

BURSA TEKNİK ÜNİVERSİTESİ ❖ LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

**ARI SÜTÜ VE KESTANE BALI KARIŞIMININ ANTİOKSİDAN,
ANTİMİKROBİYAL, SİTOTOKSİK, GENOTOKSİK VE ANTİGENOTOKSİK
ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Elife KILDALI

Biyomühendislik Anabilim Dalı

ARALIK 2021

BURSA TEKNİK ÜNİVERSİTESİ ❖ LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

**ARI SÜTÜ VE KESTANE BALI KARIŞIMININ ANTİOKSİDAN,
ANTİMİKROBİYAL, SİTOTOKSİK, GENOTOKSİK VE ANTİGENOTOKSİK
ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**Elife KILDALI
(20424010007)**

Biyomühendislik Anabilim Dalı

**Tez Danışmanı: Dr. Öğr. Üyesi Gökçe TANER
Eş Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Aycan CİNAR**

ARALIK 2021

BTÜ, Lisansüstü Eğitim Enstitüsü'nün 20424010007 numaralı Yüksek Lisans Öğrencisi Elife KILDALI, ilgili yönetmeliklerin belirlediği gerekli tüm şartları yerine getirdikten sonra hazırladığı “ARI SÜTÜ VE KESTANE BALI KARIŞIMININ ANTİOKSİDAN, ANTİMİKROBİYAL, SİTOTOKSİK, GENOTOKSİK VE ANTİGENOTOKSİK ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI” başlıklı tezini aşağıda imzaları olan jüri önünde başarı ile sunmuştur.

Tez Danışmanı : **Dr. Öğr. Üyesi Gökçe TANER**
Bursa Teknik Üniversitesi

Eş Danışman : **Dr. Öğr. Üyesi Aycan CİNAR**
Bursa Teknik Üniversitesi

Jüri Üyeleri : **Dr. Öğr. Üyesi Münevver Müge ÇAĞAL**
Bursa Teknik Üniversitesi

Doç. Dr. Rozelin AYDIN
Adana Alparslan Türkeş Bilim ve Teknoloji Üniversitesi

Teslim Tarihi : .../.../....
Savunma Tarihi : 13/12/2021

İNTİHAL BEYANI

Bu tezde görsel, işitsel ve yazılı biçimde sunulan tüm bilgi ve sonuçların akademik ve etik kurallara uyularak tarafımdan elde edildiğini, tez içinde yer alan ancak bu çalışmaya özgü olmayan tüm sonuç ve bilgileri tezde kaynak göstererek belgelediğimi, aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal sonucu kabul ettiğimi beyan ederim.

Öğrencinin Adı Soyadı: Elife KILDALI

İmzası :

X X X X X



Aileme,

ÖNSÖZ

Yüksek lisans dönemim boyunca benimle tüm bilgi ve deneyimlerini paylaşan, her zaman ilgili, sabırlı ve anlayışlı olan başta sevgili danışmanım Dr. Öğr. Üyesi Gökçe TANER'e ve eş danışmanın Dr. Öğr. Üyesi Aycan CİNAR'a,

Tez çalışmalarım sırasında bana yardımcı olan yüksek lisans öğrencisi Beyza ARDA'ya, desteklerinden dolayı doktora öğrencisi Merve KOYUN ve Çiğdem İnci AYDEMİR'e,

Lisans eğitimimden itibaren gerek akademik çalışmalarında gerekse manevi anlamda ihtiyacım olduğu her an yanımda olan Dr. Öğr. Üyesi Zeynep İYİĞÜNDOĞDU ve Doç. Dr. Rozelin AYDIN'a,

Hayatımın her alanında arkamda olan, benden sevgi ve desteklerini esirgemeyen annem Hatice KILDALI ve babam M. Ali KILDALI'ya,

Hayatımızın her anını birlikte paylaştığımız, hayatıma ortak olan, karşılaştığım tüm sıkıntılarda yanımda olan, en umutsuz hissettiğim anda beni güçlendiren canım kardeşim Merve KILDALI'ya

sonsuz teşekkür ederim.

Aralık 2021

Elife KILDALI

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖNSÖZ	v
İÇİNDEKİLER	vi
KISALTMALAR	viii
ÇİZELGE LİSTESİ.....	x
ŞEKİL LİSTESİ.....	xi
ÖZET	xii
SUMMARY	xiii
1. GİRİŞ	1
1.1 Literatür Araştırması	3
1.1.1 Arı sütü.....	3
1.1.1.1 Arı sütünün kimyasal bileşimi	5
1.1.1.2 Arı sütünün biyolojik aktivitesi.....	11
1.1.2 Kestane balı.....	19
1.1.2.1 Kestane balının kimyasal bileşimi.....	20
1.1.2.2 Kestane balının biyolojik aktivitesi.....	21
2. MATERYAL VE METOT	26
2.1 Materyaller	26
2.1.1 Arı Sütü ve Kestane Balı.....	26
2.1.2 Deneylerde kullanılan kimyasal maddeler.....	26
2.1.3 Deneylerde Kullanılan Araç ve Gereçler	27
2.1.4 Kullanılan hücre hatları.....	27
2.1.5 Kullanılan mikroorganizmalar	28
2.2 Metot	29
2.2.1 Polen Analizi.....	29
2.2.2 Arı Sütü ve Kestane Balı Karışımının Hazırlanması	29
2.2.3 Toplam Fenolik İçeriği ve Antioksidan Aktivite Testleri.....	29
2.2.3.1 Arı sütü-kestane balı karışım ektresinin hazırlanması	29
2.2.3.2 Toplam Fenolik İçeriği (TPC).....	30
2.2.3.3 FRAP Testi.....	30
2.2.3.4 ABTS Testi	31
2.2.4 Antimikrobiyal aktivite testleri	31
2.2.4.1 Test mikroorganizmalarının hazırlanması	31
2.2.4.2 Agar kuyucuk difüzyon yöntemi.....	32
2.2.4.3 Sıvı mikrodilüsyon yöntemi ve MİK – MBK/MFK değerlerinin belirlenmesi	32
2.2.5 Sitotoksikite testleri	33
2.2.5.1 NKA ve MTT testinde kullanılan çözeltiler.....	34
2.2.5.2 Nötral kırmızı alım (NKA) yöntemi	34
2.2.5.3 3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)- 2,5-difeniltetrazolyum bromür (MTT) yöntemi.....	36

2.2.6 Genotoksisite ve Antigenotoksisite Testleri	36
2.2.6.1 Comet testinde kullanılan çözeltiler	36
2.2.6.2 Tek hücre jel elektroforez (COMET) yöntemi.....	37
3. BULGULAR VE TARTIŞMA	40
3.1 Polen Analizi sonuçları	40
3.2 Toplam Fenolik İçeriği ve Antioksidan Aktivite Testlerinin Değerlendirilmesi	41
3.3 Arı Sütü-Kestane Balı Karışımının Antimikrobiyal Aktivitesinin Değerlendirilmesi	44
3.4 NKA ve MTT Yöntemi ile Sitotoksisitenin Değerlendirilmesi	53
3.5 Comet Yöntemi ile Genotoksisite ve Antigenotoksisitenin Değerlendirilmesi	63
4. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	72
KAYNAKLAR	74
ÖZGEÇMİŞ.....	91



KISALTMALAR

µg	: Mikrogram
µL	: Mikrolitre
µM	: Mikromolar
10-HDA	: 10-hidroksi-2-dekenoik asit
ABTS	: 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid
CH	: Chestnut Honey, Kestane Balı
FRAP	: Demir İyon İndirgeyici Antioksidan Güç
GAE	: Gallik Asit Eşdeğeri
IC₅₀	: Yarı-maksimum inhibisyon konsantrasyonu
mA	: Miliamper
MBK	: Minimum Bakterisidal Konsantrasyonu
MFK	: Minimum Fungisidal Konsantrasyonu
mg	: Miligram
MHA	: Mueller-Hinton Agar
MHB	: Mueller-Hinton Broth
MİK	: Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu
mL	: Mililitre
mm	: Milimetre
mM	: Milimolar
MRSA	: metisilin dirençli <i>Staphylococcus aureus</i>
MTT	: 3-(4,5-Dimetiltiyazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür
NKA	: Nötral Kırmızı Alım
nm	: Nanometre (Dalga boyu)
MRJP	: Temel arı sütü proteinleri
RJ	: Royal Jelly, Arı Sütü
RJ-CH	: Arı Sütü-Kestane Balı
SA	: Sebasik Asit
SDA	: Sabouraud Dekstroz Agar
SDB	: Sabouraud Dekstroz Broth
TE	: Troloks Eşdeğeri

TPC : Toplam Fenolik İçeriği
TPS : Toplam Polen Sayısı
V : Volt



ÇİZELGE LİSTESİ

	<u>Sayfa</u>
Çizelge 2.1 : Test Mikroorganizmaları.....	28
Çizelge 2.2 : İnoküle edilen test küflerinin sayım sonuçları.	32
Çizelge 2.3 : Sıvı mikrodilüsyon yönteminde kullanılan RJ-CH karışımı konsantrasyonları.	33
Çizelge 3.1 : Kestane balında tespit edilen polenlerin ait olduğu taksonlar ve miktarı(%).	40
Çizelge 3.2 : RJ-CH karışımının toplam fenolik içeriği ve antioksidan aktivite değerleri.	41
Çizelge 3.3 : RJ-CH karışımı test mikroorganizmaları üzerinde belirlenmiş MİK ve MBK/MFK değerleri (% mL/mL)	45
Çizelge 3.4 : RJ-CH karışımının test mikroorganizmaları üzerinde belirlenmiş zon çapları (mm).....	49
Çizelge 3.5 : RJ-CH karışımının BEAS-2B hücreleri üzerinde genotoksik ve antigenotoksik etkisine ilişkin bulgular.	65
Çizelge 3.6 : RJ-CH karışımının A549 hücreleri üzerinde genotoksik ve antigenotoksik etkisine ilişkin bulgular.	67

