

**BİNGÖL YÖRESİ BAL ÖRNEKLERİNDEN FENOLİK
BİLEŞİKLERİN
EKSTRAKSİYONU VE BAZI BİYOLOJİK
AKTİVİTELERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Evset MURAT

Yüksek Lisans Tezi

Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Yrd. Doç. Dr. Bülent KAYA

2017

Her hakkı saklıdır

T.C.
BİNGÖL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**BİNGÖL YÖRESİ BAL ÖRNEKLERİNDEN FENOLİK
BİLEŞİKLERİN
EKSTRAKSİYONU VE BAZI BİYOLOJİK
AKTİVİTELERİNİN ARAŞTIRILMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Evset MURAT

Enstitü Anabilim Dalı : BİYOLOJİ
Tez Danışmanı : Yrd. Doç. Dr. Bülent KAYA

Şubat 2017

**T.C.
BİNGÖL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**BİNGÖL YÖRESİ BAL ÖRNEKLERİNDEN FENOLİK
BİLEŞİKLERİN EKSTRAKSİYONU VE BAZI BİYOLOJİK
AKTİVİTELERİNİN ARAŞTIRILMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Evset MURAT

Enstitü Anabilim Dalı : BİYOLOJİ

Bu tez 30.01.2017 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oy birliği ile kabul edilmiştir.

**Yrd. Doç. Dr.
Bülent KAYA
Jüri Başkanı**

**Prof. Dr.
Ekrem ATALAN
Üye**

**Yrd. Doç. Dr.
Aydın Şükrü BENGÜ
Üye**

Yukarıdaki sonucu onaylarım

**Prof. Dr. İbrahim Y. ERDOĞAN
Enstitü Müdürü**

ÖNSÖZ

Yüksek Lisans Tezi olarak sunduğum bu çalışmanın deneysel kısmı Bingöl Üniversitesi, Merkezi Laboratuvarlarında gerçekleştirilmiştir. Çalışmamda bilgi ve tecrübelerinden faydalandığım ve çalışmanın her aşamasında her türlü yardım ve desteğini esirgemeyen Bingöl Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü öğretim üyelerinden danışman hocam Sayın Yrd. Doç. Dr. Bülent KAYA' ya derin minnet ve şükranlarımı sunarım. Çalışmamızda kullandığımız bal örneklerinin temininde gerekli yardım ve kolaylığı sağlayan Sayın Öğretim Görevlisi Mehmet Ali KUTLU' ya ve çalışmamın her aşamasında katkı ve desteklerini esirgemeyen Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü'ndeki Arş. Gör. Gökhan DERVİŞOĞLU' na tüm hocalarım, arkadaşlarıma ve öğrenim hayatım boyunca maddi ve manevi olarak sürekli yanımda olan aileme ve ayrıca Bingöl Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğüne teşekkürlerimi bir borç bilirim.

Evset MURAT

Bingöl 2017

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ.....	ii
İÇİNDEKİLER.....	iii
SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ.....	vi
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	vii
TABLolar LİSTESİ.....	viii
ÖZET.....	ix
ABSTRACT.....	xi
1. GİRİŞ.....	1
1.1. Bal.....	5
1.1.1. Tanımı.....	5
1.1.2. Balın Bileşimi ve Kimyasal Yapısı.....	6
1.2. Oksidanlar.....	8
1.3. Antioksidanlar.....	9
1.4. Fenolik Bileşikler.....	10
1.4.1. Fenolik Asitler.....	11
1.4.2. Flavonoidler.....	12
1.4.3. Flavonlar ve Flavonoller.....	13
2. KAYNAK ÖZETLERİ.....	14
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	17
3.1. Materyal.....	17
3.1.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler.....	17
3.1.2. Yararlanılan Alet ve Cihazlar.....	18

3.2. Ekstraksiyon Tekniği.....	18
3.3. Antioksidan Aktivitenin Belirlenmesi.....	19
3.3.1. Toplam Fenolik Madde Miktarı Tayini.....	19
3.3.2. Toplam Flavonoid İçeriğinin Belirlenmesi.....	19
3.3.3. Toplam Fenolik Asit İçeriği (TPA).....	20
3.3.4. DPPH Radikalinin Etkisinin Giderilmesi.....	20
3.3.5. İndirgeyici G Özelliğinin Ölçülmesi.....	20
3.3.6. Metal Şelatlama Aktivitesinin Ölçülmesi.....	21
3.3.7. Toplam Antioksidan Kapasitenin Belirlenmesi.....	21
3.4. PC-3 Hücre Hatları zerindeki Antikanser Etkilerinin Belirlenmesi.....	22
3.4.1. Hücreler.....	22
3.4.2. Medium Hazırlama.....	22
3.4.3. Bal Ekstraktlarının PC-3 İçeren Platelere Ekilmesi.....	22
3.4.4. Bal Ekstraktlarının Hücre Canlılık Testi.....	23
3.4.5. Proteinlerin İzolasyonu.....	25
3.4.6. Western Blot Tekniği ile Hedef Proteinlerin Analizi.....	26
4. BULGULAR VE TARTIŞMA.....	27
4.1. Ekstraksiyon Verimi İle İlgili Bulgular.....	27
4.2. Antioksidan Araştırma Bulguları.....	27
4.2.1. Toplam Fenolik Madde Miktarı İle İlgili Bulgular.....	27
4.2.2. Toplam Flavonoid İçeriğinin Belirlenmesi İle İlgili Bulgular...	29
4.2.3. Toplam Fenolik Asit İçeriği (TPA) Belirlenmesi İle İlgili Bulgular.....	30
4.2.4. Metal Şelatlama Aktivitesinin Ölçülmesi İle İlgili Bulgular.....	32
4.2.5. DPPH Radikal Aktivitesinin Belirlenmesi.....	34
4.2.6. Toplam Antioksidan Kapasitenin Belirlenmesi İle İlgili Bulgular.....	34
4.3. Antikanser alıŐma Sonuçları.....	36
4.3.1. Hücre Canlılık Testi.....	36
4.3.2. Western Blotting Analizi.....	37

5. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	39
KAYNAKLAR.....	42
ÖZGEÇMİŞ.....	48

SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ

BHT	: Bütillenmiş hidroksitoluen
BHA	: Bütillenmiş hidroksianisol
DPPH	: 1,1-Difenil 2-pikril hidrazil radikali
DPPH	: 1,1-Difenil 2-pikril hidrazil
GA	: Gallik asit
Troloks	: 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid
Q	: Kuersetin
FC	: Folin-Ciocalteu
A ₀	: Kontrol numunesinin absorbansı
A ₁	: Numunesinin absorbansı
AH	: Antioksidan madde
EDTA	: Etilendiamin tetra asetik asit
HPLC	: Yüksek basınçlı sıvı kromatografisi
DMSO	: Dimetilsulfoksit
PBS	: Fosfat buffer saline
PC-3	: Prostat kanser hücresi
MCF-7	: Meme kanseri hücresi
DMEM	: Dulbecco's medified eagle's medium
ROS	: Reaktif hale gelmiş oksijen türleri
DNA	: Deoksiribo nükleik asit
TCA	: Trikloroasetik asit
WST-1	: Western blotting
mL	: Mililitre
mm	: Milimetre
NA	: Nutrient Agar
UV	: Ultraviyole
µg	: Mikrogram

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1.1.	Fenolik asitlerin kimyasal yapıları.....	11
Şekil 1.2.	Flavonoidlerin genel yapısı.....	12
Şekil 1.3.	Flavonlar ve flavonollerin kimyasal yapısı.....	13
Şekil 3.1.	96'lık plakalara PC-3 hücre ekimi.....	24
Şekil 3.2.	İnhibe olan PC-3 hücrelerin görüntüsü.....	24
Şekil 3.3.	İnhibe olan PC-3 hücrelerin görüntüsü.....	25
Şekil 4.1.	Gallik asit standart çalışma grafiği.....	28
Şekil 4.2.	Toplam Fenolik İçeriği (μg gallik asit/g).....	28
Şekil 4.3.	Toplam flavonoid miktarı tayini için hazırlanan kuersetinin standart grafiği.....	29
Şekil 4.4.	Toplam flavonoid içeriği (μg kuersetin/g).....	30
Şekil 4.5.	Toplam fenolik asit miktarı tayini için hazırlanan sinapik asit standart grafiği.....	31
Şekil 4.6.	Toplam fenolik asit içeriği (μg sinapik asit/g).....	32
Şekil 4.7.	Metal Şelatlama Aktivitesi (% Giderme).....	33
Şekil 4.8.	DPPH giderme aktivitesi (% Giderme).....	34
Şekil 4.9.	Toplam antioksidan kapasitenin tayini için hazırlanan AlfaB-tokoferol standart grafiği.....	35
Şekil 4.10.	Toplam Antioksidan Kapasite (μg askorbik asit/g).....	35
Şekil 4.11.	Hücre canlılık grafiği.....	36
Şekil 4.12.	Bal ekstralarının PC-3 hücrelerindeki apoptoz ilişkili protein ekspresyonu üzerine etkileri.....	38

TABLULAR LİSTESİ

Tablo 1.1.	Nektar ve salgı bileşenlerin değerleri.....	7
Tablo 4.1.	Bal örneklerinden elde edilen ekstre miktarları.....	27

BİNGÖL YÖRESİ BAL ÖRNEKLERİNDEN FENOLİK BİLEŞİKLERİN EKSTRAKSİYONU VE BAZI BİYOLOJİK AKTİVİTELERİNİN ARAŞTIRILMASI

ÖZET

Bingöl ve yöresi zengin bitki çeşitliliği ve uygun iklim koşulları ile arıcılığa oldukça uygun bir bölgedir. Bölgemizde bal üretimi ticaret amaçlı olduğundan dolayı arıcılık faaliyetleri her geçen gün artmaktadır. Bu çalışmada, Bingöl ili ballarının, farklı bölgelerden alınan örneklerinin fenolik ekstraktlarının dünya çapında yapılan bal araştırmalarında bilinirliği ve etkinliği azdır. Bu amaçla ve balın bir şifa kaynağı olarak bilinen toplumlarda balın gerçek özelliklerinin neler olabileceği ve Bingöl balının sadece besleyici özelliği dışında şifa kaynağı olarak ne kadar etkin olduğu, bal içeriğinin etkin maddeler açısından hangi vasıflara sahip olduğu bu etkin maddelerin ne derecede antioksidan ve antikanser özelliği gösterdiğinin tespit edilmesi amaçlanmış ve çalışmada kullanılan bal örnekleri Amberlite® XAD-2 kolon dolgu maddesiyle muamele edilerek fenolik ekstraktları elde edildi.

Ekstraktların toplam fenol içerikleri Folin-Ciocalteu yöntemiyle, toplam flavonoid miktarları alüminyum klorür metoduyla ve toplam antioksidan aktiviteleri ise fosfomolibden yöntemi ile tayin edilmiştir. Bingöl' deki çeşitli bölgelerden toplanan 5 adet balın metanol ekstraktında toplam fenolik içerikler Kiğı (426,01), Sancak (326,17), Servi (237,70), Solhan (172,90) ve Yayladere (140,34) (μg gallik asit/g) olarak hesaplanmıştır. Toplam flavonoid içerikleri ise sırasıyla 0,1981, 0,1482, 0,0805, 0,0817, ve 0,0876 (μg kuersetin/g) olarak saptanmıştır. Toplam fenolik asit içerikleri sırasıyla 723,33 - 868,00 - 262,00 - 0,0817 ve 312,00 (μg sinapik asit/g) olarak saptanmış bu verilere göre fenolik bileşik içeriğine göre Kiğı balı öne çıkmaktadır. Bu ekstraktların antioksidan aktiviteleri olarak metal şelatlama aktivitesi ve toplam antioksidan kapasitenin belirlenmesi deneyleri yapılmıştır ve % inhibisyon olarak değerlendirilen 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ konsantrasyon da en fazla inhibisyon olduğu görülmüştür, buna göre bal ekstraktlarının inhibisyon değerleri sırasıyla % olarak 17,17 - 2,74 - 18,76- 11,44 ve 3,74 olarak belirlenmiştir.

Bu bal ekstraktının metal şelatlama aktivitesinin EDTA eşleniği açısından değerlendirildiğinde 12,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ konsantrasyonda en fazla metal şelatlama sahip olduğu görülmüş ve buna göre metal şelatlama aktiviteleri sırasıyla 2448,01 - 1334,16 - 439,61 - 1971,66 - 1432,08 μg EDTA/g olarak hesaplanmıştır. Toplam antioksidan kapasite ise sırasıyla 2275,40 - 1498,25 - 811,90 - 646,98 ve 16,34 (μg askorbik asit/g) olarak belirlenmiştir. Bu bilgilere göre Kiğı balın toplam antioksidan ve fenolik içerik

aktivitelerinin diğer ballardan daha yüksek olduğu görülmüştür. Ayrıca tüm bal örneklerinin insan prostat kanser hücrelerinin (PC-3) canlılığı üzerine etkilerine de bakılmıştır. Tüm bal örneklerinin PC-3 hücre canlılığını uygulanan tüm dozlarda düşürdüğü gözlemlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: Bal, fenolik bileşikler, antioksidan aktivite, antikanser aktivite.

EXTRACTION OF PHENOLIC COMPOUNDS AND INVESTIGATION OF SOME BIOLOGICAL ACTIVITIES FROM BINGOL REGIONAL BALANCING EXAMPLES

ABSTRACT

Bingöl and its region are very suitable region for beekeeping with its rich plant variety and suitable climatic conditions. Beekeeping activities are increasing day by day because honey production is aimed for trading in our region. In this study, the phenolic extracts of honey from Bingöl provinces, samples taken from different regions are less known and effective in honey researches made around the world. For this purpose and in what is known as a source of healing honey, what are the true features of honey and how effective it is as a source of healing other than the nutritive properties of Bingöl honey, what qualities of honey content have in terms of active ingredients, how antioxidant and antimicrobial and anticancer properties of these active substances and the honey phenolic compounds which were to be used for antioxidant and antimicrobial activities were extracted with Amberlite XAD-2 column filler.

Total phenol contents of the extracts were determined by Folin-Ciocalteu method, total flavonoids were determined by aluminum chloride method and total antioxidant activities by phosphomolybdenum method. The total phenolic contents of methanol extracts of five honey samples collected from various regions in Bingöl were compared with the values of Kiğı (426.01), Sancak (326.17), Servi (237.70), Solhan (172.90) and Yayladere (140.34) μg gallic acid/g). Total flavonoid contents were calculated as 0.1981, 0.1482, 0.0805, 0.0817, and 0.0876 (μg quercetin/g), respectively. Total phenolic acid contents were calculated as 723.33 - 868.00 - 262.00 - 0.0817 and 312.00 (μg sinapic acid/g), respectively, according to the phenolic compound contents of honey samples. The metal chelating activities and the total antioxidant capacities of these extracts were determined as the antioxidant activities and the inhibition values were found to be the maximum inhibition at the concentration of 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ evaluated as % inhibition, the % inhibition values of honey extracts were 17.17 - 2.74 - 18.76 - 11.44 and 3.74.

When the metal chelating activity of this honey extract was evaluated in terms of the EDTA conjugate, the metal chelating activity was found to be the highest at 12.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ concentration and thus the metal chelating activities were found to be 2448.01 - 1334.16 - 439.61 - 1971.66 - 1432.08 $\mu\text{gEDTA}/\text{g}$. When the total antioxidant capacity was evaluated as 2275.40 - 1498.25 - 811.90 - 646.98 and 16.34 (μg ascorbic acid/g), respectively. According to this information, the total antioxidant and phenolic content activities of Kiğı honey sample were found to be higher than the other balloons. Our

findings indicate that gallic acid, quercetin, sinapic acid, ascorbic acid are the main phenolic acids studied. We evaluated the effects of honey samples on viability of human prostate cancer cells (PC-3) and these extracts significantly reduced the viability of PC-3 cells in vitro. As a result, antioxidant and anticancer properties of honey samples from Bingöl province have been revealed.

Keywords: Honey, phenolic compounds, antioxidant activity, anticancer activity.

1. GİRİŞ

Bal, yüzyıllar boyunca insanoğlu için önemli bir besin kaynağı olmuştur. Arılar bal yapmak için bitkilerdeki çiçek ve tomurcuklarda bulunan diğer bir adı da bal özü olarak adlandırılan nektarı alırlar ve bu nektarı kendi bal midelerinde bulunan invertaz enzimi vasıtasıyla kimyasal değişime uğratarak balı meydana getirirler (Martin 1979; Ötleş 1995).

Balın içeriği ve kalitesi arıların buldukları habitatın bitki örtüsünden, bitki örtüsünün nektar tip ve çeşidine, miktarına, bölgenin coğrafik konumuna, yükseltisine, ısı değişimlerine, arı popülasyonunun ırkının saf olması gibi birçok faktörün bileşimine bağlıdır. Ancak yapılan araştırmalar göstermiştir ki insan sağlığı açısından fonksiyonel özelliklere sahip olan balın kaynağı büyük ölçüde habitatındaki çiçek dağılımına bağlıdır (Effem 1988).

Bal bileşiklerinin karakterizasyonu balın biyolojik açıdan güvenilir olarak kullanılmasında büyük önem taşımaktadır. Bal yaklaşık olarak iki yüz (200) farklı bileşenden oluşur. Bunların içerisinde şekerler, fenolik asitler, flavonoidler, aminoasitler, proteinler, vitaminler ve enzimler bulunur (Swellam et al. 2003). Bal dünya üzerinde birçok bölgede geleneksel olarak hastalıkların tedavisinde özellikle antibakteriyel, antiinflamatuvar özellikte iyileştirici olarak kullanıla gelmiştir. Ortaya çıkan kanıtlardan anlaşılacağı üzere bal kimyasallara karşı vücudu korumada, kalp damar rahatsızlıklarını engellemede ve immün sistemin düzenlenmesinde ciddi roller üstlenmektedir. Koruyucu ve iyileştirici özellikleri yapılarında barındırdıkları bitkisel bileşiklerin antioksidan kapasitesine büyük ölçüde bağlanmaktadır (Weston et al. 1999). Balın besleyici, koruyucu ve tedavi edici özelliğinin ham maddesi bitkilerin yapısında bulunan aktif bileşiklerini yapısına katmasından kaynaklanmaktadır. Çünkü nektarların içerisinde bol miktarda bitkisel sekonder metabolit bulunmaktadır. En çok bulunan bu bileşik grubu ise fenolik bileşiklerdir. Fenolik bileşikler balın yapısında bulunan antioksidan ve diğer yararlı

özelliklerine katkıda bulunduğu düşünülmektedir (Molan 2006). Fenolik asitler çoklu biyolojik aktiviteye sahip bileşiklerdir. Bu biyolojik aktivitelerin içeriği antiaterojenik, antiinflamatuvar, antikanser, antioksidan ve antimikrobiyal özellikler olarak özetlenebilir. Bazı hidrobzenzoik asit türevleri (p-hidroksibenzoik asit, protokatekuik asit ve vanilik asit gibi) yanısıra p-kumarik ve kafeik asit gibi hidroksisinamik asit formları önemli antikanser aktiviteye sahip bileşiklerdir. İlginç bir şekilde protokatekuik ve kafeik asit potansiyel antidiyabetik ve kalp koruma özelliklerine sahip oldukları gözlemlenmiş durumdadır (Gheldof et al. 2002).

