğünün bozulmasına, iyon kanallarının bloke edilmesine ve elektron transport zincirindeki (ETS) elektron akışının engellenmesine yol açar. Adenozintrifosfat (ATP) sentezi ile elektron transport zincirindeki elektron akışı engellenerek polipeptidler, hücre zarı enzimleri ve bakteriyel hücre duvarlarıyla kompleks oluştururlar (49).

Mikrobiyolojik aktivitenin fenolik asitler ve flavonoidler ile ilişkili olduğu görülmüştür. Flavonoidlerin türevleri ve fenollerin bakteri ve mantar hücrelerine etkisiyle sitoplazma membranı bozulur ve bu da potasyum iyonlarının kaybına ve hücre otolizinin başlamasına yol açar (50).

4.1.4.5. Antiaterosklerotik Etkiler

Polen ekstraktları lipidlerin, triaçilgliserolün ve kolesterolün içeriğini azaltarak hipolipidemik aktiviteye sahip olur. Bu nedenle, kardiyovasküler hastalıklarda faydalı etkiler gösterir (51).

Polen ilavesi, kardiyovasküler hastalarda kan viskozitesini düşürür ve aterosklerotik plak oluşum şiddetini ve trombosit agregasyonunu azaltır (42).

Polenin bu etkileri polende bulunan ve trombosit agregasyonunun ana inhibitörü olan PC-3'ün öncüsü olarak işlev gören serbest yağ asitleri formlarıyla (omega-3, a-ALA) ilişkilidir. Ayrıca, polen tüketimi sonrasında artmış fibrinolitik sistem aktivitesi teyit edilmiştir. Bu tür özellikler kalp hastalıklarından ve beyin felçlerinden korur (45).

4.1.4.6. Antianemik Etkiler

Polen, demir eksikliğinin olumsuz etkilerini önemli ölçüde azaltabilir ve böylece antianemik etkiler gösterebilir. Polenin demir, kalsiyum, fosfor ve magnezyum metabolizması üzerindeki etkileri, deneysel bir anemi modeli olarak kabul edilen nutrisyonel demir eksikliği olan sıçanlarda, polen desteğinin kan trombosit sayısının azalmasına ve hemoglobin düzeyinde artışa neden olur. Ayrıca magnezyum, kalsiyum ve fosfor metabolizması üzerinde faydalı etkilerinin yanı sıra kilo artışını da sağlar. Test edilen arı ürünlerinin, demir eksikliğinin olumsuz sonuçlarını büyük oranda azalttığı, onarıcı etkisi olduğu ve beslenmede demir emilimini ve kullanımını geliştirdiği gözlenmiştir (10).

Farelerde ve sıçanlarda hemolitik anemi durumunda polenin yararlı etkisi kanıtlanmıştır. Polenin hematopoitik sistem uyarımına neden olduğu ve hayvanlardaki beyaz kan hücrelerinin seviyesini düşürdüğü gözlenmiştir (52).

4.1.4.7. Besinsel Etkiler

Polenin besin değeri göz önüne alındığında öncelikle besleyici bir protein kaynağıdır. Kuru ürün kütlesi ortalama % 23.9 protein içeriğine sahiptir. Farklı bitkisel kaynaklı polenlerdeki protein içeriği değişmesine rağmen polendeki ortalama protein miktarı benzerdir. Polonya'nın polen protein içeriği % 20.7, İspanya'nın % 17, Kore'nin % 20.7, Çin'in % 23.7 ve Brezilya'nın % 21.4'tür. Ülkemizde böyle bir sınıflandırma henüz yapılmamıştır (53).

Hayvanlar ve insanlara polen takviyesinin, polenin moleküler boyuttaki etkisi protein metabolizmasının düzenlenmesi ve artırılması ile bağlantılı olduğundan kötü beslenmelerin iyileştirilmesinde faydalı olduğu görülmüştür (18).

Polen, beslenme yetersizliğinden kurtulma konusunda zorluk çeken ve esansiyel amino asitler, yağ asitleri ve mikro besleyicilere çok fazla ihtiyacı olan yaşlı bireyler için özellikle uygundur (46).

Besince zengin olan polen, kemoterapi veya radyoterapinin yan etkilerini azaltabilir ve hastaları daha hızlı iyileştirebilir. Düzenli olarak taze polen alımı, fiziksel ve zihinsel olarak ağır koşullar altında çalışanlara da faydalı olmaktadır (45).

Polen ile diyet takviyesi kas fonksiyonunu güçlendirir ve vücut kütleini artırır. Üstelik, polen takviyeleri, probiyotik canlılığı olumlu yönde etkiler ve fermante süt içeceklerinin viskozitesini de artırır (54).

4.2. Serbest Radikaller

Biyolojik sistemlerde elektron alıcı moleküllere serbest radikaller denir. Serbest radikaller son yörüngelerinde bir ya da daha fazla eşlenmemiş elektron taşıyan, yüksek enerjili atom veya moleküllerdir (55-57).

Serbest radikallerin aktif oksijen türevlerine oksidanlar denir. Oksidanlar hedef moleküllerden elektron alarak, bu hedef moleküllerin yapısını ve fonksiyonlarını değiştirir. Ayrıca hücre membranını, DNA ve RNA gibi genetik materyalleri ve değişik enzimatik olayları etkileyerek hücre hasarlarına yol açarlar. Biyolojik membranlar oksidanların saldırılarına karşı duyarlıdırlar. Lipid peroksidasyonun en önemli ürünlerinden olan MDA, hücre membranında iyon alışverişine etki ederek membrandaki bileşiklerin çapraz bağlanmasına yol açıp, iyon geçirgenliği ve enzim aktivitesinin değişimi gibi olumsuz sonuçlara neden olur (8).

Serbest radikaller pozitif ve negatif yüklü veya elektriksel olarak nötr olabilirler. Serbest radikaller elektron transferi, enerji üretimi gibi işlevlere de sahiptir fakat kontrolsüz davranışları hücrede hasara yol açmaktadır (58).

Ayrıca eşlenmemiş elektron bulundurduklarından dolayı diğer maddelerle kolayca reaksiyon verebilirler. Serbest radikaller kararlı hale gelebilmek için diğer moleküllerden elektron alırlar. Diğer atom veya moleküller elektron çiftleri bulundursa

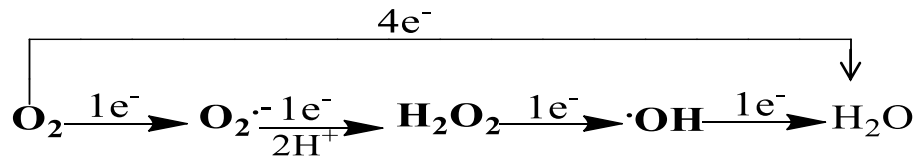
da kararlı bir yapıya sahip olduklarından dolayı reaksiyonlara girme eğilimleri serbest radikaller kadar yüksek değildir. Tablo 2’de gösterilen moleküller nonradikaller olarak tanımlanırlar (9).

Tablo 2. Serbest reaktif oksijen türleri (Valko, 9)

Radikaller	Nonradikaller
Süperoksit ($O_2^{\cdot-}$)	Hidrojen peroksit (H_2O_2)
Hidroksil (OH^{\cdot})	Hipokloröz asit ($HOCl$)
Peroksil (RO_2^{\cdot})	Ozon (O_3)
Alkoksil (RO^{\cdot})	Singlet Oksijen (O^{\cdot})
Hidroperoksil (HO_2^{\cdot})	Peroksinitrit ($ONOO^{\cdot}$)
Nitrik oksit (NO^{\cdot})	Hidroperoksit ($L(R)OOH$)

Biyolojik sistemlerdeki serbest radikallerin en önemlisi oksijendir. Ancak azot, karbon ve kükürt kaynaklı serbest radikaller de mevcuttur. Elektron taşıma zincirinde meydana gelen elektron sızıntısıyla moleküler oksijenin tamamı suya dönüşmek yerine % 1-3’lük bir kısmı da süperoksit radikaline ($O_2^{\cdot-}$) dönüşmektedir (59).

Moleküler oksijenin bir elektron almasıyla $O_2^{\cdot-}$, iki elektron almasıyla H_2O_2 , üç elektron almasıyla OH^{\cdot} radikali ve dört elektron almasıyla ise H_2O molekülü oluşmaktadır.



Şekil 5. Reaktif oksijen türlerinin oluşumu (Song, 60)

Biyolojik sistemlerdeki serbest radikaller elektron transferleriyle oluşmaktadır. Reaktif oksijen türleri, reaktif azot türleri ve diğer reaktifler olarak ayrılır (60).

4.2.1. Serbest Radikallerin Oluşumu

Organizmadaki serbest radikaller hücrelerde hem endojen hem de ekzojen kaynaklara bağlı olarak oluşurlar. Tablo 3’te hücredeki serbest radikal kaynakları verilmiştir (61).

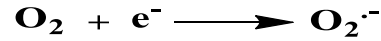
Tablo 3. Serbest radikal kaynakları (Kavas, 61)

Endojen Kaynaklar	Eksojen Kaynaklar
Mitokondriyal elektron transport zinciri	İlaç oksidasyonları
Kloroplast elektron transport zinciri	İyonize radyasyon
Oksidan enzimler: Ksantin oksidaz	Güneş ışığı
Triptofan dioksijenaz	X-ışınları
Galaktoz oksidaz	UV-ışınları
Siklooksijenaz	Egzos gazları
Lipooksijenaz	Glutasyonu okside eden maddeler
Fagositik hücreler	Sigara dumanı
Nötrofiller, monosit ve makrofajlar	Kükürtdioksit

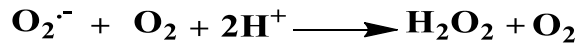
4.2.2. Serbest Radikal Türleri

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

Aerobik hücrelerdeki enerji metabolizmasında ve oksidasyon sırasında oksidazlar gibi bazı enzimlerin aktivitesiyle oksijen molekülü bir elektron alarak indirgenir ve serbest süperoksit radikal anyonu ($O_2^{\cdot-}$) meydana gelir.



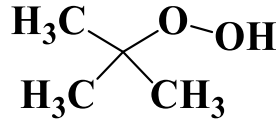
Oksidatif hasarda nadiren rol almalarının nedeni hızlı bir şekilde SOD enzimi tarafından hidrojen perokside dönüştürülmeleridir. Süperoksit radikallerinin asıl zararları, yukarıda da bahsedildiği gibi hidrojen peroksit kaynağı ve geçiş metalleri iyonlarının indirgeyicisi olmalarıdır. Süperoksit anyonu hem yükseltgeyici hem de indirgeyici özelliğe sahiptir (62).