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa

Şekil 2.1 : Dikbıyık Arı Ürünleri (Bursa) şirketinden temin edilen arı sütü ve kestane balı.....	26
Şekil 3.1 : Gallik asit standart grafiği	41
Şekil 3.2 : Troloks standart grafiği (FRAP).	42
Şekil 3.3 : Troloks standart grafiği (ABTS)	42
Şekil 3.4 : RJ-CH karışımının test mikroorganizmaları üzerinde belirlenmiş MİK değerleri.....	46
Şekil 3.5 : RJ-CH karışımının test mikroorganizmaları üzerinde belirlenmiş MBK/MFK değerleri.....	46
Şekil 3.6 : RJ-CH karışımının Gram (+) ve Gram (-) üzerinde belirlenmiş inhibisyon zon çapları (mm)	50
Şekil 3.7 : RJ-CH karışımının <i>C. albicans</i> (a) ve <i>C. parapsilosis</i> (b) üzerinde belirlenmiş inhibisyon zon çapları (mm)	51
Şekil 3.8 : RJ-CH karışımının <i>A. flavus</i> (a) ve <i>P. digitatum</i> (b) üzerinde belirlenmiş inhibisyon zon çapları (mm)	52
Şekil 3.9 : RJ-CH karışımının NKA yöntemine göre BEAS-2B hücrelerindeki sitotoksik etkisi.	55
Şekil 3.10 : RJ-CH karışımının NKA yöntemine göre A549 hücrelerindeki sitotoksik etkisi	55
Şekil 3.11 : RJ-CH karışımının MTT yöntemine göre BEAS-2B hücrelerindeki sitotoksik etkisi	56
Şekil 3.12 : RJ-CH karışımının MTT yöntemine göre A549 hücrelerindeki sitotoksik etkisi	57
Şekil 3.13 : BEAS-2B hücrelerinin genotoksisite Comet Testi görüntüleri.....	64
Şekil 3.14 : BEAS-2B hücrelerinin antigenotoksisite Comet Testi görüntüleri.....	66
Şekil 3.15 : A549 hücrelerinin genotoksisite Comet Testi görüntüleri	68
Şekil 3.16 : A549 hücrelerinin antigenotoksisite Comet Testi görüntüleri	68

ARI SÜTÜ VE KESTANE BALI KARIŞIMININ ANTİOKSİDAN, ANTİMİKROBİYAL, SİTOTOKSİK, GENOTOKSİK VE ANTİGENOTOKSİK ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

ÖZET

Arı ürünleri çok eski zamanlardan beri hem geleneksel hem de modern tıpta kullanılmaktadır. Bal, arı sütü, propolis, arı ekmeği, balmumu ve arı zehrinden oluşan bu ürünlerin antioksidan, antitümör, antiinflamatuvar, antimikrobiyal, yara iyileştirme gibi birçok özellikler gösterdiği yapılan çalışmalarda kanıtlanmaktadır. Son zamanlarda araştırmacılar arı ürünlerinden maksimum verim almak için karışım halinde kullanarak çalışmalar yapmaktadır. Bu tez çalışmasında arı sütü ve kestane balı karışım halinde kullanılmıştır. 1:5 oranında hazırlanan karışımın antioksidan ve antimikrobiyal aktivitesi; BEAS-2B (sağlıklı epitelyal akciğer hücresi) ve A549 (kanseri hücresi) üzerinde sitotoksik, genotoksik ve antigenotoksik etkileri belirlenmiştir.

Bu çalışma, Bursa bölgesinden temin edilen kestane balı ve arı sütü kullanılarak yapılmıştır. Yapılan çalışma sonucunda karışımın toplam fenolik miktarı (TPC) $74 \pm 3,86$ mg GAE/100 g, FRAP ve ABTS antioksidan aktivite değerleri ise sırasıyla $381,9 \pm 23,55$ μ M TE /100 g ve $506 \pm 4,38$ μ M TE/100 g olarak belirlenmiştir. Test mikroorganizmaları olarak Gram (+), Gram (–) bakteriler ile maya ve küflerin kullanıldığı bu çalışmada, antimikrobiyal aktivitenin belirlenmesinde agar kuyucuk ve mikrodilüsyon yöntemi kullanılmıştır. Minimum Bakterisidal Konsantrasyonu (MBK) değerlerine bakıldığında; *S. aureus*'un en yüksek değere (%15 mL/mL) sahip olup en dirençli bakteri olduğu; *S. epidermis* ve *L. monocytogenes*'in ise en düşük MBK değeri ile (%5 mL/mL) karışıma en duyarlı bakteriler olduğu belirlenmiştir. Ayrıca, karışımın mayalar üzerinde küflerden daha iyi antifungal aktiviteye sahip olduğu belirlenmiştir. BEAS-2B ve A549 hücreleri üzerinde yapılan MTT ve NKA sitotoksikite test sonuçlarına göre karışımın iki hücre hattı üzerinde de sitotoksik bir etki göstermediği sonucuna varılmıştır. Comet testi kullanılarak yapılan genotoksikite sonuçlarına göre karışımın A549 ve BEAS-2B hücreleri için yalnızca %10 konsantrasyonunda muamelesiz kontrol grubuna kıyasla genotoksik etki gösterdiği belirlenmiştir. H₂O₂ ile DNA hasarına uğratılan BEAS-2B ve A549 hücreleri karışım ile muamele edilerek antigenotoksik etkisi değerlendirilmiştir. Comet testi sonuçlarına göre karışımın BEAS-2B hücrelerinde %1, %5 ve %25 konsantrasyonlarında DNA hasarını onarıken; A549 hücrelerinde yalnızca %1 konsantrasyonunda DNA hasarını onardığı belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlar, arı sütü-kestane balı karışımının güçlü biyolojik aktiviteye sahip olduğunu göstermektedir.

Anahtar kelimeler: arı sütü, kestane balı, sitotoksikite, antigenotoksikite, antimikrobiyal, antioksidan

INVESTIGATION OF ANTIOXIDANT, ANTIMICROBIAL, CYTOTOXIC, GENOTOXIC AND ANTIGENOTOXIC EFFECTS OF ROYAL JELLY AND CHESTNUT HONEY MIXTURE

SUMMARY

Bee products have been used in both traditional and modern medicine since ancient times. It has been proven in studies that these products, consisting of honey, royal jelly, propolis, bee bread, beeswax and bee venom, show many properties such as antioxidant, antitumor, anti-inflammatory, antimicrobial, wound healing. Recently, researchers have been working on using bee products as a mixture to get maximum efficiency. In this thesis, royal jelly and chestnut honey were used as a mixture. The mixture prepared at a ratio of 1:5, its antioxidant, antimicrobial activity and cytotoxic, genotoxic and antigenotoxic effects were determined on BEAS-2B (healthy epithelial lung cell) and A549 (lung cancer cell).

This study was carried out using chestnut honey and royal jelly obtained from Bursa region. As a result of the study, the total phenolic content (TPC) of the mixture was 74 ± 3.86 mg GAE/100 g, FRAP and ABTS antioxidant activity values were 381.9 ± 23.55 μ M TE /100 g and 506 ± 4.38 μ M TE/100 g, respectively. When the Minimum Bactericidal Concentration (MBC) values are examined on Gram (+), Gram (–) bacteria, yeast and mold; *S. aureus* had the highest value (15% mL/mL) and was the most resistant bacteria; It was determined that *S. epidermis* and *L. monocytogenes* were the most sensitive bacteria to the mixture with the lowest MBC value (5% mL/mL). In addition, it was determined that the mixture had better antifungal activity on yeasts than on molds. According to the results of MTT and NRU cytotoxicity tests applied on BEAS-2B and A549 cells, it was concluded that the mixture have no cytotoxic effect on either cell line. According to the genotoxicity results using the Comet test, it was determined that the mixture had a genotoxic effect only at 10% concentration on A549 and BEAS-2B cells compared to the untreated control group. BEAS-2B and A549 cells, which were exposed to DNA damage with H₂O₂, were treated with the mixture and its antigenotoxic effect was evaluated. According to the results of the Comet test, while at 1%, 5% and 25% concentrations of mixture repaired DNA damage in BEAS-2B cells; only at 1% concentration of mixture repaired DNA damage in A549 cells. The results show that the royal jelly-chestnut honey mixture has strong biological activity.

Keywords: royal jelly, chestnut honey, cytotoxicity, antigenotoxicity, antimicrobial, antioxidant

1. GİRİŞ

Bal, arı ekmeği, arı zehri, arı poleni, propolis ve arı sütü gibi bal arısı kovanlarından elde edilen ürünlerin son yıllarda ömrü uzatma, sağlığı koruma ve sürdürme amacıyla kullanımları oldukça dikkat çekmektedir. Hem geleneksel hem de modern tıpta çeşitli arı ürünlerinin yaygın kullanımı söz konusudur. Birçok bilimsel araştırma arı ürünlerinin biyolojik aktiviteleri nedeniyle sağlık üzerindeki yararlı etkilerini ve farmakolojik özelliklerini araştırmayı hedeflemekte olup bu durum, bu ürünleri içeren nutrasötiklerin ve fonksiyonel gıdaların da üretiminin artmasına yol açmaktadır (Pasupuleti ve diğ, 2017).

Apiterapi, bal, polen, propolis, arı sütü, arı zehri ve balmumu gibi arı ürünlerinin karaciğer hasarı, kardiyovasküler ve gastrointestinal problemler gibi rahatsızlıkları tedavi etmek ve yara iyileşmesini desteklemek için kullanılması olarak tanımlanmaktadır (Ezz El-Arab ve diğ, 2006). Apiterapi, bir başka deyişle bal arısı ve ürünleri aracılığıyla tedavi ve bütüncül şifa sanatı ve bilimidir. Apiterapinin kökleri 6000 yıldan daha eski olan Mısır tıbbına kadar uzanmaktadır (Tilahun ve diğ, 2016). Eski Mısırlılar, Asurlular, Çinliler, Yunanlılar ve Romalılar, bağırsak yaraları ve hastalıkları için bal arısı ürünlerini kullanmışlardır (Al-Jabri, 2006). Bal ve diğer bal arısı ürünleri, yüzyıllar boyunca geleneksel tıpta ve modern terapötiklerde değerli bir yere sahip olmuştur (Tilahun ve diğ, 2016).