Fenolik içerikler balın antioksidan ve diğer yararlı özelliklerine katkıda bulunduğu düşünülmektedir (Molan 2006). Fenolik asitler çoklu biyolojik aktiviteye sahip bileşiklerdir. Bu biyolojik aktivitelerin içeriği antiaterojenik, antiinflamatuvar, antikanser, antioksidan ve antimikrobiyal özellikler olarak özetlenebilir. Bazı hidrobzenzoik asit türevleri (p-hidroksibenzoik asit, protokatekuik asit ve vanilik asit gibi) yanısıra p-kumarik ve kafeik asit gibi hidroksisinamik asit formları önemli antikanser aktiviteye sahip bileşiklerdir. İlginç bir şekilde protokatekuik ve kafeik asit potansiyel antidiyabetik ve kalp koruma özelliklerine sahip oldukları gözlemlenmiş durumdadır (Gheldof et al. 2002).

Fenolik asit profili incelendiğinde balın orijini hakkında bilgi elde etmek mümkündür. Fenolik asitlerden kafeik asit p-kumarik asit kestane ballarında protokatekuik asit ise çiçek balları gibi ballarda floral belirleyici olarak bulunurlar (Kassim et al. 2010).

Yapılan diğer çalışmalarda bireysel fenolik bileşikler gram negatif ve gram pozitif bakterilerde geniş bir yelpazede büyümeyi inhibe ettiğini göstermiştir (Davidson et al. 2005). Fenolik bileşikler bitkilerden oluşan en önemli gruplardan biridir ve 8000 farklı yapıdan oluşmuştur (Bravo 1998). Bu bileşiklerin antikanserojenik, antiinflamatuvar, antiaterojenik, antitrombotik, immün sistem ve analjezik faaliyetleri gösterilmiştir. Bunlar arasında antioksidan fonksiyonları da rapor edilmiştir (Vinson et al. 1998).

İnsanoğlu bitkileri çok farklı amaçlar için varoluşundan beri kullanmaktadır. Günümüzde çok sayıda bitki kökenli bileşik, önemli ilaçlar arasında sayılmaktadır. Yapılan araştırmalar sonucunda dünya üzerinde terapötik amaçlarla kullanılan birçok bitki türü

mevcut olup buna örnek olarak ağrı kesici olarak söğüt ağacı kabuğundan elde edilen tarihi eski çağlara kadar varan asetilsalisilik asit adıyla bilinen aspirindir. Günümüzde antitümör ve apoptotik etkisi kanıtlanmış pek çok bitki kökenli bileşik bulunmaktadır. Son zamanlarda yapılan çalışmalar, kanser hücrelerinde apoptozun indüklenmesini temel alan, özellikle doğal ürün ya da bitki kökenli terapötik etkili yiyecekler üzerine yoğunlaşmıştır (Beytur vd. 2008).

Son yıllarda bitkisel bileşiklerin etkin maddelerinden dolayı alternatif tıp ve bitkilerden yeni aktif etkin bileşiklerin araştırılması ve bu bileşiklerin sinerjetik ve antagonistik etkisinin araştırılması üzerine birçok yayın bulunmaktadır. Bitkiye ait etkin bileşiklerin antioksidan, antimikrobiyal, antiinflamatuvar etkileri başta gıda sanayi olmak üzere kişilerin günlük beslenmelerin kullanımları artış eğilimindedir.

Bitkilerin yapılarında bulunan sekonder metabolitleri olan fenolik bileşikler açısından zengin olmalarından kaynaklanmaktadır. Bu bileşik grubu içerisinde flavonoidleri, fenolik asitleri ve karetonoid iki biyoaktif bileşikleri bulundurmasından dolayıdır. Aynı zamanda aynı bitki türüne ait örneklerin farklı coğrafi alanda farklı yükseltide güneş ışığını alma açısından farklılıklar dahi bu bileşikler ve alt gruplarının sayısında ve miktarında farklılıklar göstermektedir (Kulkarni et al. 2006). Bu bileşiklerin doğal olarak antioksidan, antimikrobiyal ve antikanser maddeleri olarak araştırılması son yıllarda yapılan birçok çalışmada etken madde olarak ortaya çıkarılmıştır.

Gıdalarda raf ömrünün uzatılması, bozunmayı önleyici olarak sıklıkla kullanılan bütillenmiş hidroksi toluen (BHT) ve bütillenmiş hidroksi anisol (BHA) gibi sentetik antioksidanlarının son yıllarda kanser başta olmak üzere dejeneratif hastalıklara sebebiyet verdiği ve dünya sağlık örgütünün verdiği günlük limitler beslenme alışkanlıklarındaki farklılıktan dolayı aşıldığı bu miktarların az miktarda alınması dahi dejeneratif hastalıklara yol açmakta olduğu ancak aşılmasının çok riskli olacağı bildirilmektedir (Gülçin vd. 2006a).

Bitkisel orijinli antioksidan maddelerin ve bileşiklerin günlük diyetle direk bitkisel beslenme ve bitkilerden kökenlenen bal gibi bileşiklerden sağlanması ile ilgili eğilim gün geçtikçe artmakta ve zamanla fonksiyonel gıda terimi önem kazanmaktadır.

Bu konuda yapılacak yeni türevsel çalışmalar, meyve ve sebze ve bunlardan oluşan kombinasyonlarının kişinin günlük diyetinde olması ile kronik hastalıklar arasındaki mekanizmalara yeni bir bakış açısı ve prostat kanseri ve diğer kanser türlerinin önlenmesinde ve tedavisinde potansiyel kanser ilaçlarının oluşumuna yeni yaklaşımlar sağlayacaktır.

Görülme sıklığı ve yüksek oranda ölümlere yol açması nedeni ile kanser günümüzde önemli bir sağlık sorunu olarak ön plana çıkmış bulunmaktadır. Bugün kanser en sık görülen ölüm nedenleri arasında kalp-damar hastalıklarından sonra ikinci sırayı almıştır. Günümüzde erkeklerde prostat kanseri, ülkemizde yüz binde 24,33'lük oranla akciğer kanserinden sonra ikinci en sık görülme oranına sahip kanser türüdür (Snader 2011).

Antioksidanlar, reaktif oksijen ürünlerinin ve serbest radikalleri tutarak radikallerin organizmadaki negatif etkilerinin önlenmesi konusunda görev aldıkları bilinmektedir. Bu yüzden antioksidanlar vücudun etkinliğinin ve sağlığının korunmasında son derece önemli bir rol oynamaktadır. Bu antioksidan maddeler doğal kökenden olanlar olarak irdelendiğinde fenolik maddeler grubu içine giren maddelerin bu özellikleri iyi bilinmektedir.

Antioksidan aktivite tayin metotları, gıda, farmasötik veya tıbbi amaçlı kullanılan bitkilerin ve onlardan kökenlenen ürünlerin (bal vb.) veya onlardan saflaştırılan biyolojik aktif maddelerin biyolojik aktivite kapasitelerinin aydınlatılması bakımından yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Bu amaçla toplam antioksidan aktivite tayini, toplam indirgeme potansiyeli kapasitesinin araştırılması, % radikal yakalama aktivitesi (DPPH yöntemi) ve metal şelatlama aktivitesi gibi metotlar sıklıkla kullanılmaktadır (Gülçin 2006b).

Tüm ballar yapılarından dolayı (antioksidan ve antimikrobiyal vb.) insan vücudu üzerinde pozitif etkiye sahiptirler. Bu çalışmada Bingöl ve çevresinde elde edilen balların genel fenolik bileşik içeriğinin belirlenmesi ve elde edilen bal ekstraktlarının antioksidan ve antimikrobiyal özelliklerinin araştırılması ile Bingöl bölgesi ballarının fenolik ekstraktının biyolojik aktivitelerinin belirlenmesi ve balın fonksiyonel gıdalarda yapay antioksidan ve antimikrobiyal maddeler yerine kullanılabilir olup olmadığının belirlenmesi amaçlanmıştır.

1.1. Bal

1.1.1. Tanımı

Bal, doğal olarak üretilen kompleks gıda maddeleri arasında yer almaktadır. Hiç bir işleme tabii tutulmadan, tatlandırıcı madde olarak kullanılabilen tek gıda maddesidir. Balın yaklaşık %80'ni çeşitli şekerlerden meydana gelmektedir. Bu şekerlerin %80'nini ise glukoz ve fruktoz oluşturur. Bal glukoz ve fruktoz gibi şekerden oluşan doymuş bir çözeltisi olsa da, diğer bazı şekerleri, organik asitleri, enzimleri, aminoasitleri, vitaminleri, flavonoidleri, fenolik maddeleri ve mineral maddeleri de içeren kompleks bir karışımdan oluşmaktadır (Gheldof et al. 2002). Balın ihtiva ettiği enerji miktarı yaklaşık olarak 100 gramda 303 kilo kaloridir. Balın enerji miktarının yüksek olması ve yapısında bulunan karbonhidratların kolay ve hızlı bir şekilde emiliminden dolayı bal tüm yaş grubundaki insanların kullanabileceği uygun bir gıdasal bir üründür (Blasa et al. 2005).

Balın antimikrobiyal etkisinin osmolaritesinden çok, balda bulunan diğer komponentlere bağlı olduğuna yönelik mikrobiyolojik çalışmalar bulunmaktadır. Baldaki en etkili antimikrobiyal ajan olarak bilinen bileşen, ısı ve ışığa duyarlı ve glukozoksidaz enzimi tarafından üretilen hidrojen peroksittir. Balın antimikrobiyal etkisi ile ilgili yapılan araştırmalarda, bal en az 10 veya daha fazla sulandırıldığında bile balın yaygın olarak çeşitli enfeksiyonlara neden olan bazı bakteri türlerinin gelişmesini tamamen yok ettiği belirtilmektedir (Molan vd. 2000; Dunford 2000).

Balın bir diğer özelliği sahip olduğu antioksidan özelliğidir. Bal; bitkisel kaynağına bağlı olarak ihtiva ettiği tokoferol, askorbik asit, flavonoidler ve diğer fenolik maddeler sayesinde antioksidatif bir etkiye de sahiptir. Bu etki sayesinde organizmayı, oksidatif olaylar sonucunda ortaya çıkan bir takım rahatsızlıklara; özellikle kansere ve kardiyovasküler kollaps (çevresel damarların genişleyip burada kanın toplanmasıyla oluşan ağır bir çöküntü)'a karşı koruduğu bildirilmektedir. (URL-1, 2013; URL-2, 2013).

Genel olarak bütün bal çeşitlerinde fruktoz miktarı glikoza oranla daha fazla bulunur. Yalnızca bir kaç bal çeşidinde fruktoz miktarı glikoz miktarından az olabilir. Balın ihtiva ettiği enzimler ve asitlerin etkisiyle balın şeker yapısında zamanla değişimler meydana

gelebilir ayrıca balın bölgesel olarak yetişen bitki çeşidine göre tadının farklılık gösterdiği de bilinmektedir (Crane 1980).

Balın tatlılığı yapısındaki şekerlerden oluşmaktadır fakat bazı ballar diğerlerine göre daha fazla tatlı olabilmekle beraber kaynağına göre acı ballarda bulunabilmektedir. Bunun nedeni balın içerisindeki şeker ve fenolik madde miktarının çeşidine ve konsantrasyonuna bağlı olarak tatlılık miktarları farklı olabilirler. Toplam şeker miktarı ve şeker kompozisyonu balın tatlı olmasını etkilemektedir. Balın tatlılığı genellikle fruktoz içeriği ve miktarı ile ilişkilidir. Ancak fruktoz miktarı tek başına balın tatlı olmasında etkili değildir. Pek çok şeker bir araya geldiklerinde tek başlarına olduğundan daha fazla tatlılık hissedilebilir (Crane 1980).

1.1.2. Balın Bileşimi ve Kimyasal Yapısı

Balın yaklaşık olarak %80'i değişik yapıdaki sakkaritlerden oluşmaktadır. Bu sakkaritlere bakıldığında; disakkarit olarak; maltozu ve sakkarozu, monosakkaritler; glukoz ile fruktozu ve bunlarla beraber olarak gentioblioz, izomaltoz, izomaltuloz, kojibioz, leukroz, maltuloz, nigeroz, naminaribioz, neutreholoz, turanoz ve polisakkarit ailesinden; 1-kestoz, centoz, erloz, izomaltotetroz, izomaltotrioz, izomaltopentoz izopanoz, melezitoz, maltotrioz, panoz, 3- izomaltosil plukoz ve theanderoz, olarak ayrılırlar (Doğaroğlu 1999).

Yaklaşık neme bağlı olarak 15 - %17'si sudan meydana gelmektedir. %3'lük kısmı ise başta enzimler olmak üzere, bala bal özelliği kazandıran ve balı değerli kılan maddelerden oluşmaktadır (Korkmaz 2006).

Bal kalori açısından zengin olmakla beraber yapısında az miktarda proteinde ihtiva etmektedir. Bal organik bileşik olan bu biyopolimerler dışında inorganik olan magnezyum, kalsiyum, alüminyum, demir, bakır, potasyum, fosfor, silisyum, krom, nikel ve kobalt gibi mineral maddeleri de bünyesinde bulundurmaktadır. Bazı balların inorganik madde miktarları ve çeşitlerinde farklılık bulunmaktadır. Salgı ballarına bakıldığında inorganik madde açısından çiçek ballarına göre daha fazla mineral madde

bulundurmaktadır. Çiçek balları salgı ballarına nazaran inorganik madde eksikliğinden dolayı kristalize olabilirler (Morse et al. 1985).

Tablo 1.1. Nektar ve salgı bileşenlerin değerleri (Crane 1975)

Bileşen	Nektar Balı		Salgı Balı	
	Ortalama	En az-En çok	Ortalama	En az-En çok
Fruktoz %	38,19	27,25 – 44,26	31,80	23,91 – 38,12
Glukoz %	31,28	22,03 – 40,75	26,08	19,23 – 31,86
Sakkaroz %	1,31	0,25 – 7,57	0,80	0,44 – 1,14
Maltoz %	7,31	2,74 – 15,98	8,80	5,11 – 12,48
Su %	17,2	13,4 – 22,9	16,3	12,2 – 18,2
pH	3,91	3,42 – 6,10	4,45	3,90 – 4,88
Yüksek şekerler %	1,50	0,13 – 8,49	4,70	1,28 – 11,50
Tayin edilemeyen %	3,1	0 – 13,2	10,1	2,7 – 22,4
Serbest asitlik	22,03	6,75 – 47,19	49,07	30,29 – 66,02
Lakton	7,11	0 – 18,76	5,80	0,36 – 14,09
Total asitlik	29,12	8,68 – 59,49	54,88	34,62 – 76,49
Kül %	0,169	0,020 – 1,028	0,730	0,212 – 1,185
Diastaz	20,8	2,1 – 61,2	31,9	6,7 – 48,4
Azot %	20,8	2,1 – 61,2	31,9	6,7 – 48,4

Nektarın yapısında bulunan sakkarozun, invertaz enzimi ve fenolik ve karboksillik asitler etkisi parçalanması ile ketoz bir şeker olan fruktoz ile aldoz bir şeker olan glukoz oluşmaktadır. Oluşan bu şekerler dönüşmüş olduklarından dolayı invert şeker denilmektedir. Balın içeriği ele alındığında yaklaşık olarak % 69-78 oranında bu invert şekerli hali bal olarak bilinmektedir (Tetik 1968; Muller et al. 1980).

Balların tatlılık oranı farklılık göstermektedir bunun nedeni içerisindeki invert şeker oranlarının ve katılan diğer şeker bileşenlerinin miktar ve çeşidine bağlıdır. Balın tatlılığı genelde içerisindeki ketoz şeker olan fruktoz ile ilişkilendirilmektedir. Bakıldığında yapılan araştırma ve analiz sonuçlarına göre içeriğindeki fruktoz miktarı fazla olan ballar daha tatlı olmaktadır.

1.2. Oksidanlar

Kimyasal bileşikler, iki veya daha çok elementin aralarında kimyasal bağ oluşturması ile meydana gelir. Bu bağlar negatif yüklü elektronlarla sarılmıştır ve bu elektronların düzeni bileşiğe kararlılık sağlar. Kararlı bileşiklerin elektronları çiftlenmiş oktetini tamamlamış halde bulunurken kararsız bileşiklerde elektronlar çiftlenmemiş yani oktetini tamamlamış oluklarından bu eksik elektronunun tamamlamak için reaksiyon özellikleri yüksek olup bir yere bağlanma eğilimindedirler. Böylelikle molekül reaktif ve kararsız bir halde bulunmaktadır.

Yapılarında bir ya da daha fazla sayıda çiftlenmemiş elektrona sahip element veya bileşiklere serbest radikaller denir. Serbest radikallerdeki çiftlenmemiş elektronlar kararlı duruma geçmek ister ve kararlı halde bulunan bir bileşikten elektron alarak, bu bileşiği yeni bir serbest radikal haline dönüştürür. Serbest radikallerin başlattığı bu zincirleme reaksiyonlar dizisi, antioksidanlar tarafından durduruluncaya kadar devam eder. Bu durum aslında hayatın her evresinde yaşamakta olduğumuz doğal bir süreçtir (Gökpınar vd. 2006).

ROS (reaktif hale gelmiş oksijen türleri) ya da diğer bir ifadeyle serbest radikaller organizma da hücre membranının yapısında bulunan lipit ve proteinlerini oksitleyerek hücre membranındaki zar lipitlerinde bozunma (dejenerasyona) meydana getirmekte böylece sinirsel sistem bozuklukları da dahil birçok hastalığa neden olmaktadır.

Ayrıca immün sistem üzerinde bağışıklığı sağlayan hücrelerin zar yapısında bozulma sağlamakta ve böylece immün sistemi yavaşlatmakta hatta bozmaktadır. Aynı şekilde çekirdek zarında oksidatif etkisinden dolayı çekirdek zarındaki bozunma ile birlikte genetik materyale etki edip DNA'yı oksitleyebilmekte ve böylece DNA üzerinde kırılma ve mutasyonlar meydana gelmesini sağlayabilmektedir. ROS ve diğer türevli oksidan maddelerin sebebiyet verdikleri rahatsızlıkları üç başlık altında toplanabilir.

- a. Genetik materyal üzerindeki defekt sonucu oluşan rahatsızlıklar.
- b. Çevresel faktörlerin oluşturduğu radikaller sonucu oluşan rahatsızlıklar.

c. Hem hücresel hem de çevresel faktörler tarafından oluşturulan reaktif türlerin sebebiyet verdiği rahatsızlıklar (URL-3, 2013).