4.2.2.2. Tersiyer Bütil Hidroperoksit (t-BHP)

Organik bir hidroperoksit olan t-BHP, oksidatif hücre hasarı mekanizmalarını kapsayan çalışmalarda sıklıkla kullanılan bir bileşik olup açık formülü Şekil 6'da verilmiştir. Organik hidroperoksitler alkil radikallerine bir oksijen eklenmesi veya peroksil radikallerinden bir hidrojen atomunun çıkarılması sonucu oluşurlar. t-BHP

diğer alkoksil ya da peroksil radikallerine ayrışabilir ve bu durum lipid peroksidasyon zincir reaksiyonlarını hızlandırabilir. Bu ayrışma reaksiyonları metal iyonları ve onların kompleksleri vasıtasıyla gerçekleşir. t-BHP kaynaklı toksisitenin nedenleri için önerilen etki mekanizmaları şöyledir; intraselüler kalsiyum dengesindeki değişiklikler, glutatyon ve protein tiyol düzeyindeki azalma, DNA tek zincir kırıklarının oluşumu, lipid peroksidasyonunun başlaması, tersiyer bütoksil radikallerinin oluşması ve t-BHP kaynaklı genotoksisitedir. Bir geçiş metali aracılıklı reaksiyon ile H₂O₂ gibi değişik tipteki ROS'ların üretimiyle sonuçlanan bir süreçtir (63, 64).

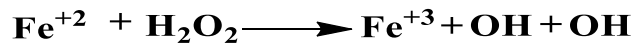


Şekil 6. t-BHP'nin açık kimyasal formülü (Lima, 63)

4.2.2.3. Hidroksil Radikali (OH[•])

Hidroksil radikali, biyolojik sistemlerde bulunan en güçlü serbest radikaldir. Yarı ömrü yaklaşık 10⁻⁹ s olan oldukça güçlü bir oksidandır. Bilinen en toksik radikal olmakla birlikte lipidler, proteinler ve nükleik asitler gibi hemen hemen bütün makromolekülleri okside edebilmektedir (65).

Redoks metal iyonları OH[•]'ni oluşturmak için H₂O₂ ile birlikte reaksiyona girerler. Ayrıca süperoksit radikali Haber-Weiss reaksiyonu ile OH[•]'ne dönüşebilmektedir.



4.2.2.4. Hidrojen Peroksit (H₂O₂)

Moleküler oksijenin çevresindeki moleküllerden iki elektron alarak veya süperoksidin bir elektron alması sonucu hidrojen peroksit meydana gelir. Peroksit iki hidrojen atomu ile birleşerek hidrojen peroksidi oluşturur. Hidrojen peroksit, bir serbest radikal değildir. Fakat biyolojik membranlara etki edebilir. Hücre içi sinyal molekülü olarak da görev yapabilir. Hücrelerde H₂O₂'nin üretimi süperoksit radikalinden SOD enzimi katalizörlüğü ile gerçekleştirilirken, eliminasyonu ise CAT ve GPx enzimleri tarafından sağlanmaktadır. Antioksidan enzim aktivitelerinin değerlendirilmesinde SOD, CAT ve GPx seviyelerine çeşitli yöntemlerle bakıldığı görülmektedir (66).

Hidrojen peroksit reaktif oksijen türlerinden biri olup çeşitli mekanizmalarla kendisinden daha reaktif olan yapılara dönüşebilir, enzim aktivasyonu, gen ekspresyonu, apoptoz ve hücre hasarı içeren sinyalleri başlatabilir (67).

4.2.3. Serbest Radikallerin Etkileri

Serbest radikaller, bağışıklık sistemindeki nötrofil, makrofaj gibi hücrelerin savunma mekanizmasında gerekli olsa da fazla üretildiklerinde doku hasarı ve hücre ölümü ile sonuçlanmaktadır (68).

Ayrıca hücre membran proteinlerini bozarak membran lipid ve proteinlerini yok ederler ve hücre membranını sertleştirerek hücre fonksiyonunu engellerler. Bağışıklık sistemindeki hücreleri de yok ederek bağışıklık sistemini zayıflatırlar ve enzimlerini inaktive ederler. Mitokondrideki aerobik solunumu ve kapiller geçirgenliği bozarak hücrenin potasyum kaybını ve trombosit agregasyonunu artırır (69).

Canlı organizmalarda serbest radikal hasarına karşı organ ve dokuları korumak için SOD, GPx, Glutasyon S-transferaz (GST) ve CAT enzim sistemleri ile flavonoidler, seruloplazmin, transferrin, GSH, askorbik asit, β -karoten ve α -tokoferol gibi son derece kompleks enzimatik olmayan antioksidan sistemler mevcuttur (9, 70).

Son yıllarda yapılan çalışmalarda, serbest radikallerin miyokard enfarktüsü, iskemi, ateroskleroz, nörolojik ve kas hastalıkları, astım, diyabet, katarakt, yaşlanma ve kanser gibi birçok hastalıkla ilişkili olduğu görülmektedir (71).

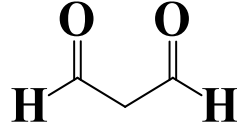
4.3. Oksidatif Stres

Organizmada serbest radikallerin oluşum hızı ile ortadan kaldırılma hızı bir denge içerisinde. Bu denge bozulmadığı sürece organizma serbest radikallerden etkilenmemektedir. Vücudumuzda oluşan serbest radikallerle antioksidan savunma sistemi arasında meydana gelen dengesizliğe oksidatif stres denilmektedir. Bu dengenin bozulması doku hasarına sebep olmaktadır. Oksidatif stres pek çok serbest oksijen radikallerinin oluşumuna yol açtığı gibi oluşan radikal ajanlar enzimlerin inhibisyonuna, lipid peroksidasyonuna, DNA hasarı gibi bozukluklara da yol açmaktadır (72-74).

Son yıllarda sistemik oksidatif stres derecesini belirlemek için serum ve eritrositlerde; lipid peroksidasyonun 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 (75, 76).

Şekil 7’de gösterilen MDA, iki veya daha fazla çift bağ içeren doymamış yağ asitlerinin peroksidasyonu sonucu oluşan aldehit yapılı bir yan üründür. Serbest amino asitler ve proteinlerle Schiff bazı oluşturabilir ve elektrofilik yapısından dolayı oldukça reaktif bir moleküldür. Kimyasal olarak ROS’tan daha kararlı olup membrandan kolayca geçebilmektedir (77).



Şekil 7. Malondialdehitin kimyasal yapısı (Ayala, 77)

MDA miktarı, lipid peroksidasyonunun derecesini gösterir. Ayrıca lipidlerin oksidatif yıkımının ve doku hasarının belirteci olarak da kullanılmaktadır (78).

4.3.1. Antioksidan Etki Mekanizmaları

Antioksidanlar, oksidan moleküllerin organizmaya zararlarını dört yolla engeller:

4.3.1.1. Süpürücü (*scavenging*) etki

Serbest oksijen radikallerini etkileyerek onları daha zayıf bir moleküle çevirme işlemidir. Antioksidan enzimler ve fenolik bileşikler bu tipte etki gösterirler.

4.3.1.2. Bastırıcı (*quencher*) etki

Bu etki, oksidan maddelere bir hidrojen aktararak aktivitelerini azaltır ve inaktif hale dönüştürür, çoğunlukla flavonoidler bu etkiye sahiptirler.

4.3.1.3. Onarıcı (*repair*) etki

Oksidanların oluşturduğu hasarı ortadan kaldırma şeklinde etki göstermektedir. Antioksidan özelliğe sahip polifenolik bileşikler, DNA tamir enzimlerinin aktivitelerini ve ekspresyonlarının indüklemesini gerçekleştirirler.

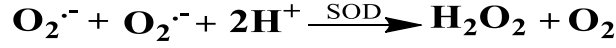
4.3.1.4. Zincir kırıcı (*Chain breaking*) etki

Serbest oksijen radikallerini bağlayarak, zincirlerini kırıp fonksiyonlarını engeller. Bu etkiyi hemoglobin, seruloplazmin, E vitamini ve mineraller gösterir (79).

4.3.2. Antioksidan Enzimler

4.3.2.1. Süperoksit Dismutaz (SOD)

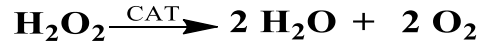
SOD (EC 1.15.1.1) süperoksit serbest radikal anyonunu hidrojen peroksite katalizleyen antioksidan enzimdir.



SOD, süperoksit radikalinin detoksifikasyonuna giden yolun birinci basamağını oluşturur. İkinci basamak katalaz ve glutatyon peroksidaz enzimleri tarafından H_2O_2 'nin suya dönüşümünü sağlamaktadır. Bu şekilde detoksifikasyon gerçekleşir (80).

4.3.2.2. Katalaz (CAT)

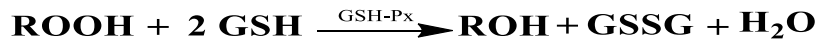
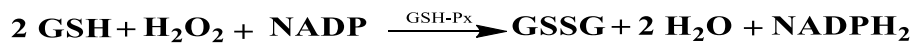
CAT (EC 1.11.1.6) 4 tane hem grubu bulunduran hemoproteindir. Tüm alt birimlerde enzim kararlılığında rol oynayan NADPH içermektedir. CAT oksijenli solunum yapan ve sitokrom sistemi içeren tüm hücrelerde bulunmaktadır. Hidrojen peroksiti, oksijen ve suya parçalar. CAT'ın karaciğer, böbrek, miyokard, çizgili kaslar ve eritrositlerde aktivitesi yüksektir (81).



CAT, fizyolojik şartlarda H_2O_2 'nin konsantrasyonunu düzenleyerek hücrelerde birikimini engeller ve hücreleri oksidatif hasara karşı korur (82).

4.3.2.3. Glutatyon Peroksidaz (GSH-Px)

GSH-Px (EC 1.11.1.9) dört selenyum içeren tetramerik yapıda sitozolik bir enzimdir. CAT gibi hücrede H_2O_2 'nin temizlenmesinde kullanılır ve hücreyi oksidatif hasara karşı korur. Karaciğer ve eritrositte bolca bulunmaktadır. GSH-Px; H_2O_2 ve lipit hidroperoksitlerinin indirgenmesini katalizler. Bu şekilde memeli hücreleri oksidatif hasara karşı korunmaktadır. GSH-Px enzimi H_2O_2 'nin indirgenmesi reaksiyonunda GSH'ı elektron vericisi olarak kullanır ve oluşan okside glutatyon (GSSG), NADPH bağımlı glutatyon redüktaz enzimi tarafından rejenere edilir (83).



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 4’te verilmiştir.

Tablo 4. Çalışmada kullanılan cihazlar, laboratuvar gereçleri ve malzemeler

Kullanılan Cihaz, Alet ve Malzeme	Marka
Çalkalayıcı	Nüve, SL 350
Dondurucu	Arçelik, Altus (-20 °C), Termoelectron Corporation (-80 °C)
Etüv	Gallenkamp
Hassas Terazı	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 100-1000 µL	Socorex
Otomatik Pipet 10-100 µL	Socorex
Otomatik Pipet 1-5 mL	Eppendorf
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 5'te verilmiştir.