Apiterapistler, arı ürünlerinin çoğu hastalığı iyileştirmek için kullanılabileceğine inanmaktadırlar. Bununla birlikte, geleneksel tıpta arı ürünlerinin kullanımı, standart tedavilere eşit veya daha iyi etkiler göstermektedir. Arı ürünlerinin bu terapötik potansiyeli yüksek besin değerleri ile açıklanmaktadır (Moolenaar ve diğ, 2006).

Arı ürünleri içerisinde en çok bilinen ürün olan doğal balın gıda ve ilaç olarak kullanımı çok eski zamanlara dayanmaktadır. Ham balın en eski tatlandırıcı olduğu ve birkaç milyon yıl önce tüm dünyada kullanıldığı bildirilmiştir (Moolenaar ve diğ, 2006). Doğal bal, *Salmonella*, *Shigella*, *Escherichia coli*, *Helicobacter pylori* vb. dahil

olmak üzere birçok organizmaya karşı bakterisidal aktivite göstermektedir (Jeffrey ve Echazarreta, 1996).

Bal, antimikrobiyal özelliklere ve üstün yara iyileştirici etkilere sahiptir (Molan, 2006). Dış yaralar (Molan, 2006) ve yatak yaraları için kullanılmıştır (Fratellone et al. 2016). Ülser ve kolit gibi gastrointestinal hastalıklar için faydalıdır. Ayrıca mürver çiçekleri ile karıştırılarak doğal bir öksürük şurubu olarak kullanıldığı bildirilmiştir (Oduwole ve diğ, 2014).

Arı ürünleri içinde dikkat çeken diğer bir ürün olan arı sütü (Royal Jelly, RJ) ise genç larvaları ve yetişkin ana arıyı beslemek için genç işçi arıların hipofarengal bezinden salgılanan bir maddedir. RJ, dört-beş günlük kraliçe arı larvalarına yönelik önemli bir besindir (Adjare, 1990) ve diğer bal arısı ürünleri gibi besin değeri çok yüksektir. Bağışıklık sistemini güçlendirmek ve enerjiyi artırmak için kullanılmaktadır Ek olarak, antibiyotik, antiinflamatuvar, yara iyileştirici ve kanser önleyici etkileri artırabileceğine dair birçok çalışma vardır (Hattori ve diğ, 2007a). Doğal bir antibiyotiktir ve larva evresinde kan hücrelerinin gelişmesinde ve tüm yaşam süresi boyunca yumurtlama özelliklerinin korunmasında etkin rol oynamaktadır. Ayrıca, yüksek tansiyon, diyabet ve kardiyovasküler hastalık riskini azaltma potansiyeline sahip antioksidanlara sahiptir (Rafiqi ve diğ, 2019).

RJ'nin antibakteriyel ve antifungal bir ajan olarak kullanıldığı bildirilmiştir. Yara iyileşmesi ve doku onarımı için oldukça etkili bir madde olduğu düşünülmektedir. Bağışıklık sisteminin öncüsü olarak görülen RJ, hormonları düzenlemek ve bilişsel işlevi geliştirmek için kullanılmaktadır (Vandamme ve diğ, 2013). Bal arıları, fareler ve insanlar gibi çeşitli canlılardaki morfolojik karakterleri, büyümeyi, öğrenmeyi, boyut ve şekil varyasyonlarını etkilemektedir (Shi ve diğ, 2018).

Arı ürünleri farklı besin içeriklerinden oluşur ve çok çeşitli biyolojik aktivitelere sahiptir. Son yıllarda tüketiciler, maksimum faydayı elde etmek için farklı ürünleri birarada kullanmaktadır. Bu nedenle, farklı ürünlerin kombinasyonunu içeren gıda maddelerinin üretimine artan bir eğilim vardır (Özkök ve Silici, 2017).

Yapılan tez çalışmasında birlikte kullanımları yaygın olan RJ ve bal karışımının antioksidan, antimikrobiyal, sitotoksik, genotoksik ve antigenotoksik aktivitelerinin araştırılması hedeflenmiştir. Bu amaçla, Bursa bölgesinden temin edilen arı sütü ve kestane balı karışımı taze olarak hazırlanmış ve kullanılmıştır. Karışımın toplam

fenolik içeriğini ve antioksidan aktivitesini belirlemek için TPC, FRAP ve ABTS testleri yapılmıştır. Antimikrobiyal aktiviteyi belirlemek için Gram (+), Gram (-) bakteriler, maya ve küf kullanılarak agar kuyucuk difüzyon ve sıvı mikrodilüsyon testleri yapılmıştır. Karışımın sitotoksik, genotoksik ve antigenotoksik aktivitesini belirlemek için sağlıklı akciğer hücreleri (BEAS-2B) ve akciğer kanser hücreleri (A549) hücre hatları ile çalışılmış ve her iki hücre hattında Nötral kırmızı alımı (NKA), 3-(4,5-dimetiltiyazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür (MTT) ve Comet testleri uygulanmıştır.

1.1 Literatür Araştırması

1.1.1 Arı sütü

Arı sütü veya uluslararası bilinen adıyla Royal Jelly (RJ), öncelikle ana arıyı geliştirmek ve korumak için genç işçi arıların başlarındaki hipofarengal bezlerden salgılanan kremi formda bir üründür (Bărnău ve diğ., 2011). Yavru ve kraliçe arıları beslemek ve büyütmek (Alvarez-Suarez, 2017) için gerekli tüm besinleri içeren (Kurth ve diğ., 2019); botanik kökenli (Abu-Serie ve Habashy, 2019), hafif keskin koku ve tada sahip, sarımsı beyaz, asidik (Bărnău ve diğ., 2011), sütlü ve yapışkan (Bengü ve diğ., 2020) bir salgıdır.

Kraliçe bal arılarının temel besini olan RJ, işçi arılarının yağ asitleri üreten çene bezi (mandibular) ve ana arı sütü proteinleri (MRJP'ler) ailesine ait olan birçok proteini üreten hipofarengal baş bezi olmak üzere iki bez tarafından üretilmektedir (Fratini ve diğ., 2016). Jelatinimsi kıvamda bir madde olarak görünen RJ, farklı boyutlarda çözünmemiş granüllerin varlığından dolayı genellikle homojen değildir (Bărnău ve diğ., 2011) (Alvarez-Suarez, 2017). Arı kovanlarının çevresel konumunu yansıtan bir özellik olarak bal arılarının yiyecek arama aktivitesine bağlı polen taneleri içerir (Piana ve diğ., 2006). Suda kısmen çözünen, 1.1 g/mL yoğunluğa sahip, oldukça asidik bir üründür (pH 3.4-4.5) (Bărnău ve diğ., 2011).

Tüm arı larvaları için yumurtadan çıkma ile yaşamın üçüncü günü arasında (Pasupuleti ve diğ., 2017) ve kraliçelere dönüşmek üzere seçilen larvaların ise yaşamının beşinci gününe kadar tek besin kaynağı olan RJ, kraliçe arının tüm yaşamı boyunca ana besin kaynağıdır (Alvarez-Suarez, 2017). Bir larvanın kraliçe arıya morfolojik olarak değişmesine izin veren ana bileşik olan Royalactin'i içeren RJ, yalnızca kraliçe arılar

tarafından tüketildiği için bir "süper gıda" olarak da bilinir (Moniruzzaman ve diğ, 2012). Arı larvalarının 5-15 günlük yaşta uzun ömürlü, verimli, olgun ana arılara dönüşmesini sağlayan özel besindir. İşçi arıların kısa ömürleri (6-8 hafta) ile karşılaştırıldığında, 4-5 yıla kadar yaşayan kraliçe arının uzun yaşam süresi üzerinde RJ, önemli bir etkiye sahiptir (Ramanathan ve diğ, 2018). Ayrıca, şekerler, lipidler ve proteinlerin metabolizması yoluyla larva gelişimi ve kraliçe arı üremesi için gerekli olmasının yanı sıra, kraliçe arıların işçi arılara kıyasla daha büyük vücut boyutuna sahip olması ve doğurganlık özelliği de RJ ile ilişkilendirilmektedir (Ahmad ve diğ, 2020).

Beslenme işlevinin yanı sıra, kraliçe arının hücreleri dikey olarak yönlendirildiği ve aşağıya doğru açıldığı için RJ'nin hem hücre tavanına yapışması hem de kraliçe larvasını hücrede tutması gerekmektedir (Pirk, 2018). İlk olarak, Dönhoff (1859) tarafından gündeme getirilen kraliçe larvasının böyle bir hücrede nasıl tutulduğu sorusu, Buttstedt ve diğ. (2016) tarafından cevaplanmış ve viskozitenin önemli olduğu vurgulanmıştır (Buttstedt ve diğ, 2016). Buna göre, yalnızca doğal RJ'nin pH değeri 4.0 olup larvayı yüzeyde tutmaya yetecek kadar viskozdur ve pH yükseltirirse viskozite azalacağı için larvaları tutma özelliğini kaybedecektir. Viskozitenin pH'a bağlı olarak böyle bir değişim göstermesinin moleküler açıdan sebebi ise temel arı sütü proteini 1 (Major Royal Jelly Protein 1 (MRJP1)) ve apisimin proteinidir (Buttstedt ve diğ, 2018). Yüksek biyoaktif bileşik içeriği nedeniyle, antibakteriyel, antioksidan, anti-inflamatuar, vazodilatatif, hipotansif, hipokolesterolemiant, hepatoprotektif ve antitümör aktivite gibi sağlığı geliştirici birçok özellik gösteren RJ, gıda endüstrisinde insan sağlığını iyileştirmek için yaygın olarak kullanılmaktadır (Alvarez-Suarez, 2017). Enerjiyi artırdığı, stresi azalttığı ve bağışıklık sistemini güçlendirdiği gösterilen çok çeşitli vitamin, mineral ve amino asitlerle doludur. RJ, dünya pazarında bir besin takviyesi olarak tanınmıştır ve kozmetikte tonik ve biyoyararıcı etkileri olduğu iddia edilen ürünler şeklinde kullanılmaktadır (Bărnău ve diğ, 2011).