1.3. Antioksidanlar

Antioksidan terimi, herhangi bir başka kimyasal bileşenin oksitleme kabiliyetini yavaşlatabilme ya da onun bu kabiliyetini tamamen ortadan kaldıracak molekül olarak tanımlanabilir (Moon et al. 2009). Antioksidanlar endojen olarak bilinen vücudun kendi ürettiği antioksidan olabilirken beslenme ile vücuda alınan eksojen olarak adlandırılan vücut dışı antioksidanlarda olabilir. İnsanlarda metabolik olaylar sırasında oksijen kullanımına bağlı olarak süperoksit (O_2^-), hidroksil (OH^-), peroksil (ROO^-), alkoksil (RO^-), semikuinon (Q^-), nitrik oksit (NO^-)₄ kökleri ile hidrojen peroksit (H_2O_2), peroksinitrit ($ONOO^-$) ve singlet oksijen (1O_2) gibi aktif oksijen formları meydana gelmektedir. Ayrıca radyasyon, çeşitli gazlar, ağır metaller, pestisitler, herbisitler ile tedavi amaçlı kullanılan birçok ilaç, oksidatif stres nedeni olarak gösterilen aktif oksijen oluşumuna neden olurlar. Oksidatif stres, normal metabolik faaliyetler için gerekli olan aktif oksijen-antioksidan dengesini aktif oksijen lehine bozarak; DNA, protein, karbonhidrat ve lipidler de zararlanmaya yol açmakta ve başta koroner hastalıklar, kanser, diyabet ve karaciğer tahribatı olmak üzere birçok hastalığa neden olmaktadır (Yücel ve Ötles 2001). Bu moleküller vücutta enerji üretimi döngüsünde yaşamsal faaliyetin temeli olan oksijenin solunum olayında işlenmesi sırasında, sindirim sırasında ya da dışarıdan alınan bir serbest radikal ile kimyasal olarak ilişkiye girerek reaktif radikalın organizma üzerindeki etkisini önleyen savunma mekanizmalarıdır.

Antioksidanlar çeşitli mekanizmalar ile reaktif türlerin etkilerini ortadan kaldıracaklardır. Bu mekanizmalar; Süpürme etkisi (Scavenging), söndürme etkisi (Quenching), zincir reaksiyonlarını kırma etkisi (Chain Breaking), onarma etkisi (Repair) (Gökpinar vd. 2006).

Bitkisel türevli fenolik maddeler ve vitaminlerin, antioksidan özellikleri son yıllarda üzerinde çok çalışılan ve gündemde bulunan bileşiklerdir. Vitamin C'nin, oksijen radikalleri ile diğer peroksit özellikte oksidatif bileşiklerin temizlenmesinde etkili antioksidan olduğu son yıllardaki araştırmalarda ortaya çıkartılmıştır. Vitamin E ise yine

aynı şekilde reaktif oksijen türlerine karşı antioksidatif olarak etkili antioksidan olarak oksidasyonu önler. β -karoten ve diğer fenolik bileşiklerin antioksidan özelliğini singlet oksijen aktivitesi (vücudun ışığa hassasiyet reaksiyonu) ve peroksil köklerine karşı göstermektedir (Yücel ve Ötles 2001).

Antioksidanlar ile yapılan çalışmalar göstermiştir ki, özellikle bitkisel kaynaklı antioksidanların aktivitesi ile birçok hastalığın gelişmesini önlemekle birlikte tedavi amaçlı olarakta etkin olduğu belirlenmiştir. Son yıllarda bilimsel literatürde bitkisel droglar ve bunların türevlerinin içeriklerinde bulunan doğal antioksidanlar sayesinde özellikle flavonoid ve türevleri ile diğer fenolik bileşik grubunun araştırılması ile birçok bilimsel sonuçlar elde edilmiştir (Frankel et al. 2008, Moon et al. 2009).

1.4. Fenolik Bileşikler

Benzen halkasına sahip olan organik bileşikler genel olarak fenolik maddeler olarak bilinirler. Genellikle bitkilerin kendilerini koruma amacıyla tehdidin şiddetine göre değişmekle birlikte bitkide varlığını devamlı olarak gördüğümüz, primer metabolitlerden sentezledikleri sekonder metabolit (ikincil metabolitler) olarak adlandırılmaktadır. Bitkilerdeki fenolik bileşiklerin en önemli ve en bol bulunanları fenolik asitler ve flavonoidler olmak üzere 2 ana gruba ayırabiliriz. Bunların dışında tanenlerde bulunmaktadır (Ribéreau et al. 2000).

Bitkiler yapılarındaki fenolik bileşikler ve bunların türevleri sayesinde kendilerine özgü koku, renk ve tat barındırırlar. Böylece tarih boyunca organizmaların tükettikleri bitkisel kaynakların renk oluşumunda ve bu rengin cezbediciliğinin de, koku olarak kokunun çekiciliğinde ve tat olarak kendine has bir lezzetin oluşumu ile organizma açısından tüm bileşenleri ile çekici olmuştur.

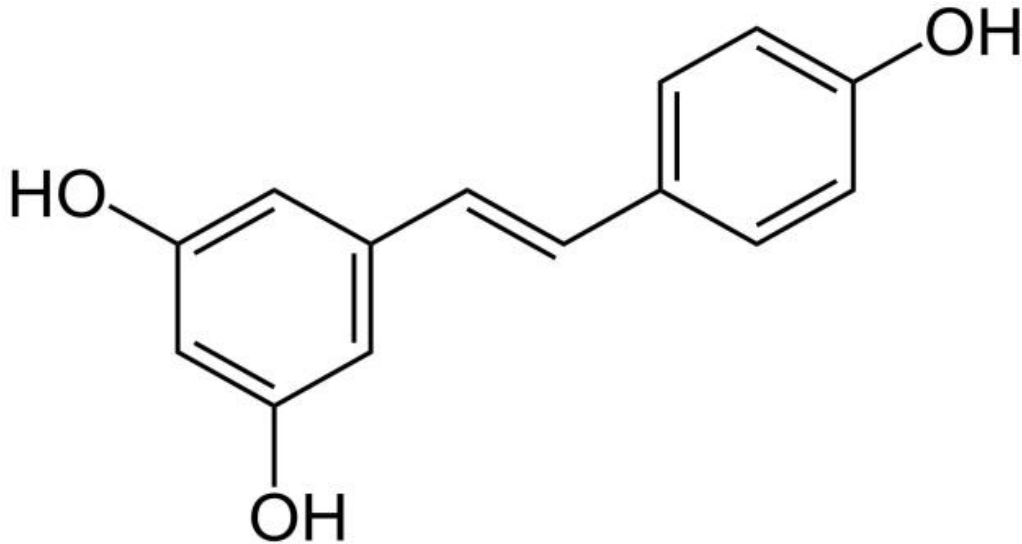
Arıların nektar özütlerini renk, koku gibi özellikler açısından insanlarda aynı özellikler cezbedici olurken bu ürünlerin tüketimi vücutlarında faydaları ile etnobotanik olarak kullanılmaya başlanmış ve günümüzde de halk arasında belli hastalıklara belli bitkilerin kullanılması duyuşal özellikler vasıtasıyla olmuştur. Ancak son yıllarda bu cezbediciliği

sağlayan fenolik bileşiklerin çok etkin birer bileşik grubu olduğu ve hem önleyici hem de tedavi edici özellikleri gün yüzüne çıkartılmıştır.

Son yıllarda bitkisel kökenli gıdalarda bulunan fenolik bileşiklerin yoğun bir şekilde incelenmesi, bunların insan sağlığı ile yakından ilişkisi olduğunun saptanmasından ve özellikle de kanser insidansını azalttığı yönündeki epidemiyolojik bilgilerden kaynaklanmaktadır. Buna karşın, bazı çalışmalar flavonoidlerin karsinojen olduğunu savunsa da, diğer birçok çalışmada elde edilen bulgular, flavonoidlerin antitümör ve antikarsinojen olduğunu desteklemektedir (URL-3, 2013).

1.4.1. Fenolik Asitler

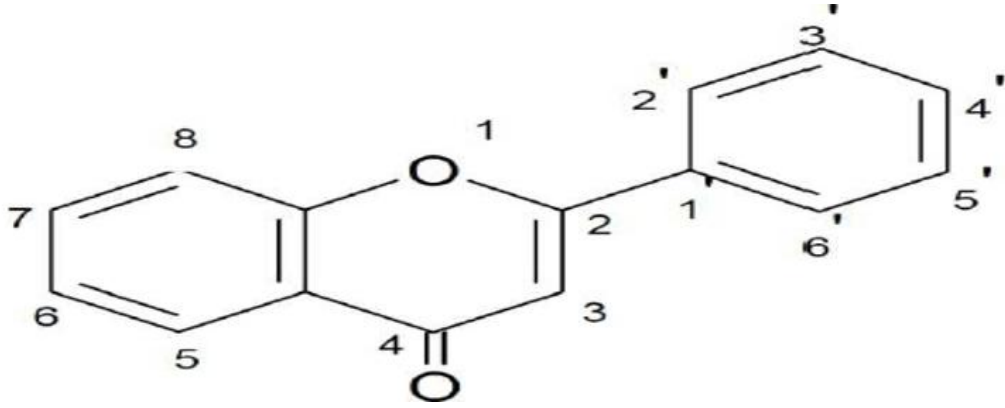
Fenolik asitler, kimyasal yönden hidroksisinnamik (sinamik) ve hidroksibenzoik (benzoik) asitler olmak üzere iki gruba ayrılmaktadır (Şekil 2. 1) Hidroksibenzoik asitler C6-C1 (fenilmetan), hidroksisinnamik asitler ise C6-C3 (fenilpropan) yapısındadır. Benzoik asit türevlerine örnek olarak, protokatesuik asit, p-hidroksibenzoik asit, vanilik asit, salisilik asit ve gensitik asit verilebilir. Kumarik asit, kafeik asit, ferulik asit vesinapik asit ise sinamik asit türevlerindedir (Ribéreau et al. 2000, Yücel ve Ötles 2001, Nizamoglu ve Nas 2010).



Şekil 1.1. Fenolik asitlerin kimyasal yapıları

1.4.2. Flavonoidler

Flavonoidler yüksek antioksidan kapasitesi göstermektedir. Flavonoidler C₆-C₃-C₆ (difenilpropan) formunda iki fenil halkasının bir propan zinciri ile birleşmesiyle oluşur ve 15 karbon atomuna sahip ana bir iskelete sahiptirler.



Şekil 1.2. Flavonoidlerin genel yapısı (Fraga 2010)

Antosiyanidinler, flavonlar, flavonoller, kateşin ve lökoantosiyanidinler ile protoantosiyanidinler olmak üzere 5 alt grupta incelenirler. Flavonoidlerin yapısındaki OH grupları, reaktif özelliklerinden dolayı kolaylıkla iyonize olup aktif bileşik adına şeker gruplarının bağlanmasına oldukça elverişlidirler. Zaten doğal olarak bulunan bitkisel kaynaklı birçok bileşik aglikan formundan ziyade glikolizlenerek çeşitli şeker grupları içerirler flavonoidler de bunlardan bir gruptur (Ribéreau et al. 2000, Yücel ve Ötles 2001, Nizamlıoğlu ve Nas 2010). Flavonoid ailesi bitkiler alemi içerisinde renk, koku ve düşmandan korunma gibi özelliklere sahip olduklarından dolayı gıda ve tedavi amaçlı kullanılan bitkilerin içerisindeki en yaygın ikincil (sekonder metabolitlerin) metabolitlerin en bol bulunan fenolik bileşikleridir. Bunlar bitkisel ürünlerin kalitesinde çok önemlidirler (Fabre et al. 2001; Borbalán et al. 2003).

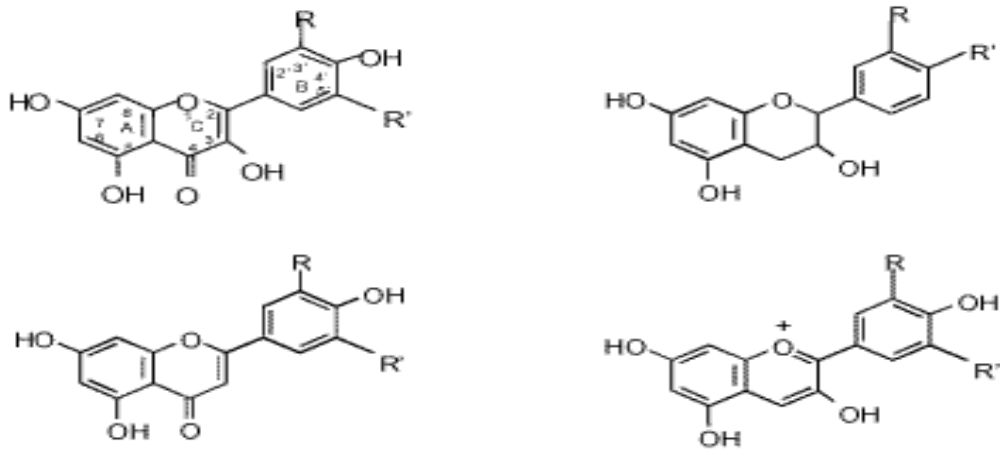
Flavonoidlerin güçlü antioksidan özellikleri kimyasal yapı özelliklerinden kaynaklanmaktadır. Yapılarındaki benzen halkasının hidroksil grupları sayesinde iyonlaşmaları kolay olabilmekte uygun pH'da bu iyonlaşma kabiliyetleri onların yüklü metal gruplarına bağlanmalarını ve onların negatif etkilerini ortadan kaldırarak adeta radikalleri ortadan kaldırmaktadırlar. Halkasal aromatik yapıları onlara güçlü inert bir

yapı oluşturur ve böylece kararlı olarak reaksiyonda kalabilir ve antioksidan ve şelatlama sonrası bozunmadan kalabilirler (Cam ve Hışıl 2003; Naczki et al. 2004). Bu özellikleri onların hücre dejenerasyonu sonucunda meydana gelen dejeneratif hastalıklardan korunması açısından son derece önemli olduğu bilinmektedir. Flavonoidler aynı zamanda bitkilerin U.V. radyasyonun etkilerinden korunmasında kendi zararlıları olan mikroorganizma ve virüslere karşı onları savunmasında son derece önemlidir. Bu özellikleri sayesinde eksojen kaynak olarakta organizmada aynı özellikleri gösterebilmektedir. Aynı zamanda bu bileşik grubu çeşitli kanserlere karşı da sitotoksik olarak etkin olduğu bulunmuştur (Larocca et al. 1990; Hirano et al. 1994) ve yumurtalık kanseri (Benavente et al. 1997)

1.4.3. Flavonlar ve Flavonoller

Flavon ve flavon glikozidleri U.V. ışınlarını tutarak bu ışınları sarı renk olarak yansıtmada kabiliyetinde floresan özelliğe sahip bileşiklerdir. Flavonlarda flavan halkası C4 pozisyonundan okside olmuş durumdadır ve çift bağ (C2=C3) içermektedir. C3 atomuna hidroksil grubunun bağlanması ile ise flavonoller oluşmaktadır.

Temel flavonoid molekülünü de orta halkanın 3. karbon atomuna flavonlarda (H), flavonollarda (OH) grubu bağlanmıştır. Antosiyanidinler gibi bunlarda şekerlerle glikozit halinde bağlanmış olarak bulunurlar (Nizamlioglu ve Nas 2010).



Şekil 1.3. Flavonlar ve flavonollerin kimyasal yapısı

2. KAYNAK ÖZETLERİ

Aljadi AM, Kamaruddin MY (2004), “Malezya Yerel İki Adet Çiçek Balının Fenolik İçeriğinin ve Antioksidan Kapasitelerinin Belirlenmesi” konulu ortak bir makalesinde teorik olarak hesaplamasını yapmış ve deneysel datalarla karşılaştırmasını yapmıştır.

Al-Mamary M, Al-Meeri A, Al-Habori M (2002), “Beş Farklı Yemen Balının İthal Ballara Göre Fenolik İçeriği ve Antioksidan Aktivitelerin Kıyaslanması” konulu ortak bir makalesinde teorik olarak hesaplamasını yapmış ve deneysel datalarla karşılaştırmasını yapmıştır.

Aytuğ B, Aykut S, Meriv N, Edis G (1971), “İstanbul Çevresi Otsu ve Odunsu Bitkilerin Polen Yoğunluğu ve Atlası” konulu ortak bir makalesinde teorik olarak hesaplamasını yapmış ve deneysel datalarla karşılaştırmasını yapmıştır.

Barros L, Calhella RC, Vaz JA, Ferreira ICFR, Baptista P, & Estevinho LM (2007), “Portekiz Yenilebilir Yabani Mantarlarının Metanolik Özlerinin Antimikrobiyel Aktivitesi ve Biyoaktif Bileşikleri” konulu ortak bir makalesinde teorik olarak hesaplamasını yapmış ve deneysel datalarla karşılaştırmasını yapmıştır.

Beretta G, Orioli M, Facino RM (2007), “Endotel Hücre Kültürlerinde Balı Antioksidan ve Radikal Süpürücü Aktivitesi” konulu ortak bir makalesinde teorik olarak hesaplamasını yapmış ve deneysel datalarla karşılaştırmasını yapmıştır.

Berghe VA, Vlietinck AJ (1991), “Yüksek Bitkilerden Antibakteriyel ve Antiviral Maddeler İçin Tarama Yöntemleri” konulu ortak bir makalesinde teorik olarak hesaplamasını yapmış ve deneysel datalarla karşılaştırmasını yapmıştır.

Beytur A, Tekin S, K. Taha, E. Zuhail, Süleyman S. (2011) “Yeni Sentezlenen Bir Tiyosemikarbazon Türevinin Prostat Kanseri Hücre Kültürleri Üzerine Antikanserojenik Özelliklerinin Belirlenmesi” konulu ortak bir makalesinde teorik olarak hesaplamasını yapmış ve deneysel datalarla karşılaştırmasını yapmıştır.

Blasa M, Candiracci M, Accorisi A, Piacentini MP, Albertini MC. and Piatti, E (2005), “Ham Millefiori Balı İçerisindeki Antioksidan Miktarının Belirlenmesi” konulu ortak bir makalesinde teorik olarak hesaplamasını yapmış ve deneysel datalarla karşılaştırmasını yapmıştır.

Borbalán ÁMA, Zorro L, Guillén DA, Barroso CG (2003), “Kırmızı ve Beyaz Üzüm Çeşitlerinin Polifenol İçeriğinin Sıvı kromatografisi Kütle Spektrometresi Tarafından İncelenmesi” konulu ortak bir makalesinde teorik olarak hesaplamasını yapmış ve deneysel datalarla karşılaştırmasını yapmıştır.

Bravo L (1998), “Polifenollerin Metabolizma ve Beslenmedeki Önemi” konulu makalesinde teorik olarak hesaplamasını yapmış ve deneysel datalarla karşılaştırmasını yapmıştır.