Tablo 5. Çalışmada kullanılan kimyasal maddeler ve çözeltiler

Kullanılan Kimyasal Madde/Çözelti	Marka
Amonyum sülfat	Merck
Bakır (II) Klorür (CuCl_2)	Sigma
Bovine Serum Albumin (BSA)	Sigma
Disodyum Hidrojen Fosfat (Na_2HPO_4)	Merck
Dimetil Sülfoksit (DMSO)	Sigma
Etanol	Sigma
Etilendiamin Tetra Asetik Asit (EDTA)	Merck
Gliserol	Sigma
Hidrojen Peroksit (H_2O_2)	Sigma
Kloroform	Merck
Ksantin	Sigma
Ksantin Oksidaz	Sigma
Kuersetin	Sigma
Potasyum Dihidrojen Fosfat (KH_2PO_4)	Merck
Sodyum Bikarbonat (NaHCO_3)	Merck
Sodyum Dihidrojen Fosfat (NaH_2PO_4)	Merck
Sodyum Hidroksit (NaOH)	Sigma
Sodyum Karbonat (Na_2CO_3)	Merck
Sodyum Klorür (NaCl)	Merck
Sodyum meta-arsenit	Merck
Süperoksit Dismutaz (SOD) Standartı	Sigma
Tersiyer-Bütil hidroperoksit (t-BHP)	Sigma
Tiyobarbitürik asit (TBA)	Sigma
Trikloro Asetik Asit (TCA)	Sigma

5.2. Yöntem

5.2.1. Sulu Türk Polen Ekstraktının Hazırlanması

Türkiye'nin çeşitli yörelerinden toplanan polen örnekleri bir araya getirilip karıştırıldı ve Türk poleni toz karışımı elde edildi. Türk poleni numunelerinden 0.5'er gram alınarak falkon tüpüne aktarıldı ve 10 mL su ilave edilerek vortekslendi. Örnekler daha sonra çalkalayıcı inkübatörde 60 °C'de 24 saat süreyle sürekli çalkalanarak inkübe edildi. 24 saatlik inkübasyon sonrası ekstraktlar santrifüj yapılarak süzgeç kağıdı yardımıyla süzüldü. Böylece 50 mg/mL konsantrasyonda stok ekstraktlar hazırlandı ve denemelerde kullanılmak üzere buzdolabında -20 °C'de karanlıkta saklandı.

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 4 °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

1 987.8 µL PBS steril 15 mL'lik falkon tüpe alındı. Üzerine stok t-BHP şişesinden (7 989 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 KH_2PO_4 çözeltisi ve 6.08 mL 0.5 M K_2HPO_4 çözeltisi %0.9'lük 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 $\mu\text{g}/\text{mL}$ '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 paketleri üzerine 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 $750 \mu\text{M}$ t-BHP konsantrasyonu seçildi (Sonuçlar EK 1'de verilmiştir).

5.2.6. Deneyde Kullanılacak Sulu Türk Poleni Konsantrasyonunun Belirlenmesi

$50 \text{ mg}/\text{mL}$ 'lik sulu Türk poleni ekstraktından çeşitli konsantrasyonlarda ara stoklar hazırlandı. Eritrosit paketlerinin üzerine çeşitli konsantrasyonlarda sulu Türk poleni 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 $5\ 000 \mu\text{g}/\text{mL}$ seçildi (Sonuçlar EK 2'de verilmiştir).

5.2.7. Deneyde Kullanılacak Kuersetin Konsantrasyonunun Belirlenmesi

$1 \text{ mg}/\text{mL}$ 'lik kuersetin ekstraktından çeşitli konsantrasyonlarda ara stoklar hazırlandı. Eritrosit paketlerinin üzerine çeşitli konsantrasyonlarda ($1\text{-}10 \mu\text{g}/\text{mL}$) kuersetin eklenip, 2 saat 37°C 'de inkübasyona bırakıldı. Daha sonra $750 \mu\text{M}$ 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 $\mu\text{g}/\text{mL}$ seçildi (Sonuçlar EK 3’de verilmiştir).

5.2.8. Deney Grupları

Deney grupları Tablo 6’da oluşturuldu. Pipetlemeler μL olarak yapıldı.

Tablo 6. Deney grupları

Hacim (μL)	Kontrol Grubu	Sulu Türk Poleni Grubu	Pozitif Kontrol (Kuersetin) Grubu	Negatif Kontrol (t-BHP)
Eritrosit Hemolizati (Hct: %10)	2000	1694.6	1967.6	1969.6
Sulu Türk Poleni (5000 $\mu\text{g}/\text{mL}$)	-	225	-	-
Kuersetin (2 $\mu\text{g}/\text{mL}$)	-	-	2	-
t-BHP (750 μM)	-	30.4	30.4	30.4

37 °C’de 2 saat karanlıkta inkübasyona bırakıldı.

37 °C’ de 1 saat karanlıkta inkübasyona bırakıldı.

5.2.9. Eritrosit Süperoksit Dismutaz (SOD) Aktivitesi Tayini

Süperoksit dismutaz aktivitesi, Sun ve Oberley (84) 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 çözüldü.

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

150 µL NBT Çözeltisi: 4.9 mg NBT 40 mL deiyonize suda çözüldü. NBT günlük olarak taze hazırlandı.

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

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

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

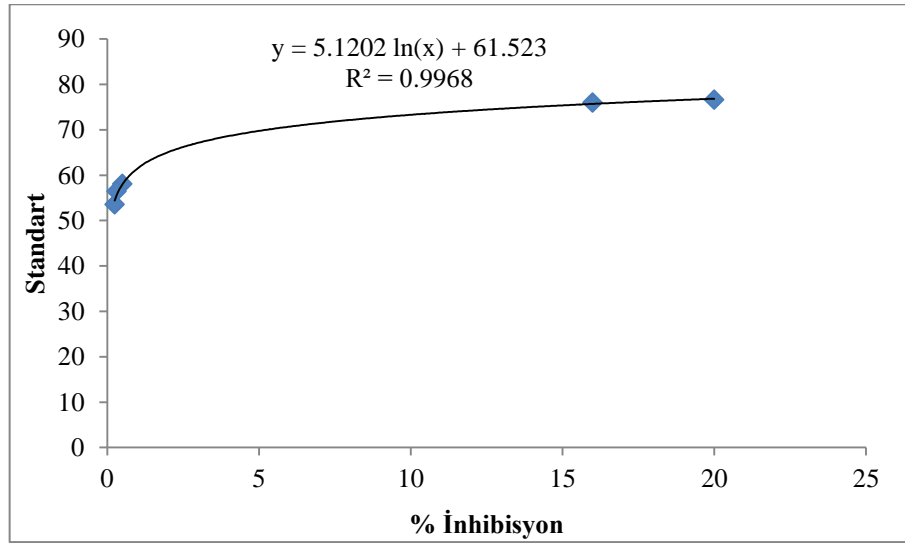
100 µL eritrosit paketi 900 µL soğuk saf su ile karıştırılıp hemoliz edildi. Elde edilen hemolizata 800 µL etanol:kloroform (5:3) karışımı eklenip vortekslendi. 18 000 g'de 4 °C'de bir saat santrifüj edildi. Elde edilen süpernatant SOD ve CAT aktivitesinin yanı sıra TAK ve TOK ölçümünde kullanıldı.

Tablo 7. SOD aktivitesi ölçümü

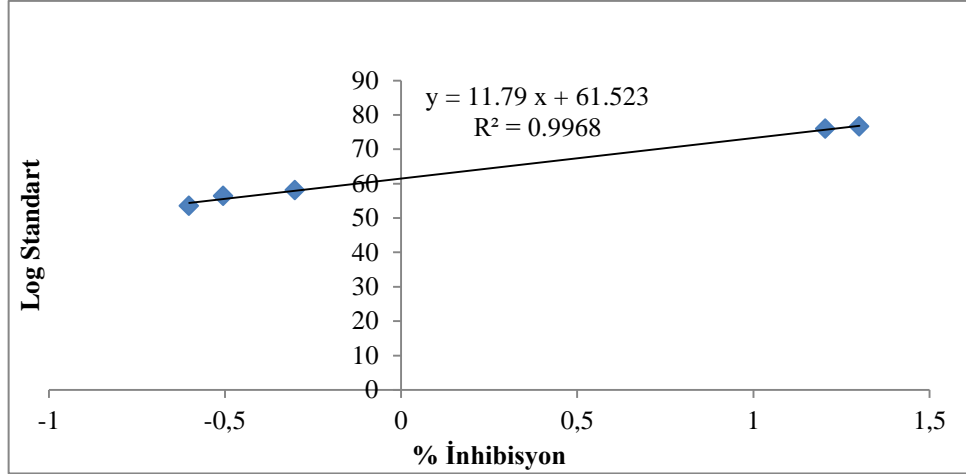
Çözeltiler	Hacim (mL)
Reaksiyon karışımı	1.225
Süpernatant	0.25
Ksantin oksidaz	0.025
25 °C’de 20 dakika inkübasyona (karanlıkta) bırakıldı.	
Bakır Klorür	0.5
560 nm’de absorbans ölçüldü.	

Tablo 7’de ifade edildiği gibi çeşitli işlemler yapıldı ve 560 nm de absorbanlar ölçüldü. Hesaplamalar % inhibisyon olarak hesaplandı. Şekil 8’deki standart grafiği SOD aktivitesinin logaritması alınarak Şekil 9’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 8. Standart SOD aktivitesi ve % inhibisyon grafiği



Şekil 9. Log (Standart SOD aktivitesi) ve % inhibisyon grafiği

5.2.10. Eritrosit Katalaz (CAT) Aktivitesi Tayini

Katalaz aktivitesi, temel prensibi amonyum molibdatın hidrojen peroksit ile oluşturduğu sarı renkli kompleksin 405 nm’de absorbansının ölçülmesi esasına dayanan Goth (85) 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 8. 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	100 μL	100 μL	100 μL
405 nm’de absorbansları okundu.			

Tablo 8’de ifade edilen işlemler yapıldı. Ölçülen absorbans değerleri aşağıdaki denklemde yerlerine konularak katalaz aktivitesi hesaplandı. Sonuçlar hemoglobinin miktarlarına bölünerek U/g Hb olarak ifade edildi.

$$\text{Katalaz aktivitesi (U/(mL))} = \frac{(A_{\text{Kör}_2} - A_{\text{numune}}) \times 271}{(A_{\text{Kör}_2} - A_{\text{Kör}_1})}$$

5.2.11. Eritrosit MDA Seviyesinin Belirlenmesi

Eritrosit MDA seviyesi Stocks ve Dormandy (68) 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 KH_2PO_4 çözeltisi ve 6.08 mL 0.5 M K_2HPO_4 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 NaN_3 100 mL PBS’de çözüldü.

TBA Çözeltisi: 0.1 g TBA 500 μL 1N NaOH çözeltisinde çözümlenerek 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.