Yüzyıllar boyunca taze RJ, alternatif tıpta kullanılmıştır. Daha önce yapılan birçok çalışmada antimikrobiyal aktivite, alerjik reaksiyonların baskılanması, kan kolesterolü miktarının düşürülmesi, kanser ve HIV hastalarında hücre hasarının önlenmesi, yara iyileşmesi ve büyüme hızlanması gibi çeşitli tıbbi etkiler gösterdiği bildirilmiştir (Bărnău ve diğ, 2011).

RJ'nin insanlar üzerindeki fizyolojik etkileri hala tam olarak anlaşılamamıştır (Bărnăușiu ve diğ, 2011). Anti-oksidasyon, anti-inflamasyon, anti-tümör, anti-agenezis, antibakteriyel, vazodilatatif, hipertansif, anti-hiperkolesterolemik, nefroprotektif ve cilt beyazlatma etkileri dahil olmak üzere çok çeşitli farmakolojik aktivite *in vivo* deneysel çalışmalarla gösterilmiştir. Araştırmalar, RJ'nin apoptotik ve anti proliferatif yolları indükleyerek antikanser aktiviteye sahip olduğunu göstermiştir (Bengü ve diğ, 2020). Besin değeri ve insan sağlığına olan faydaları gündeme geldikçe piyasada ticari RJ ürünleri de giderek artmaktadır (Peng ve diğ, 2017).

1.1.1.1 Arı sütünün kimyasal bileşimi

RJ kimyasal olarak, su (%50-60), proteinler (%18), karbonhidratlar (%15), lipitler (%3-6), mineral tuzlar (%1,5) ve vitaminler (Pasupuleti ve diğ, 2017) içermekle birlikte; peptidler (royalisin, jellein, apisimin ve royalaktin); polifenoller, fenolik asitler ve flavonoidler gibi çok sayıda biyoaktif bileşik de içermektedir (Alvarez-Suarez, 2017). Spektrometrik analizlere göre, içinde yaklaşık 185 organik bileşik tespit edilmiştir. RJ, riboflavin, tiamin, niasin, folik asit, biotin ve piridoksin gibi vitaminler ve daha az miktarda C, D, A ve E vitaminleri içermektedir (Nagai ve Inoue 2004). Ayrıca, kalsiyum, sodyum, potasyum, bakır, demir, çinko ve manganez, RJ'deki ana minerallerdir (Khazaei ve diğ, 2018). RJ'nin ana biyoaktif bileşiklerinden biri, doğada yalnızca RJ'de bulunan ve bu nedenle RJ ürünlerinin kalite belirteci olarak kullanılan (Peng ve diğ, 2017) doymamış bir yağ asidi olan 10 hidroksi-trans-2-dekenoik asittir (10-HDA) (Khazaei ve diğ, 2018). Royalaktin, RJ'deki en önemli proteindir (Sugiyama ve diğ, 2012). Yağ asidi, proteinler, adenosin monofosfat (AMP) N1 oksit, adenosin, asetilkolin, polifenoller ve testosteron, progesteron, prolaktin ve östradiol gibi hormonlar RJ'nin içinde bulunduğu bildirilen diğer yararlı biyoaktif bileşenlerdir (Ramadan ve Al-Ghamdi, 2012).

RJ bileşimi iklime; çevresel, mevsimsel ve bölgesel koşullara; işçi ve/veya larva dönemindeki arıların metabolitleri ve fizyolojilerindeki değişikliklerin yanı sıra arıların genetiği ve ırkına göre değişmektedir (Alvarez-Suarez, 2017).

RJ'nin kuru ağırlığının yaklaşık %50'sini oluşturan proteinler, son 20 yılda RJ ile ilgili derinlemesine araştırmalar sayesinde tanımlanmıştır (Fratini ve diğ, 2016). RJ içindeki birincil protein bileşenleri, içeriğinin %83-90'ını oluşturan temel arı sütü proteinleri (MRJP'ler) (Bíliková ve diğ, 2002) ile royalisin, jelleinler, royalactin, apisimin,

apolipoprotein III benzeri protein ve glikoz oksidazdan oluşmaktadır (Fratini ve diğ, 2016).

MRJP'lerin glikoproteinler oldukları ve bunların karbonhidrat kısımlarının çözünürlüklerinin, katlanma ve biyolojik rolleri açısından önemli olduğu bildirilmiştir (Kunugi ve Amira, 2019). Ana arı ile işçi arı arasındaki farklılaşmada önemli rol oynayan MRJP'ler, ayrıca diğ arı ürünlerinin üretiminde, özellikle polen-pelet ve arı ekmeği oluşumunda da görev almaktadır (Buttstedt ve diğ, 2013).

RJ proteinlerinin yaklaşık %80'i suda çözünür olup, moleküler kütlesi 49-87 kDa (Fratini ve diğ, 2016) olan 9 üyeden (MRJP1-MRJP9) oluşan MRJP ailesine (Abu-Serie and Habashy 2019) veya apalbuminlere (Khazaei ve diğ, 2018) (Fratini ve diğ, 2016) aittir. MRJP'ler, uzun ömürlü olan bal arısı kraliçesinin gelişimini yönlendiren temel bir besinsel rol oynar (Fratini ve diğ, 2016). MRJP 1, MRJP 4 ve MRJP 5, esansiyel amino asitlerin ana alımını temsil ederken; MRJP 2 ve MRJP 5, kraliçe arının büyümesi için gereken en önemli nitrojen rezervidir (Schmitzova ve diğ, 1998). Ayrıca, MRJP 3'ün polimorfik bir protein olması, nitrojen kaynağı olarak kullanılmasını açıklarken (Albert ve diğ, 1999); MRJP 1'in bal arısı nöronlarında da geri kazanılır olması, proteinin beslenmeye ek olarak bilinmeyen başka bir işlevine işaret etmektedir (Peixoto ve diğ, 2009).

Son zamanlarda, RJ'nin birkaç özelliği MRJP'lere atfedilmiş ve MRJP'lerin yaşlı sıçanlarda uzamsal belleği iyileştirdiği gösterilmiştir (Park ve diğ, 2019). MRJP 1'in, sıçan hepatositlerinde proliferasyon ve apoptoz baskılaması dahil olmak üzere büyüme faktörü benzeri aktivitelerde rol oynadığı bildirilmiştir (Park ve diğ, 2020). RJ'deki ana alerjenler olarak karakterize edilen MRJP 1 ve MRJP 2, farelerde tümör nekroz faktörü (TNF)-a salımına (Fratini ve diğ, 2016) ve MRJP 3 ile modüle edilmiş bağışıklık tepkilerinin uyarılmasına sebep olmaktadır (Park ve diğ, 2019). MRJP 2, antimikrobiyal ve antioksidan aktiviteler sergilemekte olup (Park ve diğ, 2020); bal arısı yavru çürüklüğü patojeni *Paenibacillus larvae*'a karşı antibakteriyel etki göstermektedir (Park ve diğ, 2019). MRJP 3'ün *in vitro* ve *in vivo* immün tepkileri modüle ettiği ve MRJP 4'ün antimikrobiyal aktivitesi de rapor edilmektedir (Park ve diğ, 2019). Ayrıca, MRJP'lerin antimikrobiyal aktivitesine odaklanan birkaç çalışmada, MRJP 1'in maya ve bakterilere karşı antimikrobiyal aktiviteler sergilediği (Park ve diğ, 2019); MRJP 2-5 ve 7'nin ise RJ'nin antibakteriyel özelliklerine katkıda bulunduğunu gösterilmiştir (Park ve diğ, 2020). Diğ RJ proteinleri arasında bulunan

royalisin, jelleinler, royalaktin ve aspimin de antibakteriyel etkiye sahiptir. Royalaktin, ana arıların işçi arılardan farklılaşmasında MRJP1 ile aynı etkiyi göstermektedir (Bíliková ve diğ, 2002). RJ'de öncelikli olarak tanımlanan protein olan Apolyporphin III benzeri protein, lipidlerin sulu ortamlarda bir protein-lipid kompleksi olarak transferine yol açan lipid ile ilişkili bir proteindir. Apoliporfin III benzeri protein, antibakteriyel yönüne ek olarak arı larvalarında immünolojik reaksiyonların gelişiminde rol oynamaktadır (Kim ve Jin, 2015).

Royalisin, 51 amino asit (Cornara ve diğ, 2017) ve altı sistein kalıntısından oluşan ve bakteri ve mantarlara karşı antimikrobiyal aktivite gösteren amfipatik (hem hidrofobik hem de hidrofilik) bir peptiddir (Kim ve Jin, 2019). Düşük pH ve yüksek sıcaklıkta yüksek stabilite sergileyen kompakt yapısı, yüksek sistein içeriği (6 kalıntı) ve üç molekül içi disülfür köprüsünden kaynaklanmaktadır. Birer böcek türü olan *Sarcophaga peregrine* embriyonik hücrelerinden ve *Phormia terra novae* larvalarından alınan 40 aminoasitten oluşan sapesinler ile geniş bir homolog diziyeye sahiptir (Fratini ve diğ, 2016). Royalisinler ve MRJP 1'in spesifik proteazlar tarafından triptik sindiriminin sonucu oluşan Jelleinlerin, yapılan *in vitro* çalışmalarda antimikrobiyal etkisi gösterilmiştir (Fratini ve diğ, 2016).

Proteinlerden sonra en önemli ikinci biyoaktif bileşik olan lipitler, RJ kuru ağırlığının %3-19'unu oluşturmaktadır (Maghsoudlou ve diğ, 2019). Lipid ve yağ asitleri içeriği RJ'nin benzersiz ve ayırt edici özelliklerinden biridir (Ahmad ve diğ, 2020) (Alvarez-Suarez, 2017) (Amira ve Amin 2019). %80-85 yağ asitleri, %4-10 fenolik lipidler, %5-6 mum, %3-4 steroid ve %0,4-0,8 fosfolipid bileşiminden meydana gelen lipidlerin (Kodai ve diğ, 2007) az miktarı esterlenmiş halde bulunmaktadır (Ahmad ve diğ, 2020).