Cam M. ve Hışıl Y (2003), “Gıdalardaki Flavonoidler ve Önemleri” konulu ortak bir makalesinde teorik olarak hesaplamasını yapmış ve deneysel datalarla karşılaştırmasını yapmıştır.

Darendelioglu E, Tartik M, Aykutoglu G, & Baydas G (2016), “Türk Propolisinin İnsandaki Endotel Hücrelerini Homosistein Kaynaklı Apoptozdan Korur” konulu ortak bir makalesinde teorik olarak hesaplamasını yapmış ve deneysel datalarla karşılaştırmasını yapmıştır.

Effem SEE (1988), “Balın Yara İyileştirici Özellikleri Üzerine Klinik Gözlemler” konulu makalesinde teorik olarak hesaplamasını yapmış ve deneysel datalarla karşılaştırmasını yapmıştır.

Fernandez-Cabezudo MJ, El-Kharrag R, Torab F, Bashir G, George JA, et al (2013), “Manuka Balının İntrevenöz Uygulanması Bir Melanoma Fare Modelinde Kemoterapiyle Kombine Edildiğinde Tümör Büyümesini İnhibe Eder ve Konakçının Sağ Kalımını Geliştirir” konulu makalesinde teorik olarak hesaplamasını yapmış ve deneysel datalarla karşılaştırmasını yapmıştır.

Gheldof N, Wang XH, Engeseth NJ (2002), “Çeşitli Çiçek Kaynaklarından Gelen Balların Antioksidan Bileşenlerin Tanımlanması ve Miktarının Belirlenmesi” konulu makalesinde teorik olarak hesaplamasını yapmış ve deneysel datalarla karşılaştırmasını yapmıştır.

Hajji M, Jarraya R, Lassoued I, Masmoudi O, Damak M, Nasria M, (2010), “Çeşitli Çözücü Ekstrelerinin Antioksidan ve Antimikrobiyal Aktiviteleri” konulu ortak makalesinde teorik olarak hesaplamasını yapmış ve deneysel datalarla karşılaştırmasını yapmıştır.

Kassim M, Achoui M, Mustafa MR, Mohd MA, Yusoff KM (2010), “Malezya Bal Özlerindeki Ellajik Asit, Fenolik Asitler ve Flavoidler İn Vitro İnflamatuar Etkinliği Göstermektedir” konulu ortak makalesinde teorik olarak hesaplamasını yapmış ve deneysel datalarla karşılaştırmasını yapmıştır.

Molan PC (2006), “Balın Yaralarda Pansuman Maddesi Olarak Kullanılmasını Destekleyen Kanıtlar” konulu ortak makalesinde teorik olarak hesaplamasını yapmış ve deneysel datalarla karşılaştırmasını yapmıştır.

Nizamlioglu MN, Nas S. (2010), “Meyve ve Sebzelerde Bulunan Fenolik Bileşiklerin Yapıları ve Önemleri” konulu ortak makalesinde teorik olarak hesaplamasını yapmış ve deneysel datalarla karşılaştırmasını yapmıştır.

Yücel U, Ötles S (2001), “Şarabın Bileşimi ve Beslenmedeki Önemi” konulu ortak makalesinde teorik olarak hesaplamasını yapmış ve deneysel datalarla karşılaştırmasını yapmıştır.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

Bu çalışmada materyal olarak Bingöl yöresinde üretilen toplanan toplam 5 adet çiçek balı kullanıldı. Toplanan bal örnekleri, 2014 yılının hasat balı yapan arıcılardan temin edildi. Bal örnekleri, ağzı kapalı kaplarda toplandı ve çalışma süresince oda sıcaklığında steril cam kavanozlar içerisinde muhafaza edildi. Muhafaza esnasında herhangi bir fiziksel veya kimyasal işlem uygulanmadı.

3.1.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Kullanılan tüm kimyasallar ve reaktifler analitik yada HPLC sınıfı saflıkta tedarik edildi. Ekstraktlardaki fenolik asit ve flavonoidlerin miktarının belirlenmesi, antioksidan kapasitenin değerlendirilmesi için benzoik asit, kafeik asit, sinnamik asit, p-kumarik asit, gallik asit, sinapik asit, askorbik asit p-hidroksibenzoik asit syringic, asit, hidrokörük asit, sülfürik asit, galangin, kaempferol, kuersetin, myrcetin, apigenin, luteolin, chrysin, hesperetin, naringenin, riboflavin, 1,1-difenil-2-pikril-hidrazil (DPPH·) radikali, ferrozin, linoleik asit, α - tokoferol, trolox, polioksietilensorbitan monolaurat (Tween-20) ve trikloroasetik asit (TCA), folin-ciocalteu reaktifi, sodyum karbonat, sodyum fosfat, alüminyum klorür, sodyum hidroksit, sodyum nitrit, sodyum molibdat, amonyum molibdat, metanol, etanol, butillendirilmiş hidroksianisol (BHA), bütillenmiş hidroksitoluen (BHT), demir klorür, demir ferro siyanat, hidrojen peroksit, aseton, hegzan, etil asetat, etanol fenontrilin kullanıldı.

Hücre kültürü için gereken malzemeler: DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium), RPMI 1640, tripsin-EDTA, tripan blue %4, fetal calf serum, ribonukleaz A, WST-1 hücre canlılık ve yayılım maddesi, penisillin-streptomisin, 25 cm²'lik T flasklar, 1 mL serolojik pipetler, 5 mL serolojik pipetler, 48 gözlü plateler, 15 mL santrifüj tüpleri, 1,5

mL endorff tüpleri, PBS (phosphate buffer saline), 0,22 µm por çapına sahip olan süzme kartuşları sterilizasyon amaçlı kullanılacaktır.

3.1.2. Yararlanılan Alet ve Cihazlar

Mikrobiyolojik emniyet kabini (Bilser), UV-VIS Spektrofotometre (Shimadzu/ Jasco V650), UV-Spektrofotometre küveti (3cm³'lük Kuartz Küvet), Manyetik karıştırıcı (Ika), Isıtmalı su banyosu (Wise Clean), Otomatik pipetler (Rainin), Dairesel sallayıcı (Gerhardt), Derin dondurucu (-86°C, Nuair), Döner evaporatör (Ika RV06-ML), pH-metre (Hanna Instrument), Hassas terazi (Precisa/ Denver), İnkübatör (Elektro-Mag (0-300°C) Vorteks (Ika MS3 Basic), Saf su cihazı (GFL 2004), Dispenser (Isopenser), Santrifüj (Hettich Universal 320), Buzdolabı (4°C, Arçelik), Otoklav (Hirayama), Etüv (Memmert 100-800) %5 CO₂ inkübatörü (Nuair) kullanıldı.

3.2. Ekstraksiyon Tekniği

Örnek bal örnekleri Bingöl ili Kiğı, Servi, Sancak, Solhan ve Yayladere ilçe ve beldelerinden temin edildi. Bal örnekleri cam steril kavanozlar içerisinde çalışma başlayıncaya kadar oda sıcaklığında direkt güneş ışığı almayan bir bölgede saklandı. Muhafaza esnasında bal örneklerine herhangi bir fiziksel veya kimyasal işlem uygulanmadı. Her bir bal örneğinden 100 gr 1 Lt 1x10⁻² mol/dm³ HCl (300 mL) ile karıştırıldı. Bal iyice çözüldükten sonra süzgeç kağıdından süzülerek katı partiküller uzaklaştırıldı.

Daha sonra süzüntü karışımına (pH'sı 2 olan distile su ile bal) Amberlite® XAD-2 eklendi, oda sıcaklığında yaklaşık bir saat boyunca manyetik karıştırıcı ile karıştırıldı. Amberlite® parçacıkları kolona yüklendi (Amberlite® XAD-2, %80-90 bir oranda baldaki fenolik bileşikler absorbe eder. Genel olarak, bal örnekleri HCl ile pH:2 olana kadar asitleştirildi, Amberlite® XAD-2 ihtiva eden kolon içinden geçirildi. Şekerler ve diğer daha polar bileşikler, asitleştirilmiş su kolondan akıtıldı, fenolik bileşikler ise kolon üzerinde kaldı. Bütün fenolik kısım metanol kullanılarak alındı ve ekstrakt elde edildi. 1x10⁻² mol/dm³ HCl (300 mL) ile ve deiyonize su (500 mL) ile birlikte kolon dolgu malzemesi yıkandı ve diğer bal bileşenleri çıkarılması için yıkandı. Kolonda adsorbe

edilmiş olan fenolik bileşenler 1000 mL metanol (pH: 7) ile yıkanarak alındı ve 40°C'de rotary evaporatörde metanolü uçuruldu ve 40°C'de vakumlu etüvde tutuldu. Bal örneklerinin fenolik içerikleri bir miktar su ve dietil eter ile üç kez çözüldü. Fraksiyonlama sonucunda her bir ekstrakt için 2 adet fraksiyon elde edildi ve elde edilen ekstrakt içindeki çözücüler uzaklaştırıldı. Kombine ekstraktlar buharlaşmaya maruz bırakıldı, sonra ağırlıkları ölçüldü ve verim hesaplaması yapıldı.

3.3. Antioksidan Aktivitenin Belirlenmesi

3.3.1. Toplam Fenolik Madde Miktarı Tayini

Folin ve Ciocalteu'nun metodu kullanılarak toplam fenol içeriği gallik asit eşdeğeri olarak kilogram başına hesaplandı. Bunun için 0,5 mL sulandırılmış ekstrakt solüsyonu 0,5 mL Folin ve Ciocalteu solüsyonu ile karıştırıldı. Sonrasında bu karışım 5 dakika karıştırıldı ve üzerine 0,5 mL sodyum karbonat (litresinde 200 gram olacak şekilde hazırlanan) eklendi ve 1 dakika karıştırmaya devam edildi. Son hacim 5 mL olacak şekilde distile su eklendi, 25 derecede 90 dakika inkübe edilecek devamında 760 nm de absorbansı su/sodium karbonat kör solüsyonuna karşı okutuldu. Gallik asit monohidrat standart gibi kullanılarak çıkarılan standart grafiğine karşı değerler okundu ve toplam fenolik içerik gallik asit eşleneği olarak verildi (Hajji et. al. 2010).

3.3.2. Toplam Flavonoid İçeriğinin Belirlenmesi

Toplam flavonoid miktarının belirlenmesi için, bal fenolik ekstrakt ekstraktından 250 µL alınarak 1,25 mL distile suyun içerisine aktarıldı ve bu karışımın üzerine 75 µL %5'lik NaNO₂ solüsyonu eklenerek karıştırıldı. 5 dakika sonra %10'luk AlCl₃.H₂O solüsyonu bu çözeltiliye eklenerek karıştırıldı. Bunu takip eden altıncı dakikada, 1 M NaOH'dan 500 µL eklenir üzerine 275 µL distile su eklenerek tüm karışım çok iyi ve nazikce karıştırıldı. Ortaya çıkacak olan pembe renk 510 nm'de okunarak daha önceden hazırlanan (+) - kateşin standart kalibrasyon grafiğinde göre okundu ve (+) - kateşin eşleneği olarak toplam flavonoid içeriği bal fenolik ekstraktın kilogramında miligram cinsinden hesaplandı (Estevinho et al. 2007).

3.3.3. Toplam Fenolik Asit İçeriği (TPA)

Taze olarak hazırlanan bal fenolik ekstraktı (1,0 mL) 0,5 M hidroklorik asit (2,0 mL) ve 10 gr sodyum nitrit 10 gr sodyum molibdat'ın 100 mL suda çözülmesiyle hazırlanan reagent (2,0 mL) eklendi. Bunu takiben %8,5 (w/w) sodyum hidroksitten (2,0 mL) ekledi. Daha sonra son hacim 10 mL olacak şekilde distile su ilave edildi. Absorbans 505 nm de okutuldu. Kör olarak her bir ekstrakt için 10 mL su kullanıldı.

Toplam fenolik asit içeriği sinapik asit kullanılarak standart kalibrasyon eğrisi oluşturuldu. Bu kalibrasyon eğrisinden sinapik asit eş değeri (mg/g) olarak toplam fenolik asit içeriği hesaplandı (EurPharm 5).

3.3.4. DPPH Radikalinin Etkisinin Giderilmesi

Sulu bal fenolik ekstraktlarının değişik konsantrasyonlarda ya da fenolik ekstraktın (0,3 mL) içerisine, litrede 6×10^{-5} mol olacak şekilde hazırlanan DPPH radikali içeren 2,7 mL metanolik solüsyon karıştırıldı. Bu karışım güçlü bir şekilde karıştırılarak 60 dakika karanlık bölgede bekletildi. DPPH radikalinin azalması 517 nm'de absorpsiyonunun ölçülmesi ile kararlaştırıldı. Bu radikalın etkinliğinin giderilmesi çalışmaları çeşitli araştırmacıların ortaya koydukları metodu takiben yapıldı. Radikalın etkinliğinin giderilmesi için bal fenolik ekstraktından elde edilen ekstrakt ile radikal karıştırılarak spektrofotometrik olarak okuma yapıldı ve bu okuma sonucunda DPPH'nin renginin giderilmesi ile etkinliğin miktarı hesaplandı (Hatano et al. 1988).

3.3.5. İndirgeyici Güç Özelliğinin Ölçülmesi

Değişik konsantrasyonlar da sulandırılmış bal fenolik ekstraktlardan 2,5 mL alınarak 2,5 mL pH: 6,6 olan litresini de 200 mmol bulundu ve hazırlanan sodyum fosfat tamponu ile %1'lik 2,5 mL potasyum ferri siyanit ile karıştırıldı ve 50 derece de 20 dakika inkübe edildi. Üzerine %10'luk hazırlanan trikloroasetik asitten 2,5 mL katıldı ve bu karışım 1000 rpm'de 8 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrasında üst faz alındı yaklaşık 5 mL

üzerine 5 mL deiyonize su ve 1 mL %0,1'lik demir klorid konularak spektrofotometrik olarak 700 nm'de okuması yapıldı. Yüksek absorbands yüksek indirgeyici özelliği gösterdi. BHA ve α -tokoferol standartlarına karşı hesaplama yapıldı (Yu et al. 2004).

3.3.6. Metal Şelatlama Aktivitesinin Ölçülmesi

Metal şelatlama aktivitesine demir şelatlama özelliği üzerinden bakıldı. Dinis, Madeira ve Almeidam (1994)⁽¹⁹⁾ metoduna göre yapıldı. ,bu metoda göre özellik belirlenmesi kısaca; her bir 0,5 mL ekstrakt'a 1,6 mL deiyonize su ve 0,05 mL 2 mM FeCl₂'den eklenerek başlandı. 30 saniye sonrasında 5 mM Ferrozine'den 0,1 mL eklendi. Ferrozine iki değerlikli demir ile rekasiyona girdiğinde suda çok iyi çözünür hale geldi (Kimyasal olarak tepkime verdiğiinden dolayı küçük patlamalar ile reaksiyon verdi). Bunu takiben 10 dakika oda sıcaklığında bekletildi karışımın Fe⁺² Ferrozine kompleksinin absorbandsı 562 nm'de ölçüldü. Böylelikle ekstraktın demiri şelatlama aktivitesi aşağıdaki formül kullanılarak hesaplandı (Yu et al. 2004).

$$\text{Şelatlama Oranı} = (A_0 - A_1) / A_0 \times \% 100;$$

Burada **A₀** kontrol ya da körün absorbandsı, **A₁** ise ekstraktın varlığında ölçülen absorbands değeridir.

3.3.7. Toplam Antioksidan Kapasitenin Belirlenmesi

Örneklerinin antioksidan aktiviteleri phosphomolybdenum yöntemi ile Prieto ve diğerlerinin (1999) yapmış oldukları çalışmadaki metot kullanılarak değerlendirildi ve askorbik asit eşdeğeri olarak ifade edildi. Kısaca, 0,4 mL metanolde çözdürülmüş ekstrakt ile 4 mL reaktif çözeltisi (0,6 M sülfürik asit, 28 mM sodyum fosfat ve 4 mM amonyum molibdat) karıştırıldı. Kör olarak bal fenolik ekstraktı yerine metanol kullanıldı. Reaksiyon karışımı vortex ile karıştırıldı ve su banyosunda 90 dakika süreyle 95⁰C'de bekletildi ve daha sonra absorbandsı 695 nm dalga boyunda ölçüldü. Antioksidan aktivitesi, askorbik asit eşdeğeri (AAE mg/1 gr bal fenolik ekstrakt) olarak hesaplandı (Dinis et al. 1994).

3.4. PC-3 Hücre Hatları Üzerindeki Antikanser Etkilerinin Belirlenmesi

3.4.1. Hücreler

PC-3 hücre hatları ile MCF-7 hücre hatları halen Merkezi Laboratuvar Hücre Kültürü Laboratuvarında bulunmakta ve bu hücre hatları çalışmada kullanıldı.

3.4.2. Medium Hazırlama

89 mL RPMI 1640, 10 mL fetal calf serumu ve 1 mL penisillin-streptomisin medium kabında karıştırıldı. İhtiyaç oldukça aynı oranda gereken maddeler karıştırıldı ve bu medium hazırlandı.

3.4.3 Bal Ekstraktlarının PC-3 İçeren Platelere Ekilmesi

PC-3 hücreleri %5 CO₂'li inkübatörde 37⁰C'de 25 cm² lik hücre kültür flasklarında yeterli sayıda çoğaltıldı sonra her flasktan eski medium 5 mL'lik serolojik pipet kullanılarak otomatik pipetle tamamen çekilerek uzaklaştırıldı. Ölü hücreleri flasktan uzaklaştırabilmek için her flaska 1 mL PBS eklendi ve hücrelerin PBS ile tamamen yıkanması sağlandı. Eklenen PBS tekrar çekilerek uzaklaştırıldı.

Hücreleri kaldırmak için her flaska 1 mL tripsin-EDTA enzimi eklenerek %5 CO₂ atmosferli inkübatörde 3 dk inkübe edildi. Hücrelerin yeterli derecede kalktığından emin olunduktan sonra her bir flaska 1 mL RPMI-1640+fetal calf serum+penisillin-streptomisin mediumu eklenerek tripsin enziminin etkisi inaktif edildi. Her flasktaki sıvının tamamı otomatik pipetle çekilerek 15 mL falkon tüpüne aktarıldı.

Falkon tüpteki sıvı 2500 rpm'de 2 dakika santrifüj edildikten sonra süpernatant kısmı uzaklaştırıldı. Hücrelerin üzerine 1 mL RPMI 1640 medium eklendi ve hücrelerin mediumla iyice karışması sağlandı. Hücre sayımı için falkon tüpten mikropipet kullanılarak 10 µL örnek alındı ve ependorf tüpe konulur üzerine 10 µL tripan mavisi eklenir ve iyice karışması sağlandı.