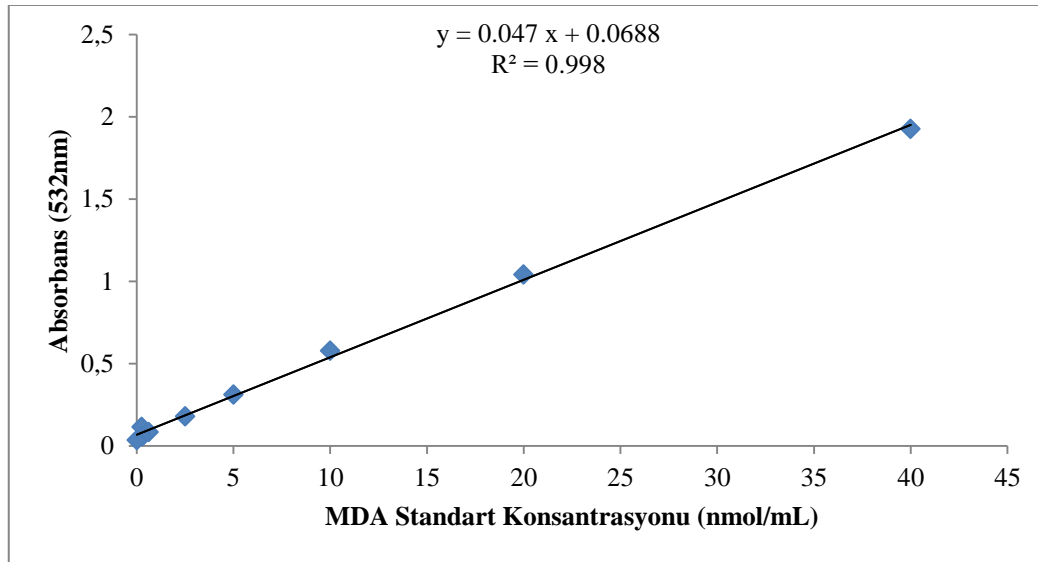
Sodyum Arsenit Çözeltisi: 0.52 g sodyum meta-arsenit 20 mL % 28’lik TCA’da çözüldü.

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

Tablo 9’da ifade edildiği gibi işlemler gerçekleştirildi. Şekil 10’daki MDA standart grafiğinden yararlanılarak örneklerdeki MDA konsantrasyonu hesaplandı. Belirlenen MDA düzeyleri hemoglobinin değerlerine bölünerek ifade edildi.

Tablo 9. 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
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 mikroye aktarıldı ve 532 nm’de absorbansları okundu.	



Şekil 10. MDA standart absorbans grafiği

5.2.12. Eritrosit TOK 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 iyona kümülatif olarak oksitlemesine dayanan, kolorimetrik yöntemle yapıldı. Sonuçlar $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ equivalent/L olarak belirtildi (76).

5.2.13. Eritrosit TAK 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 trolox equivalent/L olarak ifade edildi (87).

5.3. İstatistiksel Analizler

Veriler SPSS 22 (Statistical Package for the Social Sciences) bilgisayar paket programına aktarılarak, 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. Grup içi parametreler arasındaki ilişki “Pearson” veya “Spearman” korelasyon testi kullanılarak incelendi. Elde edilen değerler, aritmetik ortalama \pm standart sapma ($x \pm S.D$) olarak ifade edildi ve $p < 0.05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

6. BULGULAR

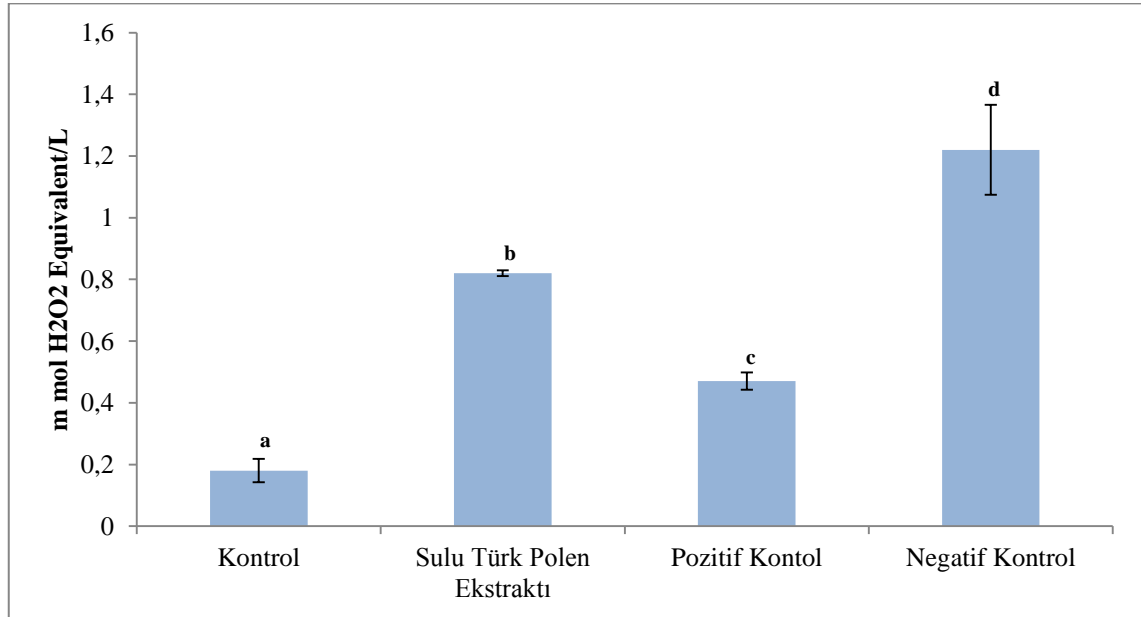
6.1. Eritrosit Toplam Oksidan Kapasite (TOK) Seviyesi

Grupların toplam antioksidan kapasite (TOK) seviyeleri, Tablo 10 ve Şekil 11’de gösterildi.

Tablo 10. Eritrosit TOK Seviyeleri

Grup (n=3)	Eritrosit TOK (μ mol H ₂ O ₂ Equivalent/L)	Anova, p
Kontrol	0.18 \pm 0.038 ^a	0.0001
Sulu Türk Polen Ekstraktı	0.82 \pm 0.009 ^b	
Pozitif Kontrol (Kuersetin)	0.47 \pm 0.028 ^c	
Negatif Kontrol (t-BHP)	1.22 \pm 0.146 ^d	

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



Şekil 11. Eritrosit TOK seviyeleri

Çalışmamızda elde edilen bulgulara göre; sulu Türk polen ekstrakt grubunda negatif kontrol grubuna göre toplam oksidan kapasite anlamlı derecede düşük bulundu.

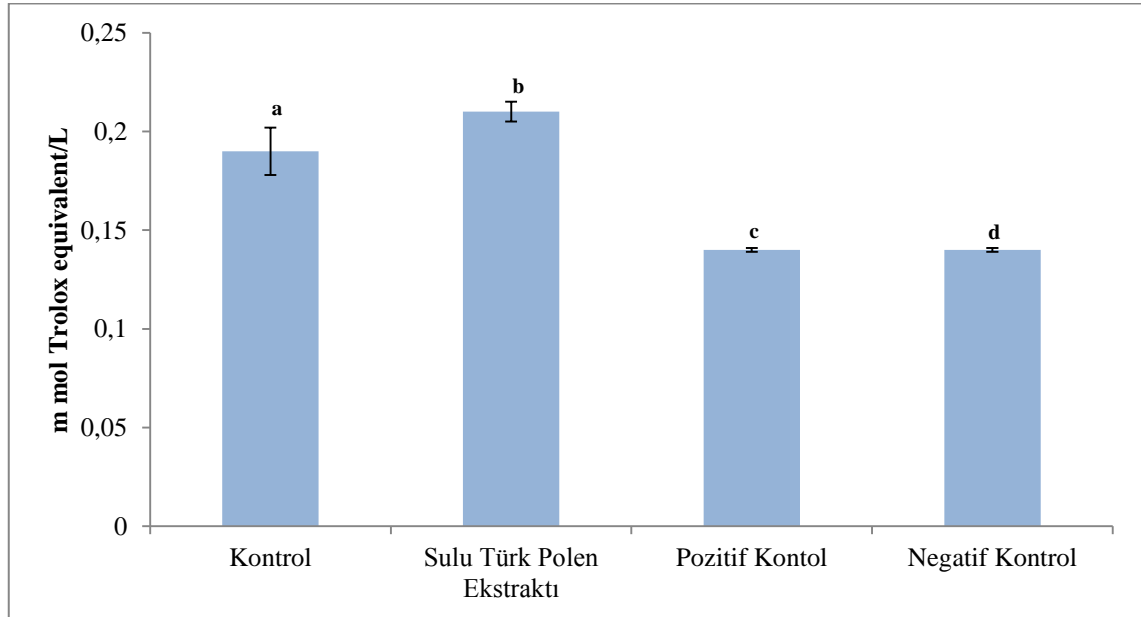
6.2. Eritrosit Toplam Antioksidan Kapasite (TAK) Seviyesi

Grupların toplam antioksidan kapasite (TAK) seviyeleri, Tablo 11 ve Şekil 12’de gösterildi.

Tablo 11. Eritrosit TAK Seviyeleri

Grup (n=3)	Eritrosit TAK (mmol Trolox equivalent/L)	Kruskal-Wallis, p
Kontrol	0.19 ± 0.012 ^a	0.02
Sulu Türk Polen Ekstraktı	0.21 ± 0.005 ^b	
Pozitif Kontrol (Kuersetin)	0.14 ± 0.001 ^c	
Negatif Kontrol (t-BHP)	0.14 ± 0.001 ^d	

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



Şekil 12. Eritrosit TAK seviyeleri

Çalışmamızda elde edilen bulgulara göre; sulu Türk polen ekstrakt grubunda negatif kontrol grubuna göre toplam antioksidan kapasite anlamlı derecede yüksek bulundu.

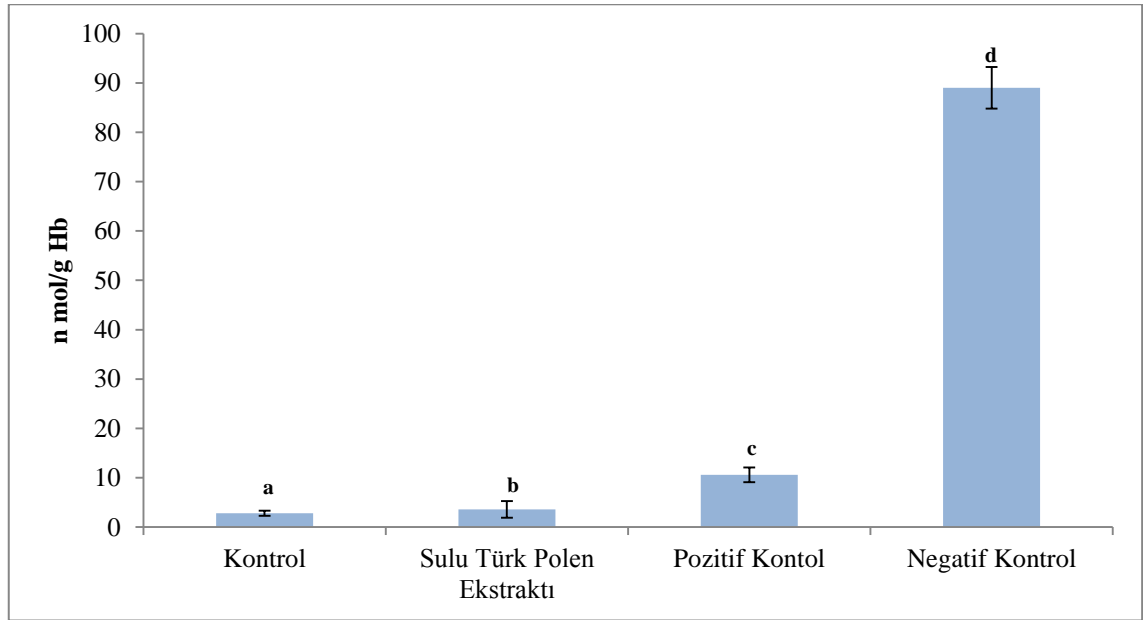
6.3. Eritrosit MDA Seviyeleri

Grupların MDA seviyeleri, Tablo 12 ve Şekil 13'te gösterildi.