Lipitler, esas olarak zincirde 8-12 karbon atomlu olan, serbest kısa zincirli hidroksil veya dikarboksilik yağ asitlerinden meydana gelmektedir (Li ve diğ, 2013). Çoğunlukla az miktarda serbest yağ asidi içeren tri, di ve monogliserit formlarında olan bu yağ asitleri, hayvanlar ve bitkilerdeki yağ asitlerinden farklıdır (Alvarez-Suarez, 2017).

Yağ asitlerinin yaklaşık %80-90'ı 10-hidroksi-2-dekenoik asit (10-HDA), 10-hidroksidekenoik asit (10-HDDA) ve sebasik asit (SA) gibi farklı bir yapıya sahiptir (Ahmad ve diğ, 2020). Yağ asidi fraksiyonu %32 10-HDA, %24 glukonik asit, %22

10-HDDA, %5 dikarboksilik asitler ve diğer birkaç asitten oluşmaktadır (Terada ve diğ, 2011). Bunların dışında RJ'de, 8-hidroksi-oktanoik asit (8-HOC), 3,10-dihidroksidekandioik asit (3,10 HDecDA), 9-hidroksi-2-dekenoik asit (9-HDA), 1,10-dekandioik (DecDA), 3-hidroksidekanoik asit (3-HHDA) ve 2-desen-1,10-dioik asit (2-DecDA) gibi yağ asitleri de bulunabilmektedir (Isidorov ve diğ, 2012).

Kalite için uluslararası bir standart olarak kabul edilen 10-HDA, dondurularak kurutulmuş RJ'nin %3,5'ini temsil eden stabil bir bileşiktir (Ahmad ve diğ, 2020). Geçmiş dönemlerde, RJ için bir belirteç olarak benimsenen; RJ içeren arı ürünlerini değerlendirmek için bir araç olarak kullanılan 10-HDA, bugüne kadar RJ dışında diğer arı ürünleri de dahil olmak üzere hiçbir bileşikte bildirilmemiştir (Alvarez-Suarez, 2017). 10-HDA, arıcılar ve üreticiler tarafından RJ için bir tazelik göstergesi olarak kullanılmış ve %1,8'den fazla 10-HDA içeriğine sahip örnekler taze ve orijinal olarak kabul edilmektedir (Antinelli ve diğ, 2003).

Steroller, RJ'nin diğer yağlı bileşikleridir. Toplam sterollerin %49-58'ini oluşturan 24-metilenekolesterol en önemli steroldür. β -sitosterol (toplam sterollerin% 19-24'ü), izofucosterol (toplam sterollerin% 9-16'sı), kampesterol (toplam sterollerin% 6-7'si) ve desmosterol (toplam sterollerin% 0,5-4,5'i) ise RJ'de bulunan diğer sterollerdendir (Melliou ve Chinou, 2014). RJ'nin lipid içeriği, gaz kromatografisi yoluyla serbest ve toplam organik asitler veya çözücü ekstraksiyonu yoluyla toplam lipidler olarak belirlenmektedir (Nabas ve diğ, 2014).

RJ içindeki yağ asitlerinin sahip olduğu birçok özellik, ürüne ticari ve tıbbi değer katmaktadır. Yapılan çalışmalarda, yağ asitlerinin kanser önleyici özellikler ve birkaç immünomodülatör aktivite gösterdiği bildirilmektedir (Alvarez-Suarez, 2017). Yapılan çalışmalar, 10-HDA'nın fibroblast hücre hatlarında dönüştürücü büyüme faktörü- β (güçlü bir immünosupresif sitokin) üretimini uyardığını göstermektedir (Alvarez-Suarez, 2017). 10-HDA'nın, beyin kaynaklı nörotrofik faktörün etkisini taklit ederek progenitör hücrelerden (PC12) nöronal farklılaşmayı uyardığı, nörojenik aktivitesi göz önüne alındığında yaşa bağlı nörodejeneratif bozuklukları tedavi etmek için kullanılabileceği bildirilmiştir (Hattori ve diğ, 2007b).

Dendritik hücreler (DC'ler), patojenlere, tümörlere ve diğer antijenlere karşı bağışıklık tepkisinin başlatılmasında ve düzenlenmesinde önemli bir rol oynar. Yüksek konsantrasyonlarda, 10-HDA ve 3,10-dihidroksi-dekanoik asit (3,10-DDA), sıçan DC-

T hücresi eş kültürlerinde allojenik T hücrelerinin çoğalmasını inhibe ederek immünomodülatör aktivite göstermektedir (Vucevic ve diğ, 2007).

SA, 10-HDA ve 10HDDA, mitojenle aktive olan protein kinaz (MAPK) ve nükleer faktör kappa-B sinyallemede yer alan birkaç proteinin regülasyonu yoluyla antiinflamatuvar etkiler göstermektedir. Ayrıca, bu asitler, cinsiyete bağlı bir şekilde kemik, kas ve yağ dokusuna fayda sağlayabilen östrojen reseptörlerinin (ER'ler) ER α , ER β aktivitesini artırarak östrojen sinyaline aracılık etmektedir (Kunugi ve Ali, 2019).

Histonların ϵ -asetil-lizin kalıntılarının hidrolizini katalize eden histon deasetilazları inhibe ederek *Apis mellifera*'nın kast farklılaşması üzerinde epigenetik kontrol uygulayan 10-HDA, RJ'nin düşük pH'ı nedeniyle güçlü bir bakterisidal etki göstermektedir. Bu sebeple de arı kovanlarını etkileyen *Paenibacillus larvae* türünün neden olduğu bakteriyel enfeksiyonlara karşı arı larvalarını korumaktadır (Šedivá ve diğ, 2018). Memelilerde, fareleri *Staphylococcus aureus* toksini olan lipoteikoik asidin neden olduğu pulmoner hasara karşı korur. Aynı zamanda insan kolon kanseri hücrelerinde çeşitli patojenik bakteri türlerine karşı antibakteriyel etki gösterdiği bildirilmiştir (Chen ve diğ, 2018).

10-HDA ve diğer RJ yağ asitleri antibakteriyel özelliklere sahiptir ve bu özellik ürünlerdeki nispeten düşük bakteri içeriğine katkıda bulunur. RJ'den elde edilen 3-hidroksidodekanoik asit, 11-oksododekanoik asit ve (11S)-hidroksidodekanoik asit gibi yağ asitleri, patojenik bakteri ve mantarlara karşı güçlü, geniş spektrumlu antimikrobiyal aktivite sergilemiştir (Melliou ve Chinou, 2005). 3-Hidroksidodekandioik asit, trans-10-asetoksidek-2-enoik asit ve (11S)-hidroksidodekanoik asit, 0.17 ile 0.36 mg/mL arasında değişen MİK değerleri ile *S. aureus*, *S. epidermidis*, *S. mutans* ve *S. viridans*'a karşı inhibitör aktivite göstermiştir (Alvarez-Suarez, 2017). SA (0,15 ile 0,20 mg/mL'lik MİK değerleri) ve 11-oksododekanoik asit (0,26-0,67 mg/mL'lik MİK değerleri) farklı maya ve küflere karşı daha yüksek anti-fungal aktivite göstermiştir (Melliou ve Chinou, 2005).

Ham RJ için önemli bir kalite kontrol kriteri olan su, RJ'nin %60-70'ini oluşturmakta ve mikrobiyal stabilite göstermektedir (Maghsoudlou ve diğ, 2019). Mineral tuzlar, RJ içeriğinin %1,5'ini oluşturmaktadır (Kunugi ve Ali, 2019). RJ'nin küçük miktarlarda çeşitli mineraller (Kunugi ve Ali, 2019) ve K, P, S, Na, Ca, Al, Mg, Zn,

Fe, Cu ve Mn gibi ana elementler ile eser miktarlarda (0.01-1 mg/100 g) Ni, Cr, Sn, W, Sb, Ti ve Bi bulundurduğu bildirilmiştir (Maghsoudlou ve diğ, 2019).

RJ içeriğinin %7,5-15'ini oluşturan şekerin %90'ını fruktoz ve glukoz %0,8–3,6'sını sükroz oluşturmaktadır (Kunugi ve Ali, 2019). Az miktarda maltoz, trehaloz, melibiyoz, riboz ve erloz gibi farklı şekerler de içeren (Maghsoudlou ve diğ, 2019) RJ'nin şeker içeriği, botanik kökene, mevsime, coğrafi konuma, arı türlerine ve üretim yöntemine bağlı olarak değişmektedir (Kunugi ve Ali, 2019).

Vitaminler açısından son derece zengin olan RJ, geniş varyasyonlarda piridoksin, biotin, pantotenik asit ve inositol içerirken; tek tip riboflavin, tiamin, niasin ve folik asit de içermektedir. Bunların yanı sıra, RJ'nin C vitamini içerdiği ve A, D ve K vitaminleri içermediği de bilinmektedir (Maghsoudlou ve diğ, 2019). RJ'de en bol bulunan vitamin Pantotenik asit (B5 vitamini) (52,8 mg/100 g) iken; niasin (42,42 mg/100 g) onu takip etmektedir. Küçük miktarlarda çeşitli B grubu vitaminleri (B1, B2, B6, B8, B9 ve B12) içeren RJ'de askorbik asit (C vitamini), E vitamini ve A vitamini de bulunmaktadır. Ayrıca, Gardner (1948) tarafından RJ'nin pantotenik asidinin yaşam süresini uzatan bir ajan olduğuna dikkat çekilmiştir.