3.4.4. Bal Ekstraktlarının Hücre Canlılık Testi

Hücre sayımı ile yaşayan hücreler sayıldı. Şekil 3.1’de gösterildiği gibi 96 kuyucuklu plakalara hücre ekimi yapılacağı için her kuyucukta yaklaşık 2×10^4 hücre olacak şekilde kullanıldı, hücre ve medium miktarı hesaplandı ve medium eklenerek 15 mL falkon tüp içinde hazırlandı. Her kuyucuğa 100 μ L hücre konduktan sonra hücreler %5 CO₂’li inkübatörde çoğalmaları için 48 saat inkübe edildi.

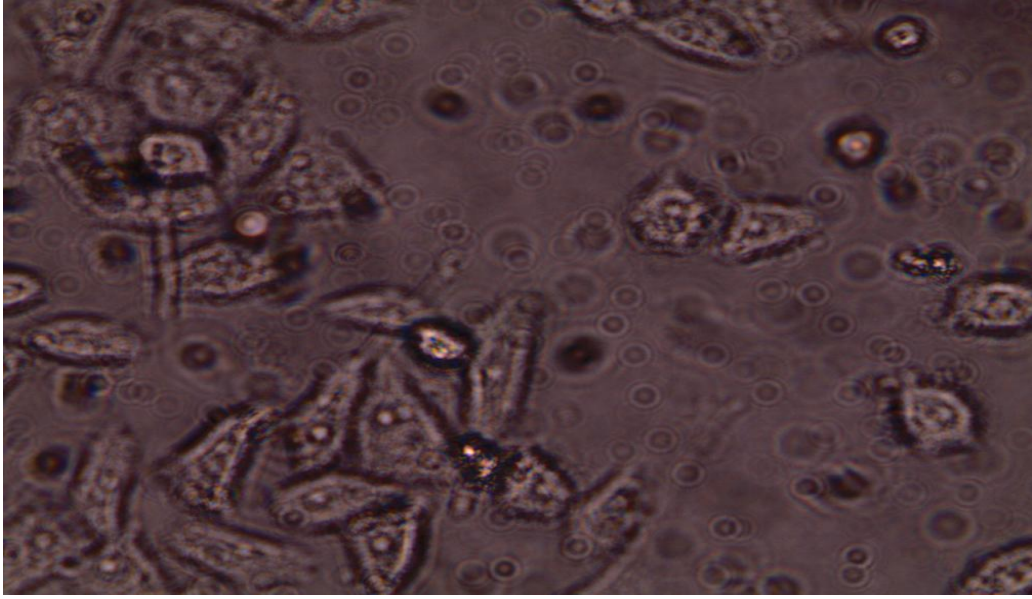
Denemek istenen her bir örnekten 1 mg tartıldı ve 1,5 mL ependorf tüp içerisinde 1 mL RPMI 1640 besiyeri içinde çözünerek istenen konsantrasyon hazırlandı. Hazırlanan konsantrasyonun sonikatörle iyice karıştırıldı, karışan bu örneklerin besiyeri içerisinde homojen olarak dağılması sağlandı. Tüm kuyucuklarda ki besiyeri hücrelere zarar vermeyecek şekilde mikro pipetle çekildi ve ortamdan uzaklaştırıldı. Tümör hücreleri, 5-100 μ g/mL olacak konsantrasyonlarda bal fenolik ekstraktına sahip olan besiyeri ile 5% CO₂’li inkübatörde 48 saat inkübe edildi ve örneklerin hücrelere etki etmesi beklendi. Kontrol grubu olarak kuyucuklara sadece RPMI 1640 besiyeri ilave edildi.

Diğer 96 kuyucuklu plaka alınarak ters mikroskopta incelendi ve bu hücrelerin yeterince çoğaldığından emin olunduktan sonra her bir kuyucuğa bal fenolik ekstraktlarından 6,25-200 μ g/mL konsantrasyonlarında her kuyucuğa eklendi ve 72 saat inkübe edildi. Pozitif kontrol olarak sadece medium, negatif kontrol olarak da H₂O₂ li medium hücrelere uygulandı. 72 saat sonunda her bir kuyucuğa 15 μ L WST-1 maddesi eklendi. Hücreler %5 CO₂’li inkübatörde 37°C 4 saat inkübe edildi. 4 saat inkübasyondan sonra 48 gözlü plate ELISA reader cihazına yerleştirildi ve her bir kuyucuğun 440 nm deki absorbans değerleri alındı ve kaydedildi. WST-1 toksisite testinde yaşayan hücreler sarı renk oluşturdu ve ölü hücrelerde renk oluşumu gözlenmedi. Şekil 3.2 ve Şekil 3.3’de sitotoksik etkiye uğrayan hücrelerin görüntüleri verilmiş olup, elde edilen toksik etki aşağıdaki formül ile hesaplandı.

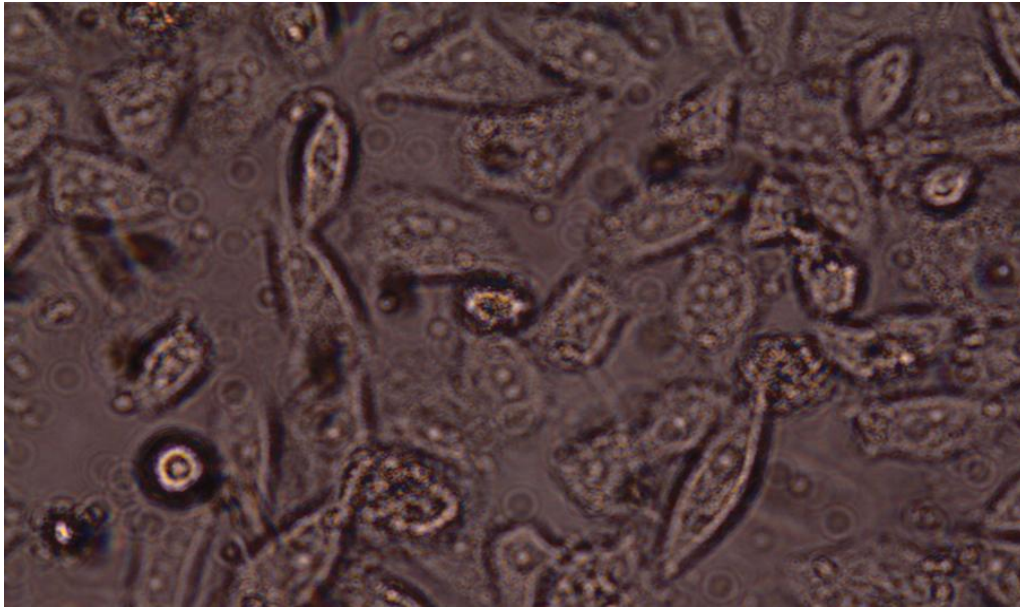
$$\% \text{ İnhibisyon} = [1 - (\text{Test} - \text{MI}) / (\text{MO} - \text{MI})] \times 100.$$



Şekil 3.1. 96'lık plakalara PC-3 hücre ekimi



Şekil 3.2. İnhibe olan PC-3 hücrelerin görüntüsü



Şekil 3.3. İnhibe olan PC-3 hücrelerin görüntüsü

3.4.5. Proteinlerin İzolasyonu

Uygulama yapılan PC-3 hücre hattı için hücreler 1:10 (w/v)' luk soğuk hipotonik tampon [10 mM HEPES (pH 7,8), 10 mM KCl, 2 mM MgCl₂, 1 mM DTT, 0,1 mM EDTA, ve 0,1 mM phenylmethylsulfonyl-fluoride (PMSF)] içinde homojenize edildi ve homojenatlar soğutmalı santrifüjde +4°C'de 60 dakika süreyle 60,000 x g'de santrifüj edildi. İlk süpernatantlar mikrosantrifüj tüplere alınarak analizler yapılmaya kadar -86°C'de saklandı. Süpernatantlar yeni tüplere alınarak protein konsantrasyonları Bradford metoduna uygun şekilde tayin edildi. Proteinlerin proteaz aktivitesi ile bozulmalarını engellemek amacıyla homojenizasyon işlemleri esnasında tüm işlemler buz içerisinde yapıldı. Pelletler eşit hacimde ilave edilen homojenizasyon solüsyonunda [25 mM Tris-HCl (pH= 7,4), 0,1mM PMSF, %2'lik TritonX -100 ve %1'lik SDS] yeniden süspansiyon edildi. +4°C'de 2 saat inkübe edildikten sonra homojenatlar soğutmalı santrifüjde +4°C'de 60 dakika süreyle 60,000 x g'de santrifüj edildi. Elde edilen 2. süpernatantlar mikrosantrifüj tüplere alınarak SDS-PAGE ve Western blot analizleri için -86°C'de saklandı.

3.4.6. Western Blot Tekniği ile Hedef Proteinlerin Analizi

SDS-PAGE (Sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi) tekniği ile hücre kültürüne ait protein örnekleri uygun konsantrasyonundaki jelde yürütüldü ve bunun devamında bal ekstrelerinin apoptotik etkilerinin moleküler mekanizmalarını daha ayrıntılı olarak incelemek için PC-3 hücrelerinde sitokrom c ve prokaspaz-3 proteinlerinin ekspresyonuna odaklanıldı. SDS PAGE'deki analiz edilen örneklerdeki bantlar komputerize software program (Lab Works 4.0; UVP, Inc. Cambridge, UK) ile incelendi ve yoğunlukları hesaplandı.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. Ekstraksiyon Verimi İle İlgili Bulgular

Ekstraksiyon işlemi sonucunda farklı ilçelere ait bal örneklerinden elde edilen ekstrakt miktarları Tablo 4.1’de verilmiştir.

Tablo 4.1. Bal örneklerinden elde edilen ekstre miktarları

Bal Örneği	Bal Miktarı(gr)	Ekstre Miktarı(mg)
Kiğı Balı	100	67.2
Sancak Balı	100	64
Servi Balı	100	71
Solhan Balı	100	85.1
Yayladere Balı	100	56.2

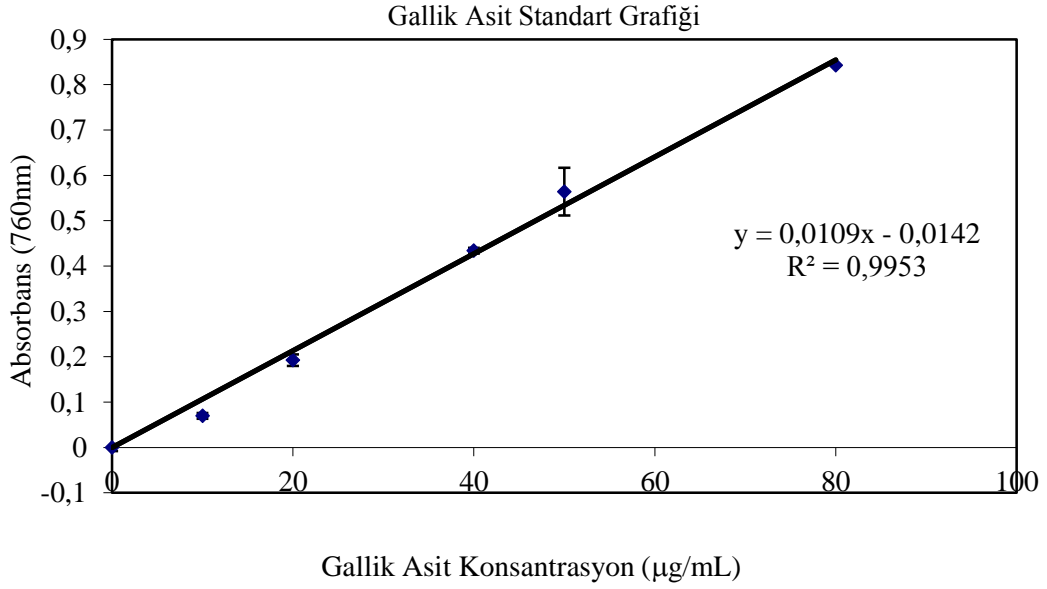
4.2. Antioksidan Araştırma Bulguları

4.2.1. Toplam Fenolik Madde Miktarı İle İlgili Bulgular

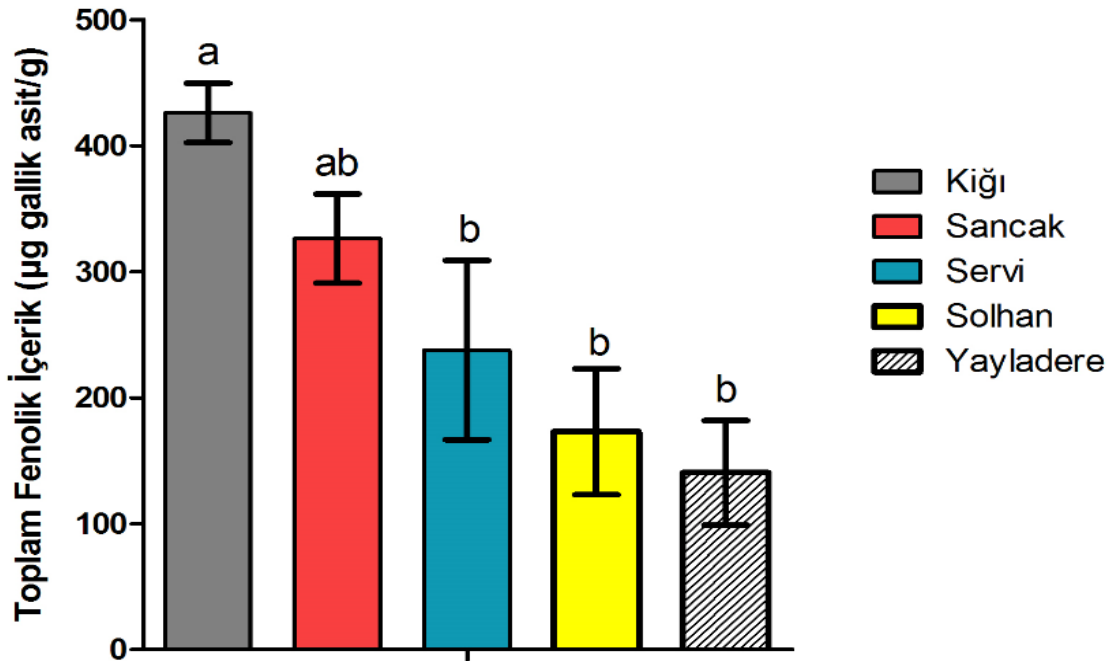
Bu yöntem, balda bulunan fenolik bileşiklerin Folin-Ciocalteu fenol reaktifini oksitleme prensibine dayanmaktadır. Ortamda fenolik maddenin bulunması durumunda FCR ilavesiyle 760 nm’de maksimum absorbans veren ürünler oluşmaktadır. Meydana gelen mavi renk ve absorbanstaki artış toplam fenolik bileşiklerin miktarı ile orantılıdır. Folin-Ciocalteu reaktifi kullanılarak yapılan toplam fenolik bileşik tayininde en sık kullanılan standart bileşik gallik asittir. Bunun için öncelikle gallik asitten standart grafik hazırlandı. Toplam fenol içeriği, standart eğri grafiği kullanılarak hesaplandı ve sonuçlar gallik asit (mg/g ekstre) eşdeğeri olarak ifade edildi. Standart grafikten elde edilen formülden de bal ekstralarında bulunan toplam fenolik bileşik miktarları galik asit ekivalent (GAE) olarak

hesaplandı (r^2 : 0,9953). Bu amaçla gallik asit kullanılarak elde edilen standart çalışma grafiği Şekil 4.1’de görülmektedir. Standart grafiğinden elde edilen doğru denklemi:

$$\text{Absorbans} = 0,0006 \times [\text{Gallik asit}] + 0,6872 \quad R^2 = 0,8423$$



Şekil 4.1. Gallik asit standart çalışma grafiği



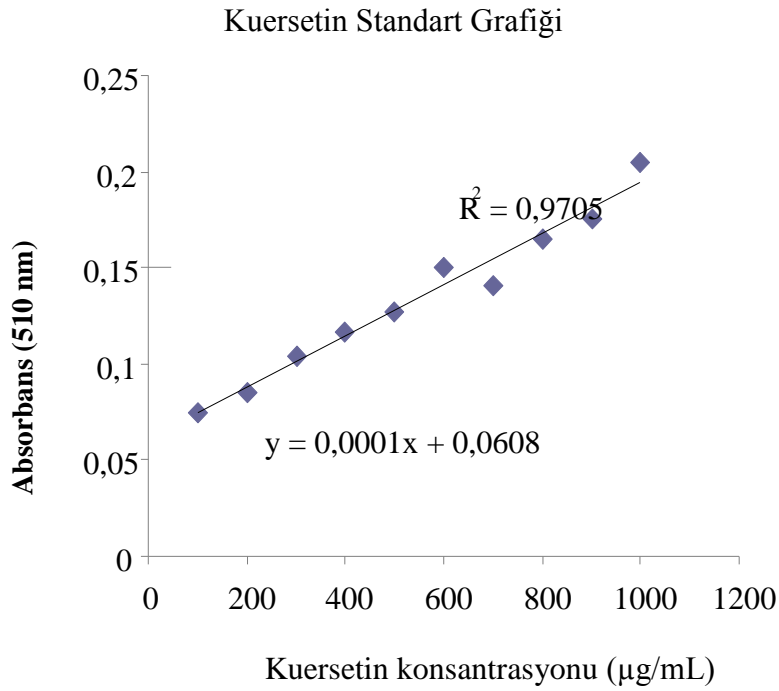
Şekil 4.2. Toplam Fenolik İçeriği (μg gallik asit/g)

Bal metanol ekstralarının 1 g'da bulunan toplam fenolik içerikleri Şekil 4.2'de görüldüğü gibi en fazla Kiğı (426,01 ± 23,50 µg gallik asit/g) ilçesine ait bal ekstraktında bulunmuştur ve birbirlerine fenolik içerik açısından benzerlik gösteren Servi (237,70 ± 71,27 µg gallik asit/g), Solhan (172,90 ± 50,02 µg gallik asit/g) ve Yayladere (140,34 ± 41,40 µg gallik asit/g) bal ekstraktlarından fenolik içerik açısından fazladır ancak sancak (326,17 ± 35,45 µg gallik asit/g) ilçesi ait bal ekstraktı ile istatistiksel olarak benzerlik gösterir.