Tablo 12. Eritrosit MDA seviyeleri

Grup (n=3)	Eritrosit MDA (nmol/g Hb)	Kruskal-Wallis, p
Kontrol	2.81 ± 0.52 ^a	0.0001
Sulu Türk Polen Ekstraktı	3.6 ± 1.68 ^b	
Pozitif Kontrol (Kuersetin)	10.6 ± 1.49 ^c	
Negatif Kontrol (t-BHP)	89.7 ± 4.29 ^d	

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



Şekil 13. Eritrosit MDA seviyeleri

Çalışmamızda elde edilen bulgulara göre; eritrosit paketlerinde sulu Türk polen ekstrakt grubunun MDA seviyesi, negatif kontrole göre anlamlı derecede düşük bulundu. MDA seviyesinin anlamlı derecede düşük olması oksidatif hasarı önlemek için verilen 5 000 µg/mL sulu Türk polen ekstraktının antioksidan etki göstererek, reaktif oksijen radikallerinin temizlenmesi sonucu, lipid peroksidasyonunu önleyici yönde etki ettiğini göstermektedir.

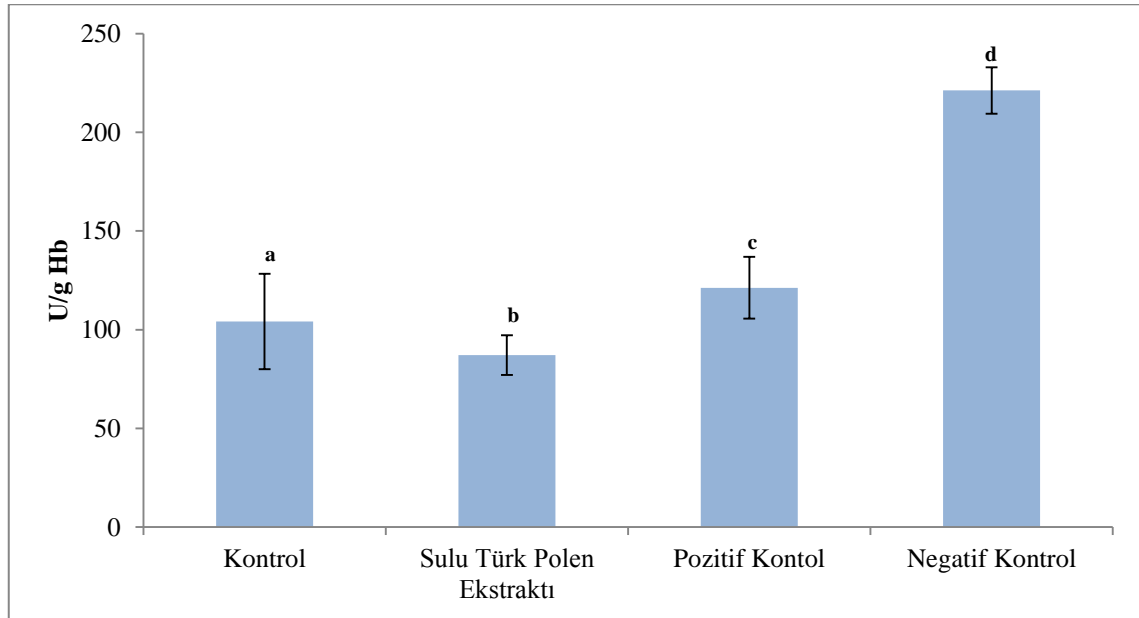
6.4. Eritrosit Süperoksit Dismutaz (SOD) Aktivitesi

Grupların SOD aktiviteleri, Tablo 13 ve Şekil 14’te gösterildi.

Tablo 13. Eritrosit SOD aktiviteleri

Grup (n=3)	Eritrosit SOD Aktivitesi (U/g Hb)	Anova, p
Kontrol	104.2 ± 24.17 ^a	0.0001
Sulu Türk Polen Ekstraktı	87.1 ± 10.1 ^b	
Pozitif Kontrol (Kuersetin)	121.2 ± 15.64 ^c	
Negatif Kontrol (t-BHP)	221.2 ± 11.77 ^d	

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



Şekil 14. Eritrosit SOD seviyeleri

Çalışmamızda elde edilen bulgulara göre; eritrosit lizatında, sulu Türk polen ekstrakt grubunun negatif kontrole göre SOD enzim aktivitesinin anlamlı derece düşük bulunması, oksidatif hasarı önlemek için verilen 5 000 µg/mL sulu Türk polen 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.

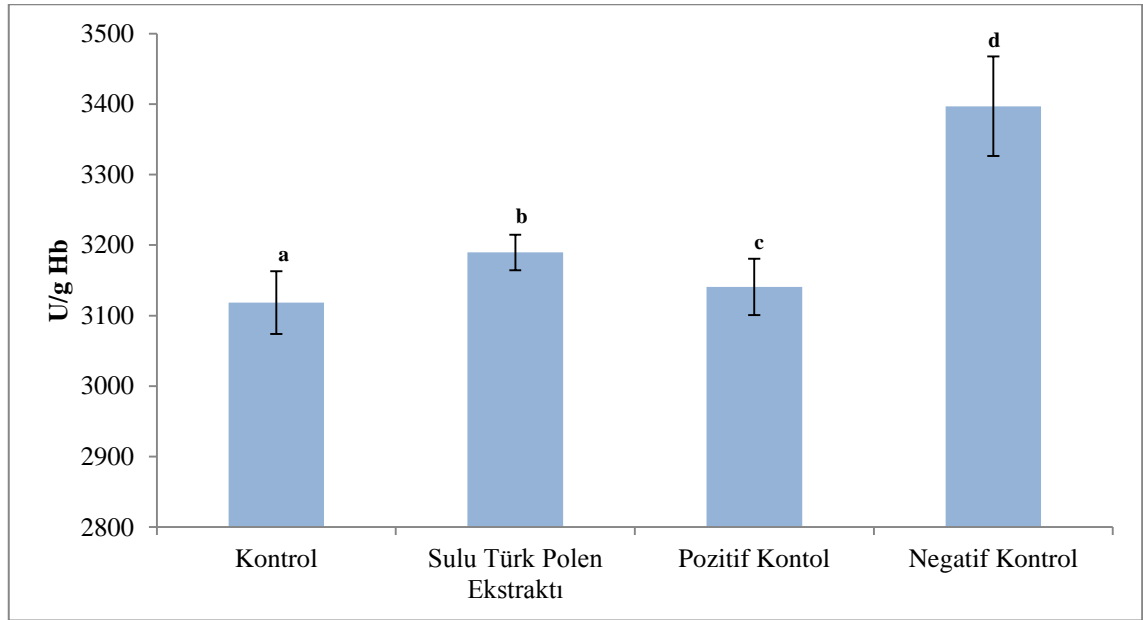
6.5. Eritrosit Katalaz (CAT) Aktivitesi

Grupların CAT aktiviteleri, Tablo 14 ve Şekil 15'te gösterilmiştir.

Tablo 14. Eritrosit CAT Aktiviteleri

Grup	Eritrosit CAT Aktivitesi (U/g Hb)	Anova, p
Kontrol	3118 ± 44.41 ^a	0.0001
Sulu Türk Polen Ekstrakt	3189 ± 25.20 ^b	
Pozitif Kontrol (Kuersetin)	3140 ± 40.00 ^c	
Negatif Kontrol (t-BHP)	3396 ± 70.60 ^d	

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



Şekil 15. Eritrosit CAT seviyeleri

Çalışmamızda elde edilen bulgulara göre; eritrosit lizatında, sulu Türk polen ekstrakt grubunun negatif kontrole göre CAT enzim aktivitesinin anlamlı derece düşük bulunması, oksidatif hasarı önlemek için verilen 5 000 µg/mL sulu Türk polen 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 güçlendirdiğini göstermektedir.

Çalışmamız sonucunda oksidatif stres biyobelirteçleri arasında yapmış olduğumuz korelasyon testine göre; MDA'nın CAT, SOD ve TOS ile arasında pozitif korelasyon vardır. CAT'ın TOS ile arasında pozitif korelasyon vardır. SOD'un MDA ile arasında pozitif korelasyon var iken TAS ile arasında negatif korelasyon vardır. TAS'ın SOD ile arasında negatif korelasyon vardır (Tablo 15).

Tablo 15. Ölçülen Oksidatif Stres Biyobelirteçlerinin Korelasyon Tablosu

n=12	MDA	CAT	SOD	TAS	TOS
MDA	----	r: 0.903 p<0.01	r: 0.95 p<0.01	r: -0.446 p>0.05	r: 0.793 p<0.01
CAT	r: 0.357 p>0.05	----	r: 0.336 p>0.05	r: -0.140 p>0.05	r: 0.783 p<0.01
SOD	r: 0.818 p<0.01	r: 0.336 p>0.05	----	r: -0.828 p<0.01	r: 0.469 p>0.05
TAS	r: -0.446 p>0.05	r: -0.173 p>0.05	r: -0.580 p<0.05	----	r: 0.107 p>0.05
TOS	r: 0.399 p>0.05	r: 0.783 p<0.01	r: 0.469 p>0.05	r: -0.193 p>0.05	----

7. TARTIŞMA ve SONUÇ

Günümüzde kullanılan sentetik ilaçların tedavilerinin yanında hastalığa neden olan birçok yan etkileri de vardır ve bu etkiler insanları doğal ilaç olarak bilinen ürünlerin tüketimine yöneltmiştir. Bu doğal ürünler arasında en yaygın olarak kullanılanlardan birisi de arı ürünleridir (88).

Arı ürünleri insanlar tarafından eski çağlardan beri önemli bir besin maddesi ve ilaç olarak kullanılmaktadır. Bu ürünler üretildiği bölgenin coğrafik yapısı ve bitkisel özelliklerine bağlı olarak değişiklik göstermektedir. Arı ürünleri birçok hastalığın ilerlemesini durdurmada, ağrıların azaltılmasında ve hastalıkların tedavisinde kullanılmıştır. Arı ürünleri arasında yaygın olarak kullanılanlardan biri de arı polenidir. Polen, çiçekli bitkilerden arılar tarafından toplanarak nektar ve arı salgıları ile karıştırılıp üretilen, fitokimyasallar bakımından zengin içeriğe sahip toz benzeri doğal bir arı ürünüdür (1, 6).

Polen insan metabolizması için çok önemli besin maddelerini içermektedir. Polen, yapısında lipidler, karbohidratlar, proteinler, vitaminler, karotenoidler, fenolik ajanlar ve fitokimyasalları barındıran biyolojik olarak son derece aktif önemli bir doğal üründür. Sahip olduğu besinsel özellikler ve sağlık etkileri sebebiyle geleneksel tıpta, alternatif diyetlerde ve gıda takviyesi olarak uzun zamandır kullanılmaktadır (4, 89).