Amino asitler açısından zengin olan RJ (Kunugi ve Ali, 2019), 8'i temel, 5'i tanımlanmamış olmak üzere en az 17 çeşit amino asit içermektedir. Bunlar glutamik asit (%8,3), tirozin (%4,9), prolin (%3,9), metiyonin (%3,7), triptofan (%3,4), arginin (%3,3), glisin (%3,0), lösin (%3,0), serin (%2,9), lisin (%2,9), aspartik asit (%2,8), treonin (%2,0), valin (%1,6), izölösün (%1,6) ve fenilalanin (%0,5)'dir. Metiyonin ve serbest glisininin RJ kalitesini tahmin etmek için bir parametre olarak kullanılabilecekleri bilinmektedir (Alvarez-Suarez, 2017).

Yapılan analizler sonucunda RJ'deki en belirgin aminoasitin lizin; ardından prolin, sistin ve aspartik asit olduğu belirlenmiştir. RJ, diğer amino asitleri 5 mg/100 g'dan daha az içerir (Pina ve diğ, 2018). RJ amino asitlerinin memelilerde ömrü uzatabildiğine dair kanıtlar bulunmaktadır. Buna göre, RJ'de (lösin, izölösün ve valin) bulunabilen 3 dallı zincirli amino asitle zenginleştirilmiş karışımın (BCAAem) uzun süreli diyet takviyesi, mitokondriyal biyogenez ve sirtuin 1 ekspresyonunu artırırken; kalp ve iskelet kasında ROS üretimini azaltmaktadır. Bu durum, yaşa bağlı kas disfonksiyonunun hafifletilmesiyle ilişkili olup, erkek farelerin ortalama yaşam süresinde bir artışa neden olmaktadır. Bu amino asitlerin mitokondriyal biyogenez

üzerindeki etkisi, endotelial nitrik oksit sentaz (eNOs) ve mTOR ve substratlarının sinyal yollarının aktivasyonunu içermektedir (Pina ve diğ, 2018).

RJ, gallik asit (Kunugi ve Ali, 2019), fenolik ve toplam flavonoid gibi bazı başka biyoaktif bileşikler de içermektedir. Fenol ve karboksilik grupları içeren fenolik bileşikler (Ahmad ve diğ, 2020) pinobanksin, organik asitler (örneğin oktanoik asitler, dodekanoik asit, 1,2-benzendikarboksilik asit) ve bunların esterlerinden oluşan geniş bir içeriğe sahiptir (Kunugi ve Ali, 2019). Flavonoid bileşikler flavonlar (apigenin ve glikozidleri, luteolin, chrysin ve acasetin), flavanonlar (naringenin, hesperetin ve isosakuranetin), flavonoller (kaempferol ve isorhamnetin glikozitler) ve izoflavonoidler (genistein ve formononetin) olmak üzere dört gruba ayrılmaktadır (Ahmad ve diğ, 2020). Bu bileşenlerin antioksidan aktivitesi, RJ'nin antiapoptotik ve antiinflamatuvar özelliklerine katkıda bulunmaktadır (Kunugi ve Ali, 2019).

1.1.1.2 Arı sütünün biyolojik aktivitesi

RJ'nin biyolojik aktiviteleri, laboratuvar hayvanları (fare, sıçan, tavşan, hamster), çiftlik hayvanları (koyun, tavuk) (Pavel ve diğ, 2011) ve mikrobiyal organizmalar (bakteriler, mantarlar, virüsler ve nematodlar) kullanılarak birçok *in vitro* ve *in vivo* deneysel model üzerinde ve klinik deneylerde araştırılmıştır (Ahmad ve diğ, 2020).

RJ, farelerde ve insanlarda dikkate değer bir antikanser özelliğine sahiptir (Khazaei ve diğ, 2018). RJ, tümörün indüklediği anjiyogenezin inhibisyonu ve/veya immün fonksiyonun aktivasyonu yoluyla karaciğerde veya akciğerde tümör büyümesinin ve/veya metastazının inhibisyonu olarak potansiyel anti-kanser özellikler göstermektedir (Khazaei ve diğ, 2018).

Kanser, yaşlı popülasyonda yaygın bir patolojidir ve kansere bağlı yorgunluk, bu hastaların yaşam kalitesini daha da düşüren bir komplikasyondur. Bu durumlarda, minimum yan etki ile semptomları iyileştirmek için alternatif tıp değerli bir seçim olmaktadır (Bălan ve diğ, 2020). Mofid ve ark. (2016) göre, kanser hastalarının %50'si kansere bağlı yorgunluk yaşamaktadır ve hem RJ hem de işlenmiş balın uygulanması semptomatolojiyi hafifletebilmektedir. Bu çalışmada 26 hastaya günde iki kez 5 mL RJ ve işlenmiş bal uygulanmış ve sonuçlar bir ay boyunca sadece 5 mL bal alan hastaların sonuçlarıyla karşılaştırılmıştır. Bu klinik araştırmanın sonucunda, bal alımının RJ ile desteklenmesinin kansere bağlı yorgunluğun iyileştirilmesinde daha etkili olduğu bildirilmiştir.

Farklı ilaç ve bileşiklerin metabolizmasında ve biyotransformasyonunda anahtar bir enzim olan sitozolik N asetil transferaz (NAT) tarafından katalize edilen N-asetilasyon sürecinin kolorektal, mesane ve meme kanserleri etiyolojisinde önemli bir rol oynadığı öne sürülmüştür (Khazaei ve diğ, 2018). N-asetilasyonu etkileyen RJ, insan karaciğeri tümör hücre hattındaki 2 aminoflorein (2-AF) metabolitlerinin metabolizmasını inhibe etmekte ve J5 hücrelerinde 2-AF'yi konsantrasyona bağımlı bir şekilde azaltmaktadır (Premratanachai ve Chanchao, 2014). 10-HDA ve insan interferon-alfa (HuIFN-aN3) proteinleri, anti-tümör yanıtıyla ilgili olarak benzer bir aktiviteye sahiptir ve bunların kombinasyonları, CaCo-2 hücrelerinde MDA aracılığıyla glutasyon seviyesini düşürmekte ve lipid peroksidasyon seviyesini arttırmaktadır (Filipiç ve diğ, 2015). RJ kaynaklı tüm lipofilik fraksiyonlar, insan nöroblastomuna karşı ortak bir anti-tümöral etkiye sahip olup; tümör başlangıcını önlemekte ve insan nöroblastomunun büyümesini yavaşlatmaktadır (Ahmad ve diğ, 2020).

RJ, son zamanlarda oldukça etkili bir antioksidan ve güçlü bir serbest radikal temizleyici olarak özel ilgi görmektedir. Yapılan çalışmalarda hem RJ (Maghsoudlou ve diğ, 2019) hem de RJ'nin enzimatik hidrolizatları, su ve alakalin özütleri antioksidan özellikleri açısından test edilmiş (Pavel ve diğ, 2011), güçlü antioksidatif aktivitesi, bitkiler, mayalar, sıçanlar üzerinde çeşitli *in vitro* ve *in vivo* deneysel modellerde belirlenmiştir. Oksidatif strese karşı koruyucu aktivitesi ve lipid peroksidasyonu inhibe edici etkileri yapılan bu deneylerde doğrulanmıştır. (Pavel ve diğ, 2011).

RJ'nin antioksidan aktivitesi, çeşitli kronik ve dejeneratif hastalıkların önlenmesi ve tedavisi için araştırılmaktadır (Ahmad ve diğ, 2020). Klinik çalışmalar, RJ takviyesinin, diyabetik hastaların eritrositlerinde MDA seviyeleri ve GPx ve SOD aktiviteleri yoluyla oksidatif stresi azalttığını göstermiştir (Khazaei ve diğ, 2018)., Nitrik oksit (NO) ve hücre içi reaktif oksidatif türlerin azaltılmasıyla antioksidan etkisi doğrulanan enzimle işlenmiş RJ (ERJ), antioksidan glutasyon ve SOD seviyelerinin etkisini arttırmaktadır. Ayrıca ERJ, hem insan hem de hayvan diyetlerinde kullanılabilecek bir oksidatif ajan olma potansiyeline sahiptir (Gu ve diğ, 2018).

Larva transferinden 24 saat sonra toplanan RJ'nin en güçlü antioksidatif etkiye sahip olduğu gösterilmiştir (Pavel ve diğ, 2011). RJ'nin bal arısında, doğal enzimler tarafından arı polenininden sindirilmesinden sonra üretildiği ve tüm polen fenolik bileşiklerinin RJ'de de bulunduğu dikkate alındığında, RJ'nin antioksidan aktivitesinin

fenolik bileşikler, proteinler ve peptidlerle ilişkili olduğu sonucuna varılabilir (Maqsoudlou ve diğ, 2019).