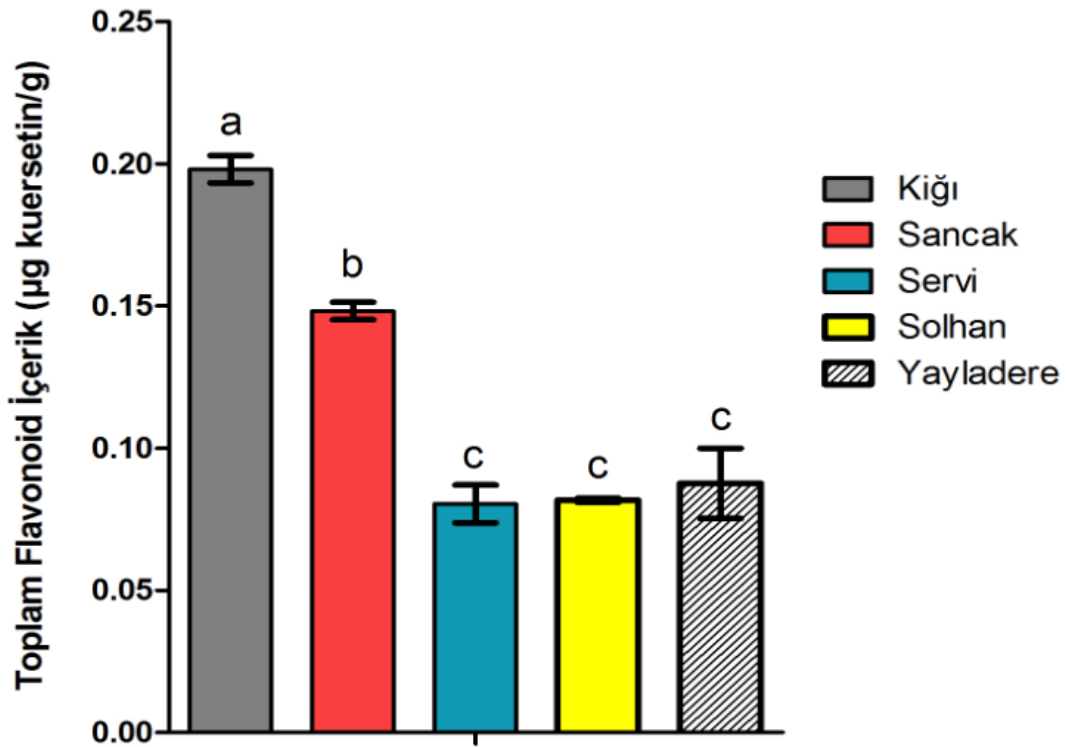
4.2.2. Toplam Flavonoid İçeriğinin Belirlenmesi İle İlgili Bulgular

Bal örneklerinden elde edilen metanol ekstralarında bulunan toplam flavonoid miktarı için öncelikle Kuersetin kullanılarak bir standart grafik hazırlandı. Standart grafikten elde edilen formül yardımıyla ekstralarda bulunan total flavonoid miktarı Kuersetin eşleniği (QE) olarak hesaplandı (r^2 : 0,9705). Bu amaçla hazırlanan standart Kuersetinin standart grafiği Şekil 4.3'de verilmiştir.

$$\text{Absorbans} = 0,0001 \times [\text{Kuersetin}] + 0,0608 \quad R^2 = 0,9705$$



Şekil 4.3. Toplam flavonoid miktarı tayini için hazırlanan kuersetinin standart grafiği



Şekil 4.4. Toplam flavonoid içeriği (µg kuersetin/g)

Bingöl ili için denemiş olduğumuz bal ekstraktlarının metanol ekstratlarının 1 g'da bulunan toplam flavonoid içerikleri Şekil 4.4'de görüldüğü gibi en fazla Kiğı ($0,1981 \pm 0,0084$ µg kuersetin/g) ilçesine ait bal ekstraktıdır ve birbirlerine flavonoid içerik açısından benzerlik gösteren Servi ($0,0805 \pm 0,0115$ µg kuersetin/g), Solhan ($0,0817 \pm 0,0013$ µg kuersetin/g) ve Yayladere ($0,0876 \pm 0,0214$ µg kuersetin/g) bal ekstraktlarından flavonoid içerik açısından fazladır ancak Sancak ($0,1482 \pm 0,0052$ µg kuersetin/g) ilçesi ait bal ekstraktı ile istatistiksel olarak benzerlik gösterir.

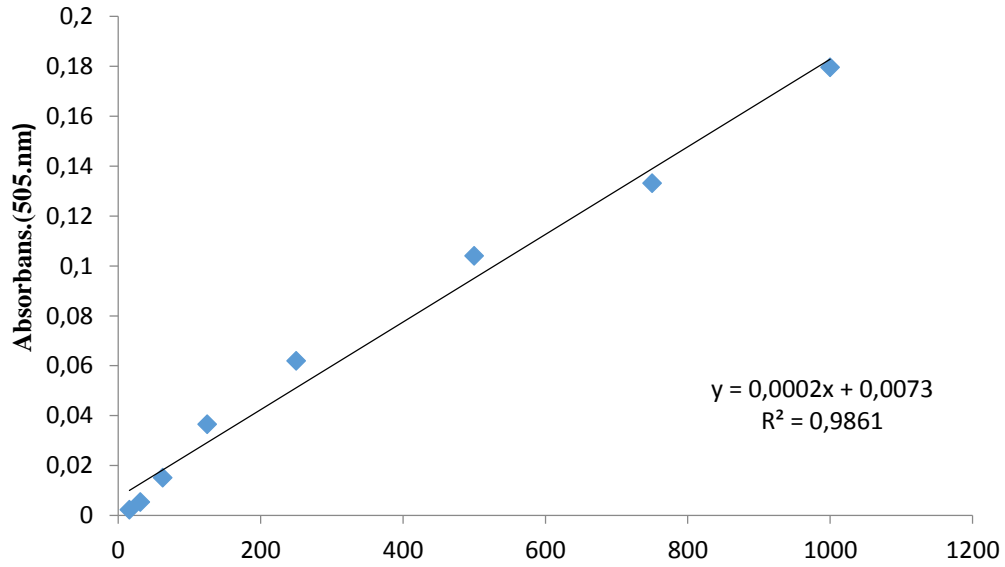
4.2.3. Toplam Fenolik Asit İçeriği (TPA) Belirlenmesi İle İlgili Bulgular

Fenolik asitlerde flavonoid ve diğer fenolik maddeler gibi bitkilerde genel olarak yüksek konsantrasyonda bulunan doğal antioksidan maddelerdir. Fenolik asitler, renk, koku ve tat gibi duyuşal özelliklerden sorumludurlar. Bu tip bileşiklerin gıdalarda var olması besinlerin depolama özelliğini, renginin var olması ve korunmasını, kokusunu devamını ve böylelikle besin değeri ile kalitesini belirgin olarak korumaktadır (Robbins 2003).

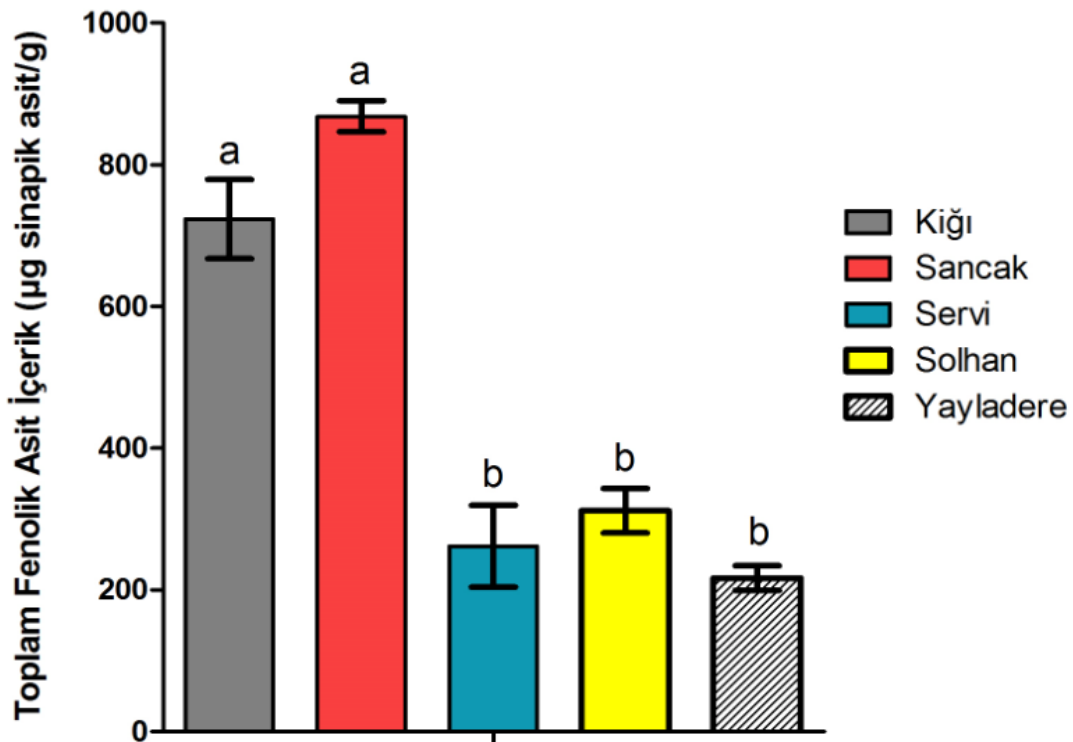
Bu yüzden fenolik asitler gıdalarda depolama kararlılığı ve raf ömrünün uzatılması amacıyla katkı maddesi olarak ticari ürünlerde kullanılmaktadır. Ayrıca fenolik özelliğin ortaya çıkarttığı koruyucu özellikten dolayı da koruyucu ve tedavi edici olarak kullanılmaktadır (Bektaş 2005).

Bal örneklerinden elde edilen metanol ekstralarında bulunan fenolik asit miktarı için öncelikle sinapik asit kullanılarak bir standart grafiği hazırlandı. Standart grafikten elde edilen formül yardımıyla ekstralarda bulunan fenolik asit miktarı sinapik asit eşleniği olarak hesaplandı (r^2 : 0,9861). Bu amaçla hazırlanan standart sinapik asit standart grafiği Şekil 4.5'te verilmiştir. Sinapik asit standart grafiğinden elde edilen doğru denklemi:

$$\text{Absorbans} = 0,0002 \times [\text{Sinapik asit}] + 0,0073 \quad R^2 = 0,9861$$



Şekil 4.5. Toplam fenolik asit miktarı tayini için hazırlanan sinapik asit standart grafiği



Şekil 4.6. Toplam fenolik asit içeriği (µg sinapik asit/g)

Bingöl ili için denemiş olduğumuz bal ekstraktlarının metanol ekstrelerinin 1 g'da bulunan toplam fenolik asit içerikleri Şekil 4.6'da görüldüğü gibi en fazla Sancak (868,17 ± 38,00 µg sinapik asit/g) ilçesine ait bal ekstraktıdır ve birbirlerine fenolik asit içerik açısından benzerlik gösteren Servi (262,02 ± 10,00 µg sinapik asit/g), Solhan (817,24 ± 0,0013 µg sinapik asit/g) ve Yayladere (312,66 ± 54,00 µg sinapik asit/g) bal ekstraktlarından fenolik asit içerik açısından fazladır ancak Kiğı (723,33 ± 77,00 µg sinapik asit/g) ilçesine ait bal ekstraktı ile istatistiksel olarak benzerlik gösterir.

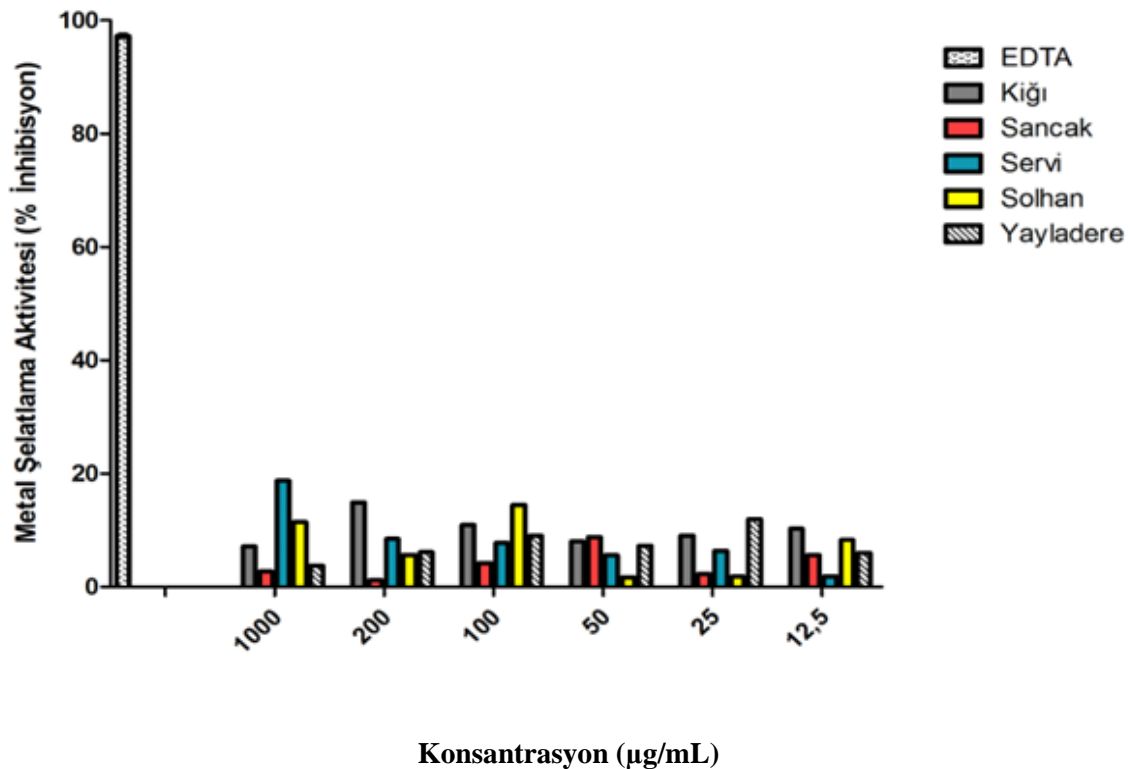
4.2.4. Metal Şelatlama Aktivitesinin Ölçülmesi İle İlgili Bulgular

Özellikle fenolik bileşiklerin metal tutma kapasitesi yapılarında mevcut olan fonksiyonel gruplar ve bunların iyonlaşma kabiliyetlerinden dolayı yüksektir. Metal şelatlama aktivitesi çalışması fenolik bileşiklerin indirgeme gücüne bakılmıştır. Bir indirgeyici ajan varlığındaki ki biz burada fenolik bileşiklerin metal tutma kabiliyetleri üzerinden değerlendirmede bulunduk. Burada Fe+3 ferrosiyanid kompleksinin antioksidan

varlığında Fe²⁺ ferrik formuna dönüşü 700 nm absorbansta mavi rengin oluşumuna dayanarak belirlendi. Burada metal şelatlama aktivitesi Şekil 4.7’de yüzde inhibisyon şeklinde 12,5 (µg/mL)’den 1000 (µg/mL) artan konsantrasyonlarda denenmiştir Bingöl ve metanol ekstralarının 1 g’da bulunan Metal Şelatlama Aktivitesi şekilde görüldüğü gibi (1000 µg/mL)’lik konsantrede en fazla Servi (18,76 ± 0,960 µg/mL EDTA) ilçesine ait bal ekstratıdır ve birbirlerine Metal Şelatlama Aktivitesi açısından benzerlik gösteren Solhan (11,44 ± 0,660 µg/mL EDTA) Kiğı (7,17 ± 0,852 µg/mL EDTA), Yayladere (3,74 ± 0,562 µg/mL EDTA) ve Sancak (2,74 ± 0,985 µg/mL EDTA) sıralamasıyla en yüksek Solhan balı fenolik ekstraktın da demiri şelatlama aktivitesi aşağıdaki formül kullanılarak hesaplanarak (Yu et al. 2004) belirlenmiştir.

$$\text{Şelatlama Oranı} = (A_0 - A_1) / A_0 \times \% 100;$$

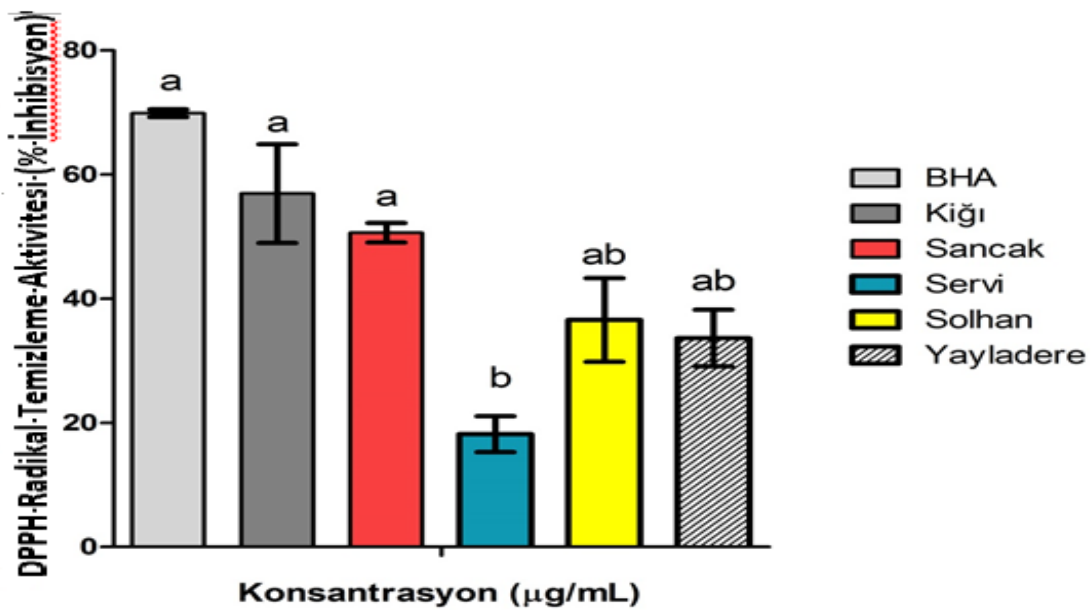
Burada A_0 kontrol ya da körün absorbanı, A_1 ise ekstraktın varlığında ölçülen absorbanı değeridir.



Şekil 4.7. Metal Şelatlama Aktivitesi (% Giderme)

4.2.5. DPPH Radikal Aktivitesinin Belirlenmesi

Bal ekstraktlarının radikal giderme aktivitesi metanolik solüsyon içindeki stabil DPPH 517 nm’de koyu pembe olan renginin açılması ile aktivitenin belirlenmesi esasına dayanmaktadır. DPPH serbest radikali beklenmeyen metal şelatlama gibi ve enzim inhibisyonu gibi yan reaksiyonlara sebebiyet vermez (Amarowicz et al. 2004). Antioksidant bileşikler DPPH’a tutunurlar ve böylece aktiviteye bağlı olarak DPPH’ın rengi renksizleşir. Böylece DPPH radikali bir hidrazin analoguna dönüşür.