Polendeki temel biyolojik bileşenler olan fenolik asitlerin, polifenolik bileşiklerin ve en çok da glikozit türevlerinin antioksidan özellikleri ile süperoksit anyonları, lipid peroksit radikallerini temizledikleri ve serbest radikaller ile ilişkili olaylarda hidrojenasyon veya kompleks yapılar oluşturarak okside edici ajanları stabilize edebildikleri gösterilmiştir (90).

Polen 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 (91-93).

Yapılan çalışmalar sonucunda *in vitro* şartlarda model hücre olarak eritrositler seçildi. Bunun nedeni eritrositlerin kanın şekilli elemanlarının % 99'unu oluşturan

çekirdek, mitokondri ve endoplazmik retikulum gibi hücre organellerine sahip olmayan, akut oksidatif hasar çalışmaları için uygun bir model hücre olmasıdır. Eritrositler hücre içi ve hücre dışı sürekli olarak oksidatif strese maruz kalırlar. Eritrositlerde bulunan hemoglobin molekülü Fe^{2+} ve bir O_2 molekülünü bağlayabilecek dört porfirin halkasından oluşmaktadır. Demirin oksidasyonu sonucu ($Fe^{2+} \rightarrow Fe^{3+}$) hemoglobin kahverengi bir pigment olan methemoglobine dönüşerek aktivitesini kaybeder. Methemoglobin doğal olarak oksitlenmiş bir metabolittir ve $NADP^+$ ile $NADPH$ 'ye bağımlı redüktazlar gibi spesifik enzim sistemleri tarafından minimum seviyede tutulur (94, 95).

Oksidatif hücre hasarı mekanizmalarını kapsayan çalışmalarda organik bir hidroperoksit olan t-BHP kullanıldı. Literatürde polenin t-BHP ile *in vitro* şartlarda akut oksidatif hasara karşı koruyucu etkisinin incelendiği herhangi bir çalışma bulunmadı. t-BHP, alkoksil ve peroksil radikallerine dönüşerek daha reaktif bir radikal olan hidroksil oluşumuna neden olmaktadır ve akut oksidatif hasar çalışmalarında yaygın olarak kullanılmaktadır (96, 97).

Ayrıca t-BHP'nin membrana bağlı enzimleri seçici olarak inhibe ettiği, methemoglobin oluşumunu artırdığı ve bazı membran proteinlerinin yüksek molekül ağırlıklı polimerlerin kümeleşmesine neden olduğu belirtilmiştir (98).

t-BHP, hemoglobin ile etkileşime girdiğinde t-bütoksil radikali oluşur. Bu radikal membran lipidleri ile tepkimeye girerek lipid peroksidasyonunu başlatır ve bu zincir reaksiyonları malondialdehit, aldehit ve keton gibi çeşitli reaksiyonların son ürünleri oluşuncaya kadar devam eder (99, 100).

Çalışmamızda kullanılmak üzere Türkiye'nin Doğu Karadeniz bölgesinden toplanan polen örnekleri bir araya getirildi ve Türk poleni karışımı elde edildi. Gerekli işlemler sonucunda 50 mg/mL konsantrasyonda sulu stok ekstrakt hazırlandı.

Günümüzde doğal ürünlerden izole edilmiş flavonoid türleri ile antioksidan çalışmalar yapılmaktadır. Biz çalışmamızda doğal ve yöresel bir ürünümüz olan poleni kullanarak hem antioksidan etkisini ortaya koymayı hem de antioksidan etkinliği bilinen kuersetin molekülüne karşın polenin sinerjik etkisinin olup olmadığını belirlemeyi amaçladık. Ancak doğal ürünlerin insanlar için kullanılabilirliğini belirlemede yapılacak ön çalışmalarda öncelikle *in vitro* metodların kullanılması önerilmektedir. Klinik

denemeler *in vitro* çalışmalardan olumlu sonuçların alınması durumunda tavsiye edilmektedir. Üstelik gerek *in vitro* gerekse *in vivo* çalışmalarda alınan olumlu sonuçların klinik çalışmalarda her zaman öngörüldüğü şekilde elde edilemeyeceği de vurgulanmaktadır.

Çalışmamızda elde edilen verilere göre; eritrosit paketlerinde sulu Türk polen ekstrakt grubunun MDA seviyesinde, negatif kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı derecede düşük fark bulundu. MDA seviyesinde anlamlı fark olması, oksidatif hasarı önlemek için verilen 5 000 µg/mL'lik konsantrasyonda kullanılan sulu Türk polen ekstraktının antioksidan etki göstererek reaktif oksijen radikallerini temizlemesi sonucu, lipid peroksidasyonunu önleyici yönde etki ettiğini göstermektedir. Yapılan birçok çalışmada polenin, içerdiği çeşitli bileşikler sayesinde güçlü bir antioksidan aktiviteye sahip olduğu doğrulanmıştır.

Aliyazıcıoğlu ve arkadaşlarının yaptıkları bir çalışmada polenin DMSO'lu ekstraktlarının konsantrasyona bağlı olarak K-562 kanser hücrelerinde solunumsal patlamayı inhibe ettiği flow-sitometrik analizlerle ortaya konulmuş ve polen ekstraktlarının bu etkiyi antioksidan özellikleri ile gerçekleştirdiği savunulmuştur (19).

Rzepecka-Stojko ve arkadaşları polenin sitoplazmada, hücre organellerinde ve hücre dışı sıvıda oksidatif yapı hasarına karşı koruyucu antioksidan kaynağı olduğunu ve aynı zamanda besin değeri yüksek bir ürün olduğunu belirtmişlerdir (34).

Tahmaz ve arkadaşları polen ekstraktlarının eritrosit lipid peroksidasyonu üzerine etkilerinin incelenmesinde polenin *in vitro* şartlarda lipid peroksidasyonunu inhibe ettiğini bulmuşlardır (101).

Ishikawa ve arkadaşları polenin farelere oral yoldan uygulanmasında lipid peroksidasyonunun bir göstergesi olan MDA'nın plazma konsantrasyonunu azalttığını belirtmişlerdir (102).

Gerigelmez ve arkadaşları flow-sitometrik bulgular ve kaspaz-3 aktiviteleri, lenfoid ve miyeloid hücre serileri için karşılaştırıldığında apoptozisin tabii polen ekstraktlar tarafından indüklendiğini buldular ve kaspaz-3 aktivitelerinin 50 mg/mL'lik konsantrasyonda beş kata kadar arttığını gözlemlədiler. Polenin kaspaz-3 aktivasyonu artırılarak miyeloid hücre serilerinde apoptozisi indüklediği sonucuna vardılar (7).

Eraslan ve arkadaşları poleninın sıçanda, öncülün toksisitesine karşı koruyucu etkisinin değerlendirilmesinde oksidatif stres belirteçleri (MDA, CAT, SOD, GSH-Px) ve bazı biyokimyasal parametreleri analiz etmişlerdir. Elde edilen verilere göre, araştırılan biyokimyasal parametrelerin çoğunda öncülün olumsuz değişikliklere neden olduğu tespit edilmiş ve poleninın uygulanmasının bu etkileri azalttığı belirlenmiştir. Ayrıca, karbaril pestisitinin sıçanlarda oluşturduğu oksidatif stres parametrelerini incelemişler ve polen ekstraktlarının tedavi edici etkisini bulmuşlardır (92, 103).

Hsiao ve arkadaşları SOD enziminin lipid peroksitler veya reaktif oksijen türleri tarafından kolayca inaktive olduğunu ve karaciğer hücrelerinde reaktif oksijen türlerinin hidrojen peroksit ve moleküler oksijene dönüşümünü katalizleyen önemli bir enzim olduğunu belirtmişlerdir (104).

Çalışmamızda elde edilen verilere göre; eritrosit paketlerinde sulu Türk polen ekstrakt grubunun SOD ve CAT enzim aktivitesinde negatif kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı derecede düşük fark bulundu. Oksidatif hasarı önlemek için verilen 5 000 µg/mL sulu Türk polen ekstraktının antioksidan etki göstererek ortamdaki serbest oksijen radikallerini uzaklaştırdığı veya metabolize ettiği gözlenmiştir. SOD ve CAT'ın enzim aktivitesi radikallerin etkisini engelleyerek tüketimini azaltır ve endojen antioksidan sistemi güçlendirir. Yapılan diğer çalışmalar bizim bulgularımızla uygunluk göstermektedir.

Zhang ve arkadaşları antioksidan enzim aktiviteleri ve lipid oksidasyonu çalışmasında tüm işlem boyunca, polen ekstraktı ve flavonoidlerin ilavesi ile endojen antioksidan enzimlerinin (GSH-Px, SOD ve CAT) hücre içi enzim tüketimini azalttığını belirtmişlerdir (105).

Abdallah ve arkadaşları insan HepG₂ hücrelerinde fenolik bileşiklerin t-BHP ile uyarılmış oksidatif hasara karşı koruyucu etkilerinin incelenmesinde, t-BHP'nin hücrelerde SOD enzim aktivitesini istatistiksel olarak anlamlı derecede artırdığı görülmüştür (106).

Bais ve arkadaşları insan eritrosit ve lökosit hücrelerinde *Amorphophallus campanulatus* bitki ekstraktlarının H₂O₂ ile uyarılmış oksidatif hasara koruyucu etkilerinin incelenmesinde, H₂O₂'in eritrosit ve lökositlerde SOD enzim aktivitesini istatistiksel olarak anlamlı derecede artırdığı görülmüştür (107).

Slamenova ve arkadaşları insan HepG₂ hücrelerinde yapmış oldukları çalışmada t-BHP'ye bağlı SOD enzim aktivitesinin normal hücre serilerine göre istatistiksel olarak anlamlı derecede artırdığı görülmüştür (108).

Sonuç olarak bu çalışmada ilk defa sulu Türk polen ekstraktının *in vitro* şartlarda, insan eritrosit hücrelerinde t-BHP ile uyarılmış oksidatif hasara karşı koruyucu etkiye sahip olabileceği ortaya konuldu. Buradan hareketle sulu Türk polen ekstraktının antioksidan etkinliği de görülmüştür. Elde edilen veriler çeşitli *in vitro* ve *in vivo* çalışmaların öncüsü niteliğindedir. Bu çalışmalardan da elde edilen olumlu verilerle polenin alternatif, tamamlayıcı doğal bir ürün olarak kullanılması öngörülmektedir.