Üç hafta boyunca kontamine fumonisin (FB) (200 mg/kg) ve RJ (150mg /kg) ile beslenen Sprague-Dawley sıçanlarının beslenmesinde kullanılan RJ'nin, glutatyon peroksidaz oluşumunu iyileştirerek ve lipid peroksidasyonu ve serbest radikal oluşumu etkilerini azaltarak FB'nin zararlı etkisini azalttığı görülmüştür. RJ ayrıca farelerde kadmiyum kaynaklı genotoksisite ve oksidatif stresi, glutatyon (GSH) yoluyla antioksidan durumunu iyileştirerek ve malondialdehit (MDA) üretimini azaltarak engellemektedir (Çavuşoğlu ve diğ, 2009). Cisplatin ve karbon tetraklorüre maruz kalan sıçanlara RJ uygulandığında, MDA üretimini azaltarak ve süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT), glutatyon redüktaz (GR) ve glutatyon peroksidaz (GPx) gibi hücresel antioksidan enzimlerin konsantrasyonunu artırarak karaciğer ve böbrek dokularında oksidatif strese karşı direnç gösterdiği bildirilmiştir (Khazaei ve diğ, 2018). Ayrıca, Sprague-Dawley sıçanlarının radyasyonla indüklenen akciğer ve karaciğer hasarında, RJ'nin radyasyon öncesi ve sonrası uygulanması, oksidatif stresi azaltmada ve antioksidan özellikleri artırmada etkili olduğu belirtilmiştir (Khazaei ve diğ, 2018). Nabas ve diğ. (2014) RJ'nin karaciğer ve böbreklerde oksidatif stresi ve apoptozu modüle ettiğini bildirmişlerdir. Bir başka çalışmada ise RJ'nin fumonisin kaynaklı oksidatif stresi azalttığı ve yüksek bir antioksidan ve serbest radikal temizleme kapasite kimyasal ajanların toksik etkilerini azalttığı gösterilmiştir (Maghsoudlou ve diğ, 2019). Pavel ve diğ. (2014), RJ proteininden türetilen peptitlerin antioksidan aktivite sergilediğini belirtmiştir (Maghsoudlou ve diğ, 2019). Jamnik ve diğ. (2012), hücrede RJ'nin antioksidan etkisini araştırmak için model organizma olarak mayayı kullanmış ve hücre içi oksidasyonu ölçmüş, hücre içi enerjiyi belirlemiş ve maya hücre ekstraktının protein profilini analiz etmişlerdir. Sonuçlar, RJ'nin hücre içi oksidasyonu konsantrasyona bağımlı bir şekilde azalttığına ek olarak, büyüme ve hücre enerjisi metabolik aktivitesini büyüme fazına bağlı bir şekilde etkilediğini göstermiştir. Protein profili analizi ise hücredeki RJ'nin reaktif oksijen türlerinin temizleyicisi olarak davrandığını göstermiştir. Başka bir çalışmada ise süperoksit ve DPPH (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil) radikal ve demir indirgeme gücünün süpürme yeteneklerini ölçerek RJ'nin antioksidatif etkisi incelenmiştir. Bu çalışmanın sonucuna göre, RJ yüksek antioksidan aktivite gösterdiği bildirilmiştir (Jamnik ve diğ, 2012). Silici ve diğ. (2010), RJ'nin farelerde DNA'yı oksidatif hasardan koruduğunu ve aynı

zamanda böbrek ve serumdaki oksidatif stres belirteç seviyelerini (8-hidroksi-2-deoksiguanozin) konsantrasyona bağlı olarak düşürdüğünü bildirmiştir.

Yara iyileşmesi önemli bir sağlık sorunudur ve çok çeşitli *in vivo* ve *in vitro* çalışmalar, RJ'nin önemli bir rol oynadığını göstermektedir (El-Gayar ve diğ, 2016). RJ, yara iyileştirme aktivitesini artırmaktadır. Hem *in vivo* hem de *in vitro* yara iyileştirme modellerinde, RJ'nin etkisi altında, insan fibroblastları kollajen salgısını ve oluşumunu azaltarak göç edebilmiş ve sfingolipid seviyelerini artırmıştır. Böylelikle RJ, pul pul dökülmüş deri lezyonlarının iyileşme süresini kısaltmıştır (Pasupuleti ve diğ, 2017). Bazı raporlar, RJ'nin, granülasyon dokusunda eksüdasyonu ve kolajen oluşumunu ve streptozotosin ile indüklenen diyabetik sıçanlarda artırılmış yara iyileşmesini azaltarak bir anti-enflamatuar etkiye sahip olduğunu göstermiştir (Khazaei ve diğ, 2018).

Pikril klorür ile muamele edilmiş NC/Nga farede atopik dermatit benzeri deri lezyonlarının gelişimi, RJ ile muameleden sonra azalmaktadır. Bu, antijene özgü interferon-gama (IFN-) üretiminin aşağı-regülasyonu ve NO sentazının yukarı regülasyonu ile elde edilmektedir (Taniguchi ve diğ, 2003). Yapılan bir çalışmada, farklı RJ konsantrasyonlarına sahip merhemlerin, 5-florourasil kaynaklı hasarı konsantrasyona bağlı bir şekilde ve önemli ölçüde iyileştirdiği gösterilmiştir (Pavel ve diğ, 2011); bu, RJ'nin topikal uygulamasının kemoterapi ile indüklenen şiddetli oral mukozit üzerinde iyileştirici bir etkiye sahip olabileceğini düşündürmektedir (Suemaru ve diğ, 2008).

İmmünomodülatör yanıt, antikor oluşumunun aktivasyonu veya beyaz kan hücresi aktivitelerinin inhibisyonu yoluyla alerji, kanser ve inflamasyonda önemli bir rol oynamaktadır (Ahmad ve diğ, 2020). Çeşitli *in vitro* ve *in vivo* deneylerle, RJ ve bileşenlerinin bağışıklık sistemi üzerindeki destek etkileri araştırılmış ve kanıtlanmıştır. RJ, bağışıklık sisteminin enfeksiyonlarla savaşmasına yardımcı olan amino ve gama globülin, doymamış yağ asitleri, hormonlar, enzimler, proteinler, E ve A vitamini içermektedir (Pavel ve diğ, 2011).

Çocuklarda sistemik lupus eritematozus (SLE) ile ilgili ilk insan çalışması, SLE'deki RJ tedavisinin etkisinin, üç aylık uygulamadan sonra önemli bir iyileşme gösterdiğini ortaya koymaktadır (Zahran ve diğ, 2016).

RJ su özütü, biyolojik ve güçlü immünomodülatör aktiviteye sahiptir (Vucevic ve diğ, 2007). RJ'den izole edilen yağ asitlerinin (10HDA ve 3-10-dihidroksidekanoik asit),

konsantrasyona bağılı olarak farklı şekillerde sıçan dendritik hücresinde ve T hücresi eş kültürlerinde bağıışıklık tepkisini düzenlediğı bildirilmiştir (Pavel ve diğ, 2011). RJ ve 3,10-HDA'nın daha düşük su özütü konsantrasyonu, konkanavalin A'yı (Con-A) tetikleyerek T-hücresi çoğalmasını aktive etmekte ve daha yüksek bir RJ su özütü konsantrasyonu, IL-2 üretimini arttırırken kuru RJ tozu ve trans-10-HDA, IL-2 ve NO üretimini azaltarak T hücre proliferasyonunu inhibe etmektedir (Ahmad ve diğ, 2020).

RJ'nin geleneksel olarak hafızayı geliştirdiğı, yaşlılığı önlediğı, enerjiyi artırdığı, kaygıyı azalttığı ve hiperaktif denekleri sakinleştirdiğı bilinmektedir (Pavel ve diğ, 2011). RJ, nöroprotektif etkisiyle zihinsel işlevleri harekete geçirmektedir. Günlük RJ alımının bal arılarında ve sıçanlarda hafıza yeteneklerini ve öğrenme becerilerini pekiştirdiğı bildirilmiştir. Hatta bu doğal ürün, nöron büyümesini uyarmakta, hipokampal granül hücrelerinin yenilenmesini indüklemekte ve merkezi sinir sistemini oksidatif yaralanmalara karşı korumaktadır (Bălan ve diğ, 2020).

RJ ve sinir hücreleri üzerinde etkisi olan bazı bileşikleri ile ilgili çalışmalar bulunmaktadır (Pavel ve diğ, 2011). RJ'nin merkezi sinir sistemi üzerindeki potansiyel etkisi yapılan çalışmalarda beyin dokusunun hasarını ve ölüm derecesini azalttığı gösterilerek doğrulanmıştır (Ahmad ve diğ, 2020). RJ hem periferik hem de merkezi sinir sistemlerinde bir nörotransmitter olan ve somatik sinir sisteminin motor bölümünde kullanılan tek nöromodülatör olan asetilkolini büyük miktarlarda içermektedir (Pavel ve diğ, 2011). Son zamanlarda, RJ'nin her tür beyin hücresinin nöral kök hücrelerden farklılaşmasını artırdığı bildirilirken (Pavel ve diğ, 2011), RJ'nin doymamış yağ asidi özelliğı olan 10-hidroksi-trans-2-dekenoik asidin (HDEA), nöronların oluşumunu ve nöral kök hücrelerden gelen astrositleri azalttığı bildirilmiştir (Ahmad ve diğ, 2020). Ayrıca RJ, yetişkin fare beyninin hipokampüsünde nörotrofik ve nöroprotektif roller oynamıştır (Pavel ve diğ, 2011). İnsanlarda, altı ay boyunca 3 g RJ alımı glukoz toleransını, eritropoezi ve zihinsel sağlığı yükseltmiştir (Ahmad ve diğ, 2020).

RJ, özel proteinlerin, peptidlerin ve 10-HDA'nın varlığından dolayı farklı patojenlere karşı güçlü antimikrobiyal özellikler göstermektedir (Ahmad ve diğ, 2020). Tüm bu antibakteriyel bileşenlerin arıların bağıışıklık sisteminde yer aldığı varsayılmaktadır (Pavel ve diğ, 2011).

Pek çok araştırmacı, RJ'nin başlıca antibakteriyel özelliğinin, 10-HDA'nın özel on karbon yapısına atfedildiğini bildirmiştir. Ek olarak, RJ'de apisimin, apalbumin α , jelleines I, II, III ve IV ve royalaktin içeren birkaç antimikrobiyal peptid bulunmuştur (Bărnăușiu ve diğ, 2011). Antibakteriyel peptitler, hücre zarının anyonik fosfolipitleri ile etkileşime girmelerine ve onu çökertmelerine izin veren lizin, arginin ve histidin kalıntılarının varlığı nedeniyle pozitif olarak yüklenmektedir (Ahmad ve diğ, 2020). Royalisin, sistein kalıntıları arasında üç molekül içi disülfür bağına sahiptir ve farklı Gram-pozitif ve Gram-negatif bakteri türlerine karşı güçlü antibakteriyel aktivite göstermektedir (Bílikova ve diğ, 2015). Ek olarak, doğal jelleinler Gram pozitif bakterileri (*Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Paenibacillus larvae*) ve Gram negatif bakterileri (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*) inhibe edebilmektedir (Ahmad ve diğ, 2020). *In vitro* çalışmalar, RJ'den izole edilen royalaktinin metisiline dirençli *Staphylococcus aureus* dahil olmak üzere bir dizi gram pozitif ve gram negatif bakteri üzerinde etkinliğini kanıtlamaktadır (Boukraâ ve diğ, 2008).