Şekil 4.8. DPPH giderme aktivitesi (% Giderme)

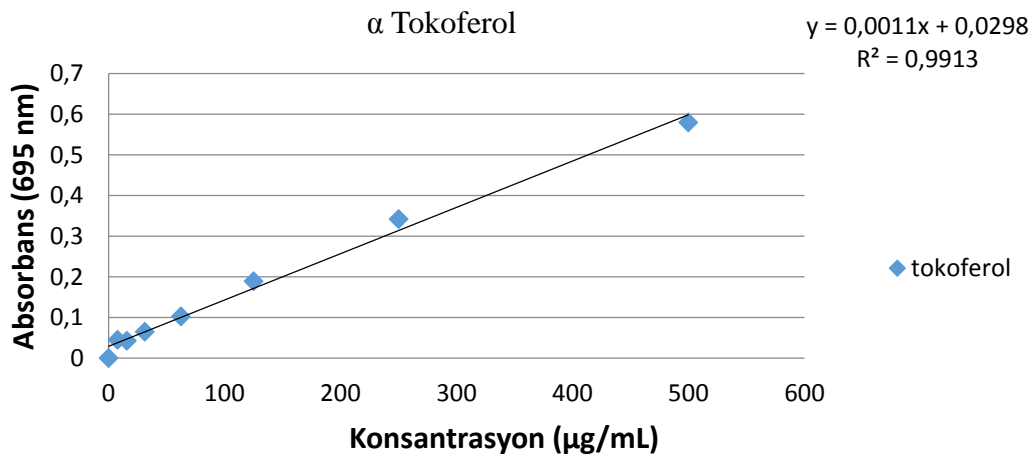
Şekil 4.8’de 1000 µg/mL konsantrasyondaki bal ekstraktlarının DPPH radikali giderme aktivitesi verilmiştir. En yüksek giderme aktivitesi Kığı bölgesinin bal ekstraktında %56,94493038, Sancak %50,62626828, Servi %18,16178014, Yayladere %33,64355189 ve sentetik antioksidan olan BHA’da %69,89492919 belirlenmiştir.

4.2.6. Toplam Antioksidan Kapasitenin Belirlenmesi İle İlgili Bulgular

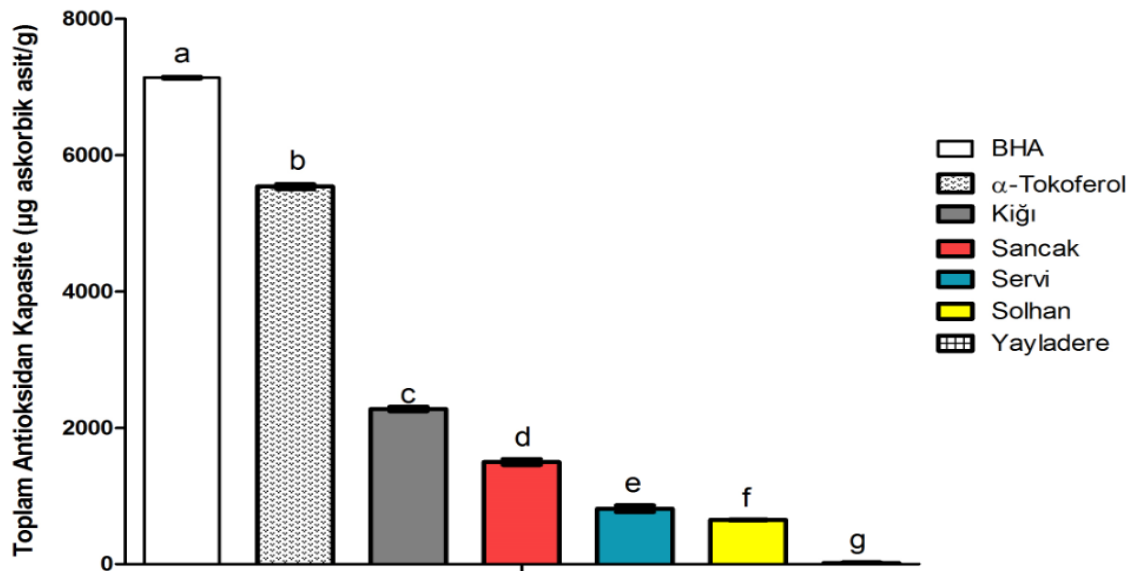
Toplam antioksidan kapasitenin belirlenmesi yöntemin temeli asidik Mo (VI)’nın Mo (V)’e bal ekstraktlarının aktif bileşikleri olan antioksidan grup tarafından indirgenmesi sonucu asidik pH’ ta yeşil renkli fosfat ile Mo (V) kompleksinin oluşmasına dayanmaktadır. Çalışmada kullandığımız metanol ile hazırlanmış bal örneklerinin

ekstraktları antioksidan kapasitesi spektrofotometrik fosfomolibden yöntemine göre belirlendi. Sonuçlar mg α -TE/g ekstre şeklinde verildi.

$$\text{Absorbans} = 0,0012 \times [\text{Sinapik asit}] + 0,0073 \quad R^2 = 0,9861$$



Şekil 4.9. Toplam antioksidan kapasitenin tayini için hazırlanan AlfaB-tokoferol standart grafiği



Şekil 4.10. Toplam Antioksidan Kapasite (µg askorbik asit/g)

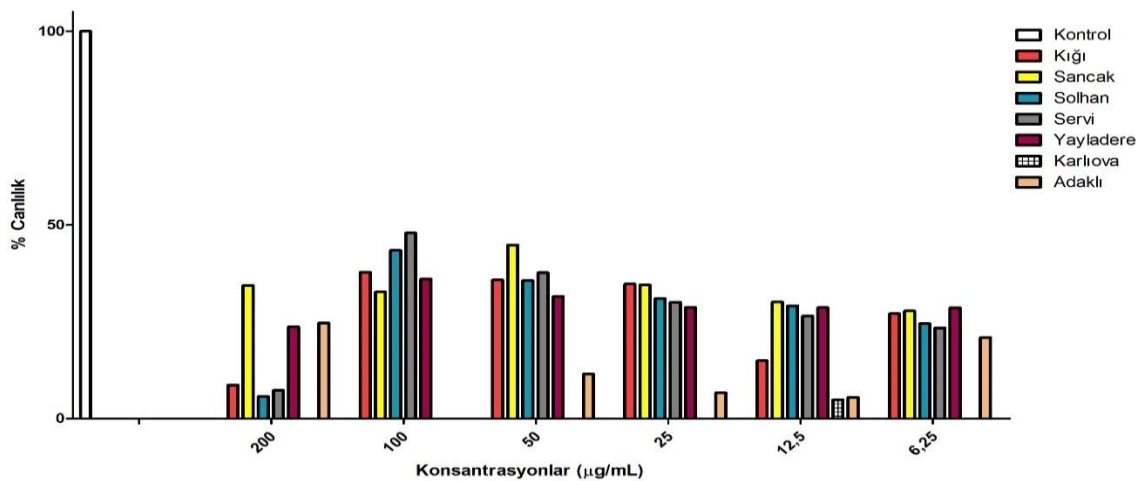
Bal ekstraktlarının metanolik fenolik ekstrelerinin 1 g'da bulunan toplam antioksidan kapasite Şekil 4.10'da görüldüğü gibi BHA ve α -Tokoferol ile kıyas edilmesi açısından değerlendirilmiştir. Buna göre en yüksek kapasite Kiğı ($2275,40 \pm 61,03$ µg askorbik asit/g) ilçesine ait bal ekstraktı olarak belirlenmiştir. Birbirlerine flavonoid içerik

açısından benzerlik gösteren Sancak ($1498,25 \pm 75,05 \mu\text{g}$ askorbik asit/g), Servi ($811,90 \pm 84,40 \mu\text{g}$ askorbik asit/g) ve Solhan ($646,98 \pm 7,70 \mu\text{g}$ askorbik asit/g) ve Yayladere ($16,34 \pm 1,567 \mu\text{g}$ askorbik asit/g) olarak belirlenmiştir.

4.3 Antikanser Çalışma Sonuçları

4.3.1. Hücre Canlılık Testi

Hücre canlılığı MTT metabolik aktivite deneyi kullanılarak belirlendi. Çalışma prensibi temel olarak bölünmeye ve çoğalmaya uğrayan hücrelerin artan dehidrojenaz enzim aktivitesi ile MTT'nin sarı rengi formazan (mor) rengine dönmesi sonucu görülen renk değişiminin absorbans olarak spektrofotometre ile ölçülmesi esasına dayanır. Ne kadar canlı hücre varsa absorbans değeride o ölçüde yüksek çıkar. Prostat kanseri (PC-3) hücreleri 96'lık plakalarda çoğaltıldı ve farklı konsantrasyonlarda bal ekstraktları (6,25-200 $\mu\text{g}/\text{mL}$) ile 48 saat inkübe edildi. Büyüme ortamındaki PC-3 hücre hattı sadece besiyeri eklenerek kontrol gurubu olarak kullanıldı ve bekleme süresinden sonra ortam temizlenerek MTT (1 mg/mL) ilave edildi ve inkübe için 37 °C'de 4 saat bekletildi. 440 nm ve 550 nm'lik absorbans değerlerinde Şekil 4.11'de görüldüğü gibi farklı konsantrasyonlarda her bir bal ekstraktının göstermiş olduğu sitotoksite etkisinin farklı PC-3 hücre hattında en çok hücre canlılığını engeleyen konsantrasyon 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ olduğu ancak genel itibariyle bal ekstraktların bütün konsantrasyonlarda sitotoksite etki gösterdiği tespit edilmiştir.

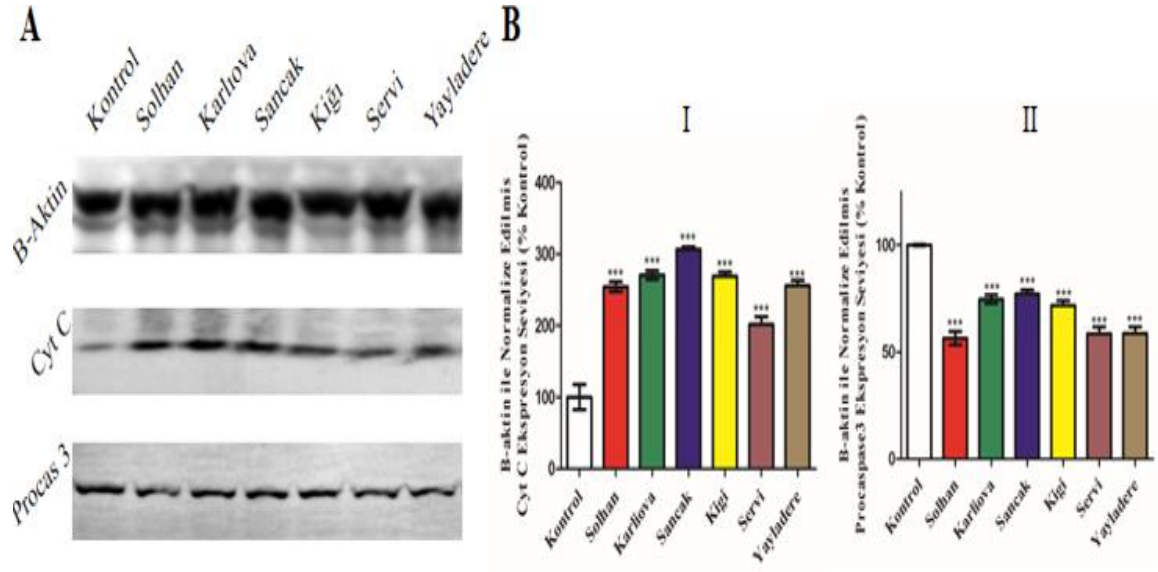


Şekil 4.11. Hücre canlılık grafiği

4.3.2. Western Blotting Analizi

Daha sonra total protein örneklerinden %12'lik SDS-PAGE jel (Clear page precast gel, C.B.S. Scientific, CA) içine eşit miktarlarda protein yüklenerek elektroforez işlemi gerçekleştirildi. Arkasından jelde ayrımı yapılan proteinler 0,2 µm por çaplı nitrosellülöz membranlara Trans-Blot Turbo Transfer System (Bio-Rad, USA) yardımıyla aktarıldı. Nitrosellülöz membranlar TBS-T (TBS - %0,05 Tween-20) içinde 5 dakika süreyle 2 kez yıkandı ve %5'lik sığır serum albümini içerisinde primer antikor uygulamasından önce 60 dk süreyle çalkalandı. Primer antikorlar TBS-T içerisinde sitokrom c (1:1000 dilüsyon, sc- 13156, mouse monoclonal, Santa Cruz Biotechnology); prokaspaz-3 (1:500 dilüsyon, sc- 271759, mouse monoclonal, Santa Cruz Biotechnology); β-Aktin (1:500 dilution, sc- 47778, mouse monoclonal, Santa Cruz Biotechnology) olacak şekilde uygulandı. Nitrosellülöz membranlar 180 dk boyunca 37°C'de primer antikorları ile inkübe edildi. Blotların yıkama işlemi TBS-T içerisinde 5 dk süreyle 3 er kez olacak şekilde gerçekleştirildi. Daha sonra sekonder antikor (horseradish peroksidaz-conjugated goat anti mouse IgG, sc- 2005, Santa Cruz Biotechnology) ile inkübe edildi. Spesifik bağlanma tespit edilmesinde ECL (Advansta, CA) tamponu kullanılarak protein konsantrasyonları medikal filmlere tab edildi. Protein düzeyleri bir görüntü analiz sistemi (GelDoc EZ ve Image Lab. 5.2.1 software; Bio-Rad, USA) ile dansitometrik olarak analiz edildi. Tüm sonuçlar üç tekrarlı olacak şekilde gerçekleştirildi. İstatistiksel analizler GraphPad Prism 5,01 yazılımında One-way ANOVA, Newman-Keuls Post-Hoc Test; testleri uygulanarak p<0,05 değeri önemli kabul edilerek gerçekleştirildi.

Yedi farklı bal ekstresininde sitokrom c protein seviyesini önemli ölçüde arttırdığı gözlemlendi. Dahası, balın tüm bu ekstralarının prokaspaz-3 protein düzeylerini önemli ölçüde azalttığı gözlemlendi ki bu PC-3 hücrelerinde tüm bal ekstralarının aktif kaspaz-3 protein düzeylerini önemli ölçüde arttırdığı anlamına gelmektedir.ve sonrasında bu bantlar, komputere software program (Lab Works 4.0; UVP, Inc. Cambridge, UK) ile incelendi ve yoğunlukları hesaplandı.



Şekil. 4. 12. Bal ekstralarının PC-3 hücrelerindeki apoptoz ilişkili protein ekspresyonu üzerine etkileri. (A) Sitokrom c (15 kDa) ve prokaspaz-3 (34 kDa) protein düzeyleri Western blotting analizi ile ölçüldü. Yükleme kontrolü olarak β -Actin kullanıldı. (B) Veriler ortalama \pm SEM ile gösterildi. *** $p < 0,01$ Kontrol vs Ekstreler

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Daha önce birçok akademik çalışmada ham olarak balın antioksidan aktivitesi gösterilmiştir (Frankel et al. 1998; Aljadiand et al. 2004; Al-mamary et al. 2002). Fakat balın özellikle fenolik ekstraktı ve onun biyolojik aktivitesi ile ilgili olarak yapılan çalışma Estevinho ve arkadaşlarının (2008) Portekiz balları ve Kaya ve arkadaşlarının (2016) Bingöl ili ballarının fenolik ekstraktlarının etkisini araştırarak yapmış oldukları çalışma bulunmaktadır. Bu çalışmada antioksidan aktivite, DPPH giderme aktivitesi, metal şelatlama aktivitesi ve toplam antioksidan kapasitesine bakılmıştır. Anti kanser çalışmasında ise WST-1 hücre canlılık ile Western blot analizi ile protein analizi yapılmıştır buna göre antikanser aktivitesi belirlenmiştir.

Metal şelatlama aktivitesi açısından değerlendirilme yapıldığında 1 mg/mL bal ekstraktlarının metal şelatlama aktivitesi yayladere, sancak, kığı ekstraktlarında sırasıyla 0,7779, 0,7802, 0,7471 olarak belirlenmiş Estevinho L. ve arkadaşlarının (2008) yapmış oldukları çalışmada koyu ballarda 0,79 olarak 50 mg/mL buldukları değerle karşılaştırıldığında yaklaşık olarak 50 kat fazla bir aktivite göstermiş olduğu bulunmuştur.

Fenolik bileşik ekstraktının DPPH giderme aktivitesi kığı, sancak, servi, solhan, yayladere ekstraktlarının 1000 µg/mL konsantrasyonlarına bakıldığında IC₅₀ değerleri olarak bulunmuştur. Bu değerleri Estevinho ve arkadaşlarının (2008) karşılaştırdığımızda koyu ve açık ballar için buldukları IC₅₀ değer konsantrasyonları sırasıyla 0,73 mg/mL, 0,9 mg/mL, 1,697 mg/mL, 1,2 mg/mL, 1,408 mg/mL ve sentetik antioksidan olan BHA için 1,242 mg/mL şeklinde bulunmuştur. Bu değerler açısından değerlendirme yapıldığında Portekiz ballarındakinden koyu renkli ballarda bu değer IC₅₀ 29,6 mg/mL açık renkli ballarda ise 115,6 mg/mL daha yüksek bir radikal giderme aktivitesi ortaya çıkmıştır. Fenolik ekstrakt miktarına bakıldığında kığı, sancak, servi, solhan, yayladere için sırasıyla 0,426012, 0,326168, 0,237694, 0,172897, 0,140321 mg/mL bulunmuştur.

Bu sonuçlar literatürde açısından değerlendirildiğinde yapılan antioksidan çalışmalarda elde edilen sonuçlara göre en fazla fenolik madde içeren Kığı yapılan tüm antioksidan çalışmalarda en aktif bal ekstraktı olarak belirlenmiştir. Sonuçlara bakıldığında kiğı bal ekstrelerinde fenolik asit açısından sancak bal ekstresinden az miktarda fenolik asit içermesine rağmen fenolik madde miktarının çok olması diğer fenolik bileşik gruplarının fazlalığını ortaya koymaktadır. Böylece diğer fenolik grup olan flavonoid bileşiklerinin daha fazla miktarda olduğunu düşündürmüştür yapılan toplam flavonoid miktarı belirleme çalışmaları da bu sonucu desteklemektedir. Bulduğumuz bu sonuçlar kalitatif açıdan literatürde Estevinho ve arkadaşlarının (2008) Portekiz balları ve Kaya ve arkadaşlarının (2016) Bingöl ili ballarının fenolik ekstraktlarının sonuçlarıyla benzerlik göstermektedir.

Bu çalışmada bal örneklerinden elde edilen fenolik ekstraktların PC-3 kanser hücre hattı üzerinde antikanser özelliği hücre kültüründe inhibisyonun artırılmasına dayalı olarak MTT hücre sitotoksosite ölçümü ile ve Western Blot tekniği ile protein ifadelerinin artması ve azalmasına bağlı olarak antikanser aktivitesi belirlenirken, çeşitli invitro antioksidan yöntemler ile antioksidan kapasitesine değerlendirdi.