8. KAYNAKLAR

1. Agüero MB, Svetaz L, Sanchez M, Luna L, Lima B, Lopez ML, Zacchino S, Palermo J, Wunderlin D, Feresin GE, Tapia A (2011). Argentinean Andean propolis associated with the medicinal plant *Larrea nitida* Cav (Zygophyllaceae). HPLC-MS and GC-MS characterization and antifungal activity. *Food Chem Toxicol* 49: 1970-1978.
2. Oses SM, Pascual-Mate A, Fernandez-Muino MA, Lopez-Diaz TM, Sancho MT (2016). Bioactive properties of honey with propolis. *Food Chem* 196: 1215-1223.
3. Campos MG, Cunha A, Markham KR (1997). Bee-pollen-composition, properties, and applications. *Bee Products*: 93-100.
4. Denisow B, Denisow-Pietrzyk M (2016). Biological and therapeutic properties of bee pollen: a review. *J Sci Food Agric* 96: 4303-4309.
5. Yıldız O (2011). Bir gıda maddesi olarak kestane polenin kimyasal bileşimi, biyoaktif özellikleri ve karaciğer hasarını önlemedeki rolü. Doktora tezi, Karadeniz Teknik Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Trabzon.
6. Ishikawa Y, Tokura T, Nakano N, Hara M, Niyonsaba F, Ushio H, Yamamoto Y, Tadokoro T, Okumura K, Ogawa H (2008). Inhibitory effect of honeybee-collected pollen on mast cell degranulation in vivo and in vitro. *J Med Food* 11: 14-20.
7. Gerigelmez AY (2003). Miyeloid kanser hücre serilerinde polen ekstraktlarının kaspaz-3 aktivitesi üzerine etkileri. Yüksek Lisans Tezi, Karadeniz Teknik Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Trabzon.
8. Valko M, Rhodes CJ, Moncol J, Izakovic M, Mazur M (2006). Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem Biol Interact* 160: 1-40.
9. 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.

10. Haro A, Lopez-Aliaga I, Lisbona F, Barrionuevo M, Alferez MJ, Campos MS (2000). Beneficial effect of pollen and/or propolis on the metabolism of iron, calcium, phosphorus, and magnesium in rats with nutritional ferropenic anemia. *J Agric Food Chem* 48: 5715-5722.
11. Krukoski DW, Comar SR, Claro LM, Leonart MS, Nascimento AJ (2009). Effect of vitamin C, deferoxamine, quercetin and rutin against tert-butyl hydroperoxide oxidative damage in human erythrocytes. *Hematology* 14: 168-172.
12. Çolak M (2009). Arı poleni ve propolisinin metastatik insan prostat kanseri hücre serilerinde voltaj kapılı sodyum kanalları ekspresyonu üzerine etkisi. Doktora tezi, Karadeniz Teknik Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Trabzon.
13. Kumova U, Korkmaz A (1998). Bal arılarının (*Apis mellifera L*) topladığı polenin özellikleri ve kullanım olanakları. *Teknik Arıcılık Dergisi* 61: 2-10.
14. Crane E (1996). The past and present importance of bee products to man. *Bee Products Properties, Applic and Apit*: 1-12.
15. Lorch J (1978). Discovery of Nectar and Nectaries and Its Relation to Views on Flowers and Insects. *Isis* 69: 514-533.
16. Liebelt RA, Lyle D, Walker J (1994). Effects of a Bee Pollen Diet on Survival and Growth of Inbred Strains of Mice. *Am Bee J* 134: 615-620.
17. Keskinoğlu Z (2013). Türkiye'deki Rosa L. cinsine ait bazı eski bahçe güllerinin polen morfolojisi. Yüksek Lisans Tezi, Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Isparta.
18. Bogdanov S (2014). Pollen: production, nutrition and health. *Bee Pro Sci*.
19. Aliyazicioglu Y, Deger O, Ovali 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. *Int Immunopharmacol* 5: 1652-1657.
20. Genç F, Dodoloğlu A (2002). Arıcılığın Temel Esasları. Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları, No:166, Erzurum.
21. Tümerdem Ç (2016). Beypazarı ballarında polen analizi. Yüksek lisans tezi, Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.

22. Sorkun K (2002). Honey Origin and Types from Turkey. The First German Congress for Bee Products and Apitherapy, Deutschland, Passau, P-62.
23. Szczêsna T (2006). Protein content and amino acid composition of bee-collected pollen from selected botanical origins. *J Apic Sci* 50 (2): 81-90.
24. Szczêsna T (2002). Sugar composition of pollen loads harvested at different periods of the beekeeping season. *J Apic Sci* 46: 107-114.
25. Luthria DL (2006). Significance of sample preparation in developing analytical methodologies for accurate estimation of bioactive compounds in functional foods. *J Sci Food Agric* 86: 2266-2272.
26. Carpes ST, Mourão GB, Alencar SM, Masson ML (2009). Chemical composition and free radical scavenging activity of *Apis mellifera* bee pollen from Southern Brazil. *Braz J Food Technol* 12: 220-229.
27. Çakıroğlu TN (2017). Türk propolisinin sulu ve etanollü ekstraktının HPLC ve GC-MS ile karakterizasyonu. Doktora tezi, Karadeniz Teknik Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Trabzon.
28. Arraez-Roman D, Zurek G, Bassmann C, Almaraz-Abarca N, Quirantes R, Segura-Carretero A, Fernandez-Gutierrez A (2007). Identification of phenolic compounds from pollen extracts using capillary electrophoresis-electrospray time-of-flight mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem* 389: 1909-1917.
29. Gawlik-Dziki U (2004). Phenolic acids as bioactive compounds in food products. *Zywnosc Nauka Technol Jakosc* 4: 29-40.
30. Rice-Evans CA, Miller NJ, Paganga G (1996). Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radic Biol Med* 20: 933-956.
31. Serra Bonvehi J, Soliva Torrento M, Centelles Lorente E (2001). Evaluation of polyphenolic and flavonoid compounds in honeybee-collected pollen produced in Spain. *J Agric Food Chem* 49: 1848-1853.
32. Iriti M (2011). Editorial: introduction to polyphenols, plant chemicals for human health. *Mini Rev Med Chem* 11: 1183-1185.

33. Cook NC, Samman S (1996). Flavonoids-Chemistry, metabolism, cardio protective effects, and dietary sources. *J Nutr Biochem* 7: 66-76.
34. Rzepecka-Stojko A, Stojko J, Kurek-Gorecka A, Gorecki M, Kabala-Dzik A, Kubina R, Mozdierz A, Buszman E (2015). Polyphenols from bee pollen: Structure, Absorption, Metabolism and Biological Activity 20: 21732-21749.
35. Sandhar HK, Kumar B, Prasher S (2011). A review of phytochemistry and pharmacology of flavonoids. *IPS* 1: 25-41.
36. Han XZ, Shen T, Lou HX (2007). Dietary polyphenols and their biological significance. *Intern J of Mol Sci* 8: 950-988.
37. Bartosz G (2003). Total antioxidant capacity. *Adv Clin Chem* 37: 219-292.
38. Nakajima Y, Tsuruma K, Shimazawa M, Mishima S, Hara H (2009). Comparison of bee products based on assays of antioxidant capacities. *BMC Compl and Alter Med* 9.
39. Graikou K, Kapeta S, Aligiannis N, Sotiroudis G, Chondrogianni N, Gonos E, Chinou I (2011). Chemical analysis of Greek pollen - Antioxidant, antimicrobial and proteasome activation properties. *Chem Cent J* 5: 33.
40. Carpes ST, Begnini R, de Alencar SM, Masson ML (2007). Study of preparations of bee pollen extracts, antioxidant and antibacterial activity. *Ciencia E Agrotec* 31: 1818-1825.
41. Pincemail J, Kevers C, Tabart J, Defraigne JO, Dommes J (2012). Cultivars, culture conditions, and harvest time influence phenolic and ascorbic acid contents and antioxidant capacity of strawberry (*Fragaria x ananassa*). *J Food Sci* 77: C205-210.
42. Pascoal A, Rodrigues S, Teixeira A, Feas X, Estevinho LM (2014). Biological activities of commercial bee pollens: antimicrobial, antimutagenic, antioxidant and anti-inflammatory. *Food Chem Toxicol* 63: 233-239.
43. Değer O, Tahmaz AM (2002). The effects of polen and propolis extracts on erythrocyte lipid peroxidation. 1st International Congress on the Chemistry of Natural Products, Program&Abstaracts, Trabzon, 16-19 October 2002, P-68.

44. Mozdierz A, Rzepecka-Stojko A, Juszko-Piekut M, Olczyk D, Stojko J, Mierzwa W, Kobiela W (2012). The role of nicotine as a modulator of the activity of acid phosphatase and cathepsin D and L in the liver and kidney of mice. *Przeg Lek* 69: 833-836.
45. Yakusheva E, Rakita D, Krivtsov N, Uzbekova DG (2013). Pollen and bee bread physico-chemical properties, biological and pharmacological effects. *Theologic and Pract B of Apit*: 84-97.
46. Wu YD, Lou YJ (2007). A steroid fraction of chloroform extract from bee pollen of *Brassica campestris* induces apoptosis in human prostate cancer PC-3 cells. *Phytother Res* 21: 1087-1091.
47. Hamblin T (2006). Natural products and the treatment of leukemia. *Leuk Res* 30: 649-650.
48. Abdella EM, Tohamy A, Ahmad RR (2009). Antimutagenic activity of Egyptian propolis and bee pollen water extracts against cisplatin-induced chromosomal abnormalities in bone marrow cells of mice. *Iran J Cancer Prevent* 2: 175-181.
49. Grajek W (2007). *Antioxidants in food*. WNT-Warsaw Poland: 258-259.
50. Erkmen O, Ozcan MM (2008). Antimicrobial effects of Turkish propolis, pollen, and laurel on spoilage and pathogenic food-related microorganisms. *J Med Food* 11: 587-592.
51. Polanski M, Okon K, Przybylo R, Frasiak W (1998). Cardioprotective properties of hydrophilic pollen extract (HPE). *Pol J Pathol* 49: 109-112.
52. Wang MS, Fan HF, Xu HJ (1993). Effects of bee pollen on blood and hemopoietic system in mice and rats. *Chin Tradit Herb Drug* 24: 588-591.
53. Szczesna T, Rybak-Chmielewska H (1998). Comparative research of the composition of bee pollen from different countries. In *Proceedings of the 35th Scientific Apiarian Conference, Puławy, Poland, 11-12 March 1998*, 76-77.
54. Yerlikaya O (2014). Effect of bee pollen supplement on antimicrobial, chemical, rheological, sensorial properties and probiotic viability of fermented milk beverages. *Mljekarstvo* 64: 268-279.

55. Bast A, Haenen GR, Doelman CJ (1991). Oxidants and antioxidants: state of the art. *Am J Med* 91: 2S-13S.
56. Halliwell B (1999). Antioxidant defence mechanisms: from the beginning to the end (of the beginning). *Free Radic Res* 31: 261-272.
57. Nawar WW (1996). In *Food Chemistry*. 3rd ed. New York: Marcel Dekker, 225-319.
58. Koca N, Karadeniz F (2003). Serbest radikal oluşum mekanizmaları ve vücuttaki antioksidan savunma sistemleri. *Gıda Mühendisliği Dergisi*: 32–37.
59. Akbulut K (2014). Türk propolisinin sulu ekstraktının insan laringeal epidermoid karsinoma (Hep-2) hücre serilerinde hücre içi serbest kalsiyum ve hidrojen peroksit düzeylerine etkisi. Yüksek Lisans Tezi, Karadeniz Teknik Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Trabzon.
60. Song O (2004). Oxidative Stress. *Theor Mod Biol Real C R Biolog* 327: 649-662.
61. Kavas C (2008). Kurşun aracılı doku hasarında flavonoidlerin rolü. Yüksek Lisans Tezi, Dokuz Eylül Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İzmir.
62. Uyanık S (2014). Likenlerden izole edilen usnik asidin gastroprotektif özellikleri üzerine zeytinyağının etkisinin ve biyokimyasal mekanizmalarının belirlenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Atatürk Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.
63. Lima CF, Fernandes-Ferreira M, Pereira-Wilson C (2006). Phenolic compounds protect HepG2 cells from oxidative damage: relevance of glutathione levels. *Life Sci* 79: 2056-2068.
64. Smart RC, Hodgson E (2008). *Molecular and biochemical toxicology*. Wiley fourth edition: 342-343.
65. Fantel AG (1996). Reactive oxygen species in developmental toxicity: review and hypothesis. *Teratology* 53: 196-217.
66. Myhre O, Andersen JM, Aarnes H, Fonnum F (2003). Evaluation of the probes 2', 7'-dichlorofluorescein diacetate, luminol, and lucigenin as indicators of reactive species formation. *Biochem Pharmacol* 65: 1575-1582.

67. Kariya S, Sawada K, Kobayashi T, Karashima T, Shuin T, Nishioka A, Ogawa Y (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: 449-454.
68. Burda S, Oleszek W (2001). Antioxidant and antiradical activities of flavonoids. *J Agric Food Chem* 49: 2774-2779.
69. Arzimanoglou A, Hirsch E, Nehlig A, Castelnau P, Gressens P, Pereira de Vasconcelos A (2002). Epilepsy and neuroprotection: an illustrated review. *Epileptic Disord* 4: 173-182.
70. 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.
71. Chai Y, Luo Q, Sun M, Corke H (2004). Antioksidant activity and phenolic compounds of 112 traditional Chinese medicinal plants associated with anticancer. *Life Sci* 74: 2157-2184.
72. Kalyanaraman B (2013). Teaching the basics of redox biology to medical and graduate students: Oxidants, antioxidants and disease mechanisms. *Redox Biol* 1: 244-257.
73. Betteridge DJ (2000). What is oxidative stress? *Metabolism* 49: 3-8.
74. Altan N, Dinçel AS, Koca C (2006). Diabetes mellitus ve oksidatif stress. *Türk J Biochem* 31: 51-56.
75. Maria LU, Priscilla MC (2003). Oxidative stress, exercise and antioxidant supplementation. *Toxicology* 189: 41-54.
76. Erel O (2005). A new automated colorimetric method for measuring total oxidant status. *Clin Biochem* 38: 1103-11.
77. Ayala A, Munoz MF, Arguelles S (2014). Lipid peroxidation: production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal. *Oxid Med Cell Longev* 14: 360-438.

78. Del Rio D, Stewart AJ, Pellegrini N (2005). A review of recent studies on malondialdehyde as toxic molecule and biological marker of oxidative stress. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 15: 316-328.
79. Meral R, Doğan IS, Kanberoğlu G (2012). Fonksiyonel gıda bileşeni olarak antioksidanlar. *Iğdır Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi* 2: 45-50.
80. Harris ED (1992). Regulation of antioxidant enzymes. *FASEB J* 6: 2675-2683.
81. Akkuş İ (1995). Serbest radikaller ve fizyopatolojik etkileri. Birinci baskı. Mimoza Yayınları: 17.
82. 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.
83. Şentürk A (2015). Oksidatif olarak modifiye edilmiş karbonik anhidraza karşı otoantikor oluşumunun ve bu antikorların bazı romatoid hastalıklarla ilişkisinin incelenmesi. Doktora tezi, Karadeniz Teknik Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Trabzon.
84. Sun Y, Oberley LW, Li Y (1988). A simple method for clinical assay of superoxide dismutase. *Clinic Chem* 34: 497-500.
85. Goth L (1991). A simple method for determination of serum catalase activity and revision of reference range. *Clin Chem Acta* 196: 143-151.
86. Stocks J, Dormandy TL (1971). The autoxidation of human red cell lipids induced by hydrogen peroxide. *Br J Haematol* 20: 95-111.
87. 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.
88. Hamdy MH, El Bandy MA, Khakifa KI, Gad EM, Hassanein EM (1989). The antimicrobial effect of honey in the management of septic wounds. *Forut İnter Con of Apic in Tron Clin*: 61-67.
89. Karataş F, Munzuroğlu Ö, Gür N (2000). Arı polenlerindeki A, E ve C vitaminleri ile selenyum düzeylerinin araştırılması, Fırat Üniversitesi Fen ve Müh Bilimleri Dergisi 12: 219-224.

90. Silva TMS, Camara CA, Silva Lins AC, Barbosa-Filho JM, Eva Silva MS, Freitas BM, Santos RFA (2006). Chemical composition and free radical scavenging activity of pollen loads from stingless bee *Melipona subnitida* Ducke. *J Food Compos Anal* 19: 507-511.
91. Moreira L, Dias LG, Pereira JA, Estevinho L (2008). Antioxidant properties, total phenols and pollen analysis of propolis samples from Portugal. *Food Chem Toxicol* 46: 3482-3485.
92. Eraslan G, Kanbur M, Silici S (2008). Effect of carbaryl on some biochemical changes in rats, the ameliorative effect of bee pollen. *Food Chem Toxicol* 47: 86-91.
93. Jo Bright SJ, Hiscock PE, James JT (2009). Hancock pollen generates nitric oxide, a possible link to pollen-induced allergic responses. *Plant Physiol Biochem* 47: 1-49.
94. Mansouri A, Lurie AA (1993). Concise review: methemoglobinemia. *Am J Hematol* 42: 7-12.
95. Grelloni F, Gabbianelli R, Santroni AM, Falcioni G (1993). Inactivation of Glutathione-Peroxidase Following Entrapment of Purified Alpha-Hemoglobin or Beta-Hemoglobin Chains in Human Erythrocytes. *Clinica Chimica Acta* 217: 187-192.
96. Grunberger D, Banerjee R, Eisinger K, Oltz EM, Efros L, Caldwell M, Estevez V, Nakanishi K (1988). Preferential cytotoxicity on tumor cells by caffeic acid phenethyl ester isolated from propolis. *Experientia* 44: 230-232.
97. Sarkar MK, Sil PC (2010). Prevention of tertiary butyl hydroperoxide induced oxidative impairment and cell death by a novel antioxidant protein molecule isolated from the herb, *Phyllanthus niruri*. *Toxicol In Vitro* 24: 1711-1719.
98. Moore RB, Brummitt ML, Mankad VN (1989). Hydroperoxides selectively inhibit human-erythrocyte membrane enzymes. *Archiv of Biochem and Biophys* 273: 527-534.
99. Patterson LK (1981). *Oxygen and Oxyradicals in Chemistry and Biology*. Academic Press: 89-94.
100. Esterbauer H (1982). *Free Radicals, Lipid Peroxidation and Cancer*. Academic Press: 439-441.

101. Tahmaz M (2000). Polen ve propolis ekstraktlarının eritrosit lipid peroksidasyonu üzerine etkileri. Doktora Tezi, Karadeniz Teknik Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Trabzon.
102. Ishikawa Y, Tokura T, Ushio H, Niyonsaba F, Yamamoto Y, Tadokoro T, Ogawa H, Okumura K (2009). Lipid-soluble components of honeybee-collected pollen exert antiallergic effect by inhibiting IgE-mediated mast cell activation *In Vivo*. *Phytother Res* 23: 1581-1586.
103. Eraslan G, Kanbur M, Silici S, Karabacak M (2010). Beneficial effect of in honey on trichlorfon induced some biochemical alterations in mice. *Ecotoxicolo Environ Safety* 73: 1084-1091.
104. Hsiao G, Lin YH, Lin CH, Chou DS, Lin WC, Sheu JR (2001). The protective effects of PMC against chronic carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity in vivo. *Biol Pharm Bull* 24: 1271-1276.
105. Zhang Y, Yang F, Muneer AJ, Zengqi P (2016). Antioxidant Enzyme Activities and Lipid Oxidation in Rape (*Brassica campestris L.*) Bee Pollen Added to Salami during Proces. *Mol J* 10.3390: 21-1439.
106. Abdallah H, Farag M, Osman S, Kim DH, Kang K, Pan CH, Abdel-Sattar E (2016). Isolation of major phenolics from *Launaea spinosa* and their protective effect on HepG2 cells damaged with t-BHP. *Pharm Biol* 54: 536-541.
107. Bais SS, Mali YP (2013). Protective effect of *Amorphophallus campanulatus* tuber extracts against H₂O₂ induced oxidative damage in human erythrocytes and leucocytes. *Int J Green Pharm* 7: 111-116.
108. Slamenova D, Kozics K, Hunakova L, Melusova M, Navarova J, Horvathova E (2013). Comparison of biological processes induced in HepG2 cells by tert-butyl hydroperoxide (t-BHP) and hydroperoxide (H₂O₂): The influence of carvacrol. *Mutat Res* 757: 15-22.

9. EKLER

EK 1. Deneyde Kullanılacak t-BHP Konsantrasyonunun Belirlenmesi.

	Kontrol	250 μ M t-BHP	500 μ M t-BHP	750 μ M t-BHP	1000 μ M t-BHP	2000 μ M t-BHP
MDA (nmol/gHb)	4 \pm 0.9	14 \pm 1.6	201 \pm 2.1	272 \pm 3.6	304 \pm 16.7	101 \pm 6.9

EK 2. Deneyde Kullanılacak Sulu Türk Polen Konsantrasyonunun Belirlenmesi.

	Kontrol	1000 $\mu\text{g/mL}$ Polen	2000 $\mu\text{g/mL}$ Polen	3000 $\mu\text{g/mL}$ Polen	5000 $\mu\text{g/mL}$ Polen	Negatif Kontrol*
MDA (nmol/gHb)	4 ± 0.9	25 ± 0.8	15 ± 0.5	5.8 ± 0.7	5 ± 0.6	272 ± 3.6



*Negatif Kontrol: 750 μM t-BHP

EK 3. Denedeyde Kullamlacak Kuersetin Konsantrasyonunun Belirlenmesi.

	Kontrol	1 µg/mL Kuersetin	2 µg/mL Kuersetin	5 µg/mL Kuersetin	10 µg/mL Kuersetin	Negatif Kontrol*
MDA (nmol/g Hb)	4 ± 0.9	43 ± 7.6	4.9 ± 0.84	10.8 ± 3.2	8.1 ± 4.9	272 ± 3.6

*Negatif Kontrol: 750 µM t-BHP

EK 4. 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) oksidatif 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 ONAY FORMU



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

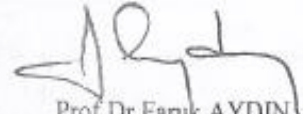
Sayı : 24237859-673
Konu: Etik kurul onay belgesi

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 raporör 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

Adı Soyadı	Katip KORKMAZ
Doğum Tarihi	05.02.1986
E-posta	katip.korkmaz@hotmail.com
Adres	KTÜ SABE, Tıbbi Biyokimya AD, Trabzon

Derece	Bölüm/Program	Üniversite	Yıl
Ön Lisans	Kimya Teknolojileri	Atatürk Üniversitesi	2007-2009
Lisans	Kimya	Atatürk Üniversitesi	2009-2012
Yüksek Lisans	Anorganik Kimya	Atatürk Üniversitesi	2012-2015
Yüksek Lisans	Tıbbi Biyokimya	KTÜ	2015-2017

Yabancı Dil: İngilizce