Buna göre; çalışmamızda PC-3 hücrelerinde balın metanolik ekstrelerinin apoptozu indüklediği mekanizmalardan biri incelendi. Önemli apoptotik yollardan biri, sitoplazmadaki sitokrom c seviyeleri ile karakterize edilen mitokondrial yoldur. Artan sitokrom c seviyesi, kaspaz-9 aktivasyonu ile sonuçlanan apoptozom oluşumunu teşvik eder. Kaspaz-9 daha sonra apoptozun morfolojik ve biyokimyasal özelliklerini indükleyen hücresel substratları parçalayarak apoptozu arttıran prokaspaz-3'ü azaltırken aktif kaspaz-3'ün miktarını artırır ve bu şekilde apoptozu indüklediği gözlemlenir (Kroemer et al. 1998; Chipuk et al. 2004; Izuta et al. 2008; Jin et al. 2014; Darendelioglu vd. 2016).

Çalışmamızda da yedi farklı bölgeden toplanan bal ekstrelerinin sitokrom c protein seviyesini önemli ölçüde arttırdığı ve prokaspaz-3 protein düzeylerini önemli ölçüde azalttığı gözlemlendi ki bu PC-3 hücrelerinde aktif kaspaz-3 protein düzeylerini önemli ölçüde arttırdığı anlamına gelmektedir.

Sonuç olarak,

- ❖ Bu çalışmada kullandığımız bal metanolik ekstralarının literatürde aynı manada yapılan çalışmalara benzerlik gösterdiği ve literatür sonuçlarına göre bakıldığında daha aktif olduğu belirlenmiştir. Artan konsantrasyon artan aktiviteyi ortaya koymaktadır.
- ❖ Antikanser canlılık testinde çalışma yaptığımız örnek bal ekstralarının tamamının kanser hücresi üzerinde sitotoksik etki gösterdiği tarafımızca görülmüştür.
- ❖ Ülkemizin zengin bitki örtüsü, farklı iklim ve coğrafik özellikleri ve nektarı bol bitkilerce zengin bir floraya sahip olması nedeniyle arıcılığa son derece elverişli ekolojiye sahip olduğu bilinmektedir. Bal üretimi, arazi kullanımının az olması, maliyetinin düşük olması, verimin kısa bir sürede alınması, daha az iş gücüne ihtiyaç duyulmasından dolayı maddi olarak getirisi fazla olan bir tarımsal faaliyet haline gelmiştir.
- ❖ Balın antimikrobiyal ve antioksidan yapısı ile ilgili yeterli miktarda çalışmaların yapılmasına ve balın çeşitli gıdalarla birlikte kullanılarak antimikrobiyal ve antioksidan ve antikanser özelliklerinin araştırılmasına ihtiyaç duyulmaktadır.
- ❖ Bal antioksidan etkisinden dolayı gıda alanında sanayi alanında ve ilaç sektöründe geniş kullanım alanı bulabilir. Bu sebeple gıdalara koruyucu amaçla katılması özellikle son zamanlarda gıda katkı maddelerinin zararlı etkilerinden dolayı doğal gıda tüketme isteği de göz önüne alınacak olursa balın bu özelliklerinin araştırılması bilime katkı sağlayacaktır.

Bingöl ilinin bitki örtüsüne ve doğal kaynaklarına bakıldığında arıcılık için son derece uygun olduğu görülmektedir. Bu bakımdan Bingöl ilinde tarımsal bir faaliyet olan arıcılık ile uğraş geliştirilerek ve artırılarak bal üretimi arttırılmalı, gıda alanında tıp alanında, eczacılık ve kozmetik gibi endüstrinin diğer uygun alanlarına kullanılması için alternatif ürünlerin piyasaya sunulması ve çalışmalar yapılması ve yapılan bu çalışmaların marka oluşturularak tüm dünya için bir marka değerine sahip olunması sağlanmalıdır.

Bu türlü araştırmaların Bingöl ilinde daha da genişletilerek çalışılması ülkenin doğal zenginliklerinin değerlendirilmesi ve ekonomiye katkı açısından önem arz etmektedir.

KAYNAKLAR

Aljadi AM, Kamaruddin MY (2004) Evaluation of the phenolic contents and antioxidant capacities of two Malaysian floral honeys. *Food Chemistry* 85: 513–518

Al-Mamary M, Al-Meerri A, Al-Habori M (2002) Antioxidant activities and total phenolics of different types of honey. *Nutrition Research* 22: 2041–2047

Aytuğ B, Aykut S, Merev N, Edis G (1971) İstanbul Çevresi Bitkilerinin Polen Atlası İstanbul Üniversitesi Yayınları Yayın No:114

Barbaros O, Günnur D (2012) Turkish Journal of Immunology - Open Access (Measurement Methods of Cell Proliferation and a Comparison of Various Commercial Proliferation Kits *Turk J Immunol* 1(3): 74-89

Barros L, Calhelha RC, Vaz JA, Ferreira ICFR, Baptista P, & Estevinho LM (2007) Antimicrobial activity and bioactive compounds of Portuguese wild edible mushrooms. *European Food Research and Technology* 225: 151–156

Beretta G, Orioli M, Facino RM (2007) Antioxidant and radical scavenging activity of honey in endothelial cell cultures (EA.hy926). *Planta Medica* 73: 1182– 1189

Berghe VA, Vlietinck AJ (1991) Screening methods for antibacterial and antiviral agents from higher plants. *Methods Plant Biochemistry* 6: 47–68

Beytur A, Tekin S, Taha K, Zuhail E, Süleyman S (2011) Yeni Sentezlenen Bir Tiyosemikarbazon Türevinin Prostat Kanseri Hücre Kültürleri Üzerine Antikanserojenik Özelliklerinin Belirlenmesi: In Vitro Bir Çalışma Fırat Üniversitesi Sağlık Bilimleri Tıp Dergisi, 2011; F.Ü.Sağlık Bilimleri Tıp Dergisi 25(1): 25 – 32

Blasa M, Candiracci M, Accorisi A, Piacentini MP, Albertini MC. and Piatti E (2005) Raw Millefiori honey is packed full of antioxidants. *Food Chemistry*, paper in pres

Borbalán ÁMA, Zorro L, Guillén, DA, Barroso CG (2003) Study of polyphenol content of red and white grape varieties by liquid chromatography-mass spectrometry and its relationship to antioxidant Power, *Journal of Chromatography A*: 1012,31- 38

Bravo L (1998) Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism and nutritional significance. *Nutrition Reviews* 56: 317–333

Cam M. ve Hışıl Y (2003) Gıdalardaki flavonoidler ve önemleri, 3. Gıda Mühendisliği Kongresi, Ankara, 2-4 Ekim, s. 67-82

Chipuk JE, Kuwana T, Bouchier-Hayes L, Droin NM, Newmeyer DD, Schuler M, et al (2004) Direct activation of Bax by p53 mediates mitochondrial membrane permeabilization and apoptosis. *Science* 303: 1010-4

Crane E (1980) *A Book of Honey*, Oxford University Press, Newyork

Crane E (1990) *Bees And Beekeeping*, Heinemann Newnes, London

Darendelioglu E, Tartik M, Aykutoglu G, & Baydas G (2016) Turkish propolis protects human endothelial cells in vitro from homocysteine-induced apoptosis. *Acta Histochemica* 118: 369-76

Davidson PM, Sofos JN, Brenem AL (2005) *Antimicrobials in Foods*, third ed. Marcel Dekker Inc., New York. Pp: 291–306

Dikmen M, Öztürk N, Öztürk Y (2008) Nar meyve kabuğu ekstresinin MCF-7 hücre proliferasyonu üzerine sitotoksik ve inhibitör etkileri. *Ankara Eczacılık Fakültesi Dergisi* (3) 179: 190

Dinis, TCP, Madeira VMC, & Almeidam LM (1994) Action of phenolic derivates (acetoaminophen, salicylate, and 5-aminosalicylate) as inhibitors of membrane lipid peroxidation and peroxy radicals scavengers. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 315: 161–169

Doğaroğlu M (1999) *Modern Arıcılık Teknikleri*. Anadolu Matbaa. Tekirdağ

Effem SEE (1988) Clinical observations on the wound healing properties of honey. *British Journal of Surgery* 75: 679–681

El-Gendy MMA (2010) In vitro, Evaluation of Medicinal Activity of Egyptian Honey from Different Floral Sources as Anticancer and Antimycotic Infective Agents. *J Microbial Biochem Technol* 2: 118-123. doi:10.4172/1948-5948.1000035

Eloff JN (1998) A sensitive and quick microplate method to determine the minimal inhibitory concentration of plant extracts for bacteria. *Planta Medica* 64: 711–713

Estevinho L, Pereira AP, Moreira L, Dias LG, Pereira E (2008) Antioxidant and antimicrobial effects of phenolic compounds extracts of Northeast Portugal honey *Food and Chemical Toxicology* 46: 3774–3779

Fernandez-Cabezudo MJ, El-Kharrag R, Torab F, Bashir G, George JA, et al (2013) Intravenous administration of manuka honey inhibits tumor growth and improves host survival when used in combination with chemotherapy in a melanoma mouse model. *PLoS One* 8: e55993

Frankel EN; Finley JW (2008) How To Standardize the Multiplicity of Methods To Evaluate Natural Antioxidants. *J. Agric. Food Chemistry*, 56: 4901–4908

Gheldof N, Engeseth NJ (2002) Antioxidant capacity of honeys from various floral sources based on the determination of oxygen radical absorbance capacity and inhibition of in vitro lipoprotein oxidation in human serum samples. *J Agric Food Chemistry*, 50: 3050–3055

Gheldof N, Wang XH, Engeseth NJ (2002) Identification and quantification of antioxidant components of honeys from various floral sources. *J Agric Food Chemistry* 50: 5870–5877

Gökpınar S, Koray T, Akçiçek E, Göksan T, Durmaz Y (2006) Algal Antioksidanlar E.Ü. Su Ürünleri Dergisi 23: 85-89

Gülçin İ, Elias R, Gepdiremen A, Boyer L (2006a) Antioxidant activity of lignans from fringe tree (*Chionanthus virginicus* L.). *European Food Research and Technology* 223: 759–767

Gülçin İ (2006b) Antioxidant activity of caffeic acid (3,4-dihydroxycinnamic acid). *Toxicology* 217(2–3): 213–220

Hajji M, Jarraya R, Lassoued I, Masmoudi O, Damak M, Nasria M (2010) GC/MS and LC/MS analysis, and antioxidant and antimicrobial activities of various solvent extracts from *Mirabilis jalapa* tubers *Process Bio chemistry* 45: 1486–1493

Haroun MI, Poyrazoglu ES, Konar N, Artik N (2012) Phenolic acids and flavonoids profiles of some Turkish honeydew and floral honeys. *J Food Technology* 10: 39–45

Hatano T, Kagawa H, Yasuhara T, Okuda T (1988) 2 new flavonoids and other constituents in licorice root - their relative astringency and radical scavenging effects. *Chemical and Pharmacological Bulletin* 36: 2090–2097

Isnandia A, Almeida da S, Tania MS, Celso AC, Neide Q, Marciane M, Jailson Santos de N, Luiz Edmundo Bastos S, Edeltrudes de Oliveira L, Antonia Lucia de S, Antonio Gouveia de S (2013) Phenolic profile, antioxidant activity and palynological analysis of stingless bee honey from Amazonas, Northern Brazil *Food Chemistry* 141: 3552–3558

Izuta H, Shimazawa M, Tazawa S, Araki Y, Mishima S, & Haea H (2008). Protective effects of Chinese propolis and its component, chrysin, against neuronal cell death via inhibition of mitochondrial apoptosis pathway in SH-SY5Y cells. *Journal of Agricultural Food Chemistry* 56: 8944-53

Jin X, Song L, Liu X, Chen M, Li Z, Cheng L, et al (2014) Esculetin induces death of human colon cancer cells via the reactive oxygen species-mediated mitochondrial apoptosis pathway. *PLOS One*, 9, e. 113257

Jung UJ, Lee MK, Park YB, Jeon SM, Choi MS (2006) Antihyperglycemic and antioxidant properties of caffeic acid in db/db mice. *J Pharmacol Exp Ther* 318: 476–483

Kassim M, Achoui M, Mustafa MR, Mohd MA, Yusoff KM (2010) Ellagic acid, phenolic acids, and flavonoids in Malaysian honey extracts demonstrate in vitro anti-inflammatory activity. *Nutrition Research* 30: 650–659

Korkmaz A (2006) Bal. Samsun Valiliği Tarım İl Müdürlüğü çiftçi eğitimi ve yayım şubesi yayınları

Kroemer G, Dallaporta B, & Resche-Rigon, M (1998) Mitochondrial death/life regulator in apoptosis and necrosis. *Annual Reviews Physiology* 60: 619-42 2142

Lin CY, Tsai SJ, Huang CS, Yin MC (2011) Antiglycative effects of protocatechuic acid in the kidneys of diabetic mice. *J Agric Food Chemistry* 59: 5117–5124

Melliou E, Chinou I (2011) Chemical constituents of selected unifloral Greek bee-honeys with antimicrobial activity. *Food Chemistry* 129: 284–290

Molan P, Betts J (2000) Using honey dressing: the practical considerations, *Nursing Times*, December 7, 96(49): 36-37

Molan PC (2001). Why Honey is effective as a Medicine, Its Use in Modern Medicine. In *Honey and Healing* ed.: P. Munn and R. Jones. International Bee Research Association, Cardiff, UK 134-142

Molan PC (2006) The evidence supporting the use of honey as a wound dressing

Morse RA, Hooper T (1985) *The Illustrated Encyclopedia of Beekeeping*. Blandford Press. Poole Dorset. 432 p

Kucuk M, Kolaylı S, Karaoğlu S, Ulusoy E, Baltacı C, Candan F (2007) Biological activities and chemical composition of three honeys of different types from Anatolia *Food Chemistry* 100: 526–534

Naczki M, Shahidi F (2004), Extraction and analysis of phenolics in food, *Journal of the Chromatography* 1054: 95-111

Nizamlioglu MN, Nas S (2010) Meyve ve Sebzelerde Bulunan Fenolik Bilesikler; Yapıları ve Önemleri. *Gıda Teknolojileri Elektronik Dergisi*, No:1, 5: 20-35

Noor N, Sarfraz RA, Ali S, Shahid M (2014) Antitumour and antioxidant potential of some selected Pakistani honeys. *Food Chemistry* 143: 362–366

Oyaizu M (1986) Studies on products of browning reactions: antioxidative activities of browning reaction prepared from glucosamine. *Japanese Journal of Nutrition* 44: 307–315

Prieto PM, Pineda and Aguilar M (1999) Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: specific application to the determination of vitamin E. *Analytical Biochemistry* 269: 2, 337-341

Ribéreau-Gayon P, Glories Y, Maujean A, Dubois D (2000) *Handbook of Enology, Volume 2: The Chemistry of Wine and Stabilization and Treatments*. John Wiley and Sons Ltd., England

Rocha LD, Monteiro MC, Anderson JT (2012) Anticancer properties of hydroxycinnamic acids-A Review. *Cancer and clinical oncology* 1: 1927–4866

Saxena S, Maurya DK, Gautam S, Sharma A (2014) Effect of radiation hygienization of honey on its health protective properties *Food Bioscience* 8(2014): 14–21

Sneider W (2000); The discovery of aspirin: a reappraisal, *BMJ* 321: 23–30

Spilioti E, Jaakkola M, Tolonen T, Lipponen M, Virtanen V, Chinou I, Kassi E, Karabournioti S, Moutsatsou P (2014) Phenolic Acid Composition, Antiatherogenic and Anticancer Potential of Honeys Derived from Various Regions in Greece. *Plos One* 9(4): e94860. doi:10.1371/journal.pone.0094860

Stephens JM, Schlothauer RC, Morris BD, Yang D, Fearnley L, et al (2010) Phenolic compounds and methylglyoxal in some New Zealand manuka and kanuka honeys. *Food Chemistry* 120: 78–86

Swellam T, Miyanaga N, Onozawa M, Hattori K, Kawai K et al (2003) Antineoplastic Zealand manuka honey. *Food Chemistry* 64: 295–301

Tanaka T, Tanaka T, Tanaka M (2011) Potential Cancer Chemopreventive Activity of Protocatechuic Acid. *J Exp Clinical Medicina* 3: 27–33

Tsiapara AV, Jaakkola M, Chinou I, Graikou K, Tolonen T, Virtanen V, Moutsatsou P (2009) Bioactivity of Greek honey extracts on breast cancer (MCF-7), prostate cancer(PC-3) and endometrial cancer (Ishikawa) cells: Profile analysis of extracts, *Food Chemistry* 116: 702–708

Tomas-Barberan FA, Martos I, Ferreres F, Radovic BS, Anklam E (2001) HPLC flavonoid profiles as markers for the botanical origin of European unifloral honeys. *J Sci Food Agric* 81

URL-1. İnternet Erişim: <http://lokman-hekim.net/bitkiler/bal.asp> (06 Mayıs 2013)

URL-2. İnternet Erişim: <http://www.hthayat.com/saglikli-hayat/beslenme-diyet/pratik-ipuclar/haber/653838-en-guclu-dogal-antioksidan-bal> (06 Mayıs 2013)

URL-3. www.food.hacettepe.edu.tr/turkish/ouyeleri/.../bilesenler_2_fenolikler.pdf (06 Mayıs 2013)

Vinson JA, Hao Y, Su X, Zubik L (1998). Phenol antioxidant quantity and quality in foods: vegetables. *J Agr Food Chemistry*, 46: 3630-4

Weston RJ, Mitchell KR, Allen KL (1999) Antibacterial phenolic components of Nea activity of honey in an experimental bladder cancer implantation model: in vivo and in vitro studies. *Int J Urol* 10: 213–219

Weston RJ (2000) The contribution of catalase and other natural products to the antibacterial activity of honey: a review. *Food Chemistry* 71: 235–239

Yu W, Zhao Y, & Shu B (2004). The radical scavenging activities of radix puerariae isoflavonoids: A chemiluminescence study. *Food Chemistry*, 86: 525–529

Yücel U, Ötles S (2001). Sarabın bilesimi ve beslenmedeki önemi. *Dünya Gıda Dergisi* 6: 5, 79- 82

ÖZGEÇMİŞ

1981 yılında Elazığ'da doğdu. İlk ve ortaokulu Elazığ'da, liseyi Elazığ Hankendi Lisesi'nde tamamladı. 2001 yılında Dicle Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümünü kazandı. 2005 yılında Dicle Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümünden mezun oldu. 2006-2007 yılları arasında Şanlıurfa Milli Eğitim Müdürlüğünde ücretli öğretmenlik yaptı. 2008 yılında Polislik sınavına başvurdu ve 2009 yılında İstanbul Emniyet Müdürlüğü Yabancılar Şube Müdürlüğüne oradanda 2016 yılında Bingöl Emniyet Müdürlüğü Yabancılar Şube Müdürlüğüne atandı ve halen çalışmaktadır. Evli ve iki çocuk babasıdır.