10-HDA, Royalisin ve Jellein I, II, III gibi bu tür RJ bileşimleri, farklı mikroorganizmalara karşı antibiyotik etki göstermektedir (Moselhy ve diğ, 2013). 10-HDA'nın *Neurospora sitophila*, *Micrococcus pyogenes*, *E. coli* (Blum ve diğ, 1959), *Staphylococcus aureus*, *Streptomyces griseus* ve sınıflandırılmamış üç *Streptomyces* suşu, *Bacillus subtilis* gibi mantar ve bakterilere karşı antibiyotik etki gösterdiği bildirilmiştir (Fratini ve diğ, 2016).

Royalisin, diğer antibakteriyel peptitlere de geniş sekans homolojisi olan, fonksiyonel proteinlerden biridir. Gram negatif ve gram pozitif bakterilerin ve mantarların büyümesi üzerinde inhibe edici etkiye sahiptir (Bílikova ve diğ, 2015). Royalisin'in, *Lactobacillus helveticus*, *Clostridium*, *Corynebacterium*, *Leucnostonoc*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *E. coli*, *S. aureus*, *S. griseus* ve ayrıca, bal arısı larvalarında ölümcül bir hastalık olan Amerikan yavru çürüklüğüne neden olan bir bal arısı patojeni olan *Paenibacillus larvae* (Maghsoudlou ve diğ, 2019) türüne karşı büyüme önleyici etkisi vardır (Khazaei ve diğ, 2018). Royalisin-D'nin antimikrobiyal aktivitesi de (royalisin'in C-terminalinde fazladan on bir amino asit kalıntısı) royalisininkine benzemektedir (Fratini ve diğ, 2016).

Jellein I, II, III ve IV, RJ'deki diğer önemli antibakteriyel peptidlerdir. Jellein I, II, III, maya, Gram pozitif ve Gram negatif bakterilere karşı etkilidir (Boukraâ ve diğ, 2009). Jellenie (I – IV) arasındaki fark küçük olmasına rağmen, dizide yalnızca bir kalıntı

farklılığı vardır, bu küçük fark antibakteriyel aktiviteleri üzerinde önemli bir etkiye sahiptir. Jelleine I – III, hem Gram-pozitif hem de Gram-negatif bakterileri inhibe edebilirken, Jelleine-IV inhibisyon özelliği göstermemektedir (Fontana ve diğ, 2004). Ayrıca, fosforile edilmiş jelleinler (Jellein-II (pT) ve Jellein-II (pS), *E. coli* ve *B. subtilis*, *P. larvae* ve *E. coli* ile savaşılabilmektedir (Han ve diğ, 2014).

RJ ve nişasta karışımı, *S. aureus* ve *E. coli*'ye karşı antibiyotik etkisi gösterirken, RJ ve bal karışımı, *S. aureus*'a karşı *in vitro* kümülatif veya sinerjik etkiler ve diyabetik ayak enfeksiyonuna karşı antibiyotik etki göstermiştir (Maghsoudlou ve diğ, 2019).

Uzuvları tehdit eden diyabetik ayak enfeksiyonu olan 60 diyabet hastası üzerinde yürütülen bir çalışma, kutanöz ülserlerin ve derin doku enfeksiyonlarının RJ ve pantenol içeren merhem ile başarılı bir şekilde tedavi edilebileceğini göstermiştir (Abdelatif ve diğ, 2008).

RJ'nin östrojenik etkisi hem *in vitro* hem de *in vivo* deneylerde gösterilmiştir. Bu etkiye östrojenik reseptörler (ER) ile etkileşim aracılık etmektedir. Bir sıçan modelinde günlük RJ uygulaması, yumurtalık hormonlarını ve foliküler gelişimi desteklemiş ve doğurganlık parametrelerini iyileştirmiştir. RJ aynı zamanda oosit olgunlaşmasını, redoks durumunu ve kümülüs ooforu içindeki aktive glikoz yollarını iyileştirmiştir (Eshtiyaghi ve diğ, 2016). Bir başka çalışma, RJ uygulamasının, eksojen progesteron ile, benzer şekilde, Avassi koyunlarında gebelik oranını ve östrojenik yanıtı artırdığını göstermiştir (Husein ve Kridli, 2002).

Piyasada diyabetin zorluklarını kontrol etmek ve azaltmak için birçok ilaca erişilebilmekte, ancak hastalara en fazla terapötik faydayı ve minimum yan etkiyi sağlamak için yeni teknikler gerekmektedir. Klinik bir çalışmada, sağlıklı kişilerde RJ uygulamasından sonra serum glikoz seviyeleri önemli ölçüde azaldığı bildirilmiştir (Münstedt ve diğ, 2009). RJ takviyesi, insülin konsantrasyonunu artırarak serum glikosile edilmiş hemoglobin seviyelerinde ve açlık kan şekeri (FBG) seviyelerinde önemli düşüşler gösterdiğinden, bu durumun diyabet sonuçlarını kontrol etmeye yardımcı olabileceği düşünülmektedir (Pourmoradian ve diğ, 2014). RJ uygulaması, toplam antioksidan kapasiteyi arttırmakta ve tip-2 diyabetik hastalarda insülin direnci için homeostaz modeli değerlendirmesini azaltmaktadır (Shidfar ve diğ, 2015). Altı hafta süreyle diyabetli sıçanlara RJ verilmesi (100 mg/kg) ürik asit, üre, albümin, kreatinin ve karaciğer ve böbreğin histopatolojik varyasyonu dahil olmak üzere idrar

parametrelerini iyileştirmiştir (Ghanbari ve diğ, 2016). RJ diyabetik hastalarda serum trigliserit, düşük yoğunluklu lipoprotein, çok düşük yoğunluklu lipoprotein, yüksek yoğunluklu lipoprotein, kolesterol ve ApoA-1 düzeyini önemli ölçüde iyileştirerek glisemik durumu, oksidatif stresi ve lipid profilini artırmıştır (Okamoto ve diğ, 2003).

Luteinize edici hormon (LH) ve folikülo uyarıcı hormon (FSH), üremede rol oynayan gonadal hormonlar olup seviyeleri östrojen ve inhibin kontrolü altındadır. Ayrıca bu hormonlar doğal yaşlanma sürecine dahil olmaktadır. Genç kadınlarda, yüksek miktarda östrojen FSH'yi korur ve LH azalır (Takahashi, 2012). Menopozda, luteal gerileme ile ilişkili foliküler boyutun küçülmesi, östrojen ve inhibinin düzenli salınımını etkileyerek anormal FSH salgılanmasına yol açar. RJ'nin diyetle takviye edici olarak tüketiminin, yağ asitleri, özellikle 10-hidroksil-2-dekenoik asit içeriği nedeniyle bu süreçte çok yararlı olduğu bildirilmiştir. Bu bileşik, östrojen sentezini artırır ve düşük serum FSH ve LH seviyelerini korur. Ayrıca, 10-hidroksil-2-dekenoik asidin yaşlanmaya bağlı foliküler tükenmeyi önlemede ve hormonal regülasyonu güçlendirmede çok etkili olduğu rapor edilmiştir (Takahashi, 2012).

RJ, kraliçe bal arılarının ve diğer birkaç türün yaşam süresindeki artış ile ilişkilidir ve yaşlı sıçanlarda yaşam kalitesini iyileştirir (Pyrzanowska ve diğ, 2014). RJ ve ERJ uygulaması, *Caenorhabditis elegans*'ta yaşlanmayı ve yaşa bağlı bozukluğu geciktirme; uzun ömürlülüğü ve stres direncini geliştirme potansiyeline sahiptir (Wang ve diğ, 2015). ERJ ve enzimle muamele edilmemiş RJ (NRJ), genetik olarak heterojen erkek farelerde yaşa odaklanan motor bozukluğunu etkilemektedir. Ayrıca, yaşa bağlı varyasyonlar, ileri yaşta kas lifi boyutunu, kas uydu hücre belirteçlerini ve RJ ile tedavi edilen farelerde katabolik genleri etkilemektedir. Bu nedenle RJ, motor fonksiyonları düzenleyerek yaşlanma sırasında yaşam kalitesini iyileştirmek için yararlı olma potansiyeline sahiptir (Okumura ve diğ, 2018).

Araştırmacılar, RJ ile tedavinin, kollajen çapraz bağlanmasını uyardığını ve *in vitro* kollajen değiştirici enzimlerin gen ekspresyonunu artırdığını öne sürmektedir. Bu verilerden yola çıkarak, RJ, tip I kollajenin posttranslasyonel modifikasyonlarını düzenleyerek kemik kalitesini iyileştirdiği bilinmektedir (Kaku ve diğ, 2014).

RJ, JNK-AP-1 ve p38 sinyal yollarının inhibisyonu yoluyla matris metaloproteinaz (MMP) aktivitesini baskılayarak kolajen üretimini artırır ve dönüştürücü büyüme faktörü-b1 (TGF-b1) üretimini inhibe eder (Yang ve diğ, 2010). Önemli yan etkilere

sahip olmayan RJ ile tedavi edilen yumurtalık ameliyatı kaynaklı östrojen eksikliği olan sıçanlarda, artan kolajen üretimi yoluyla cilt yaşlanmasına karşı koruyucu etki tespit edilmiştir (Koya-Miyata ve diğ, 2004).

1.1.2 Kestane balı

Bal, nektarı bitkilerden veya yaprak bitlerinin (*Rhynchota* cinsine ait bitki emici böcekler) salgılarından toplayan *Apis* cinsinden arılar tarafından üretilir. Besin değeri yüksek, şekerlere aşırı doymuş, tatlı ve lezzetli doğal bir üründür (Miguel ve diğ, 2017).

Şekerlerin yanı sıra balda mineraller, polifenoller, vitaminler, karotenoidler, amino asitler, proteinler, enzimler (glikoz oksidaz ve katalaz), organik asitler ve uçucu bileşikler gibi diğer küçük bileşenler bulunur. Oligosakkaritlerle ilişkilendirilen prebiyotik etkilere ek olarak, balın bildirilen biyolojik özelliklerinin (örn. antioksidan, antibakteriyel, antiviral, antiinflamatuvar, ülser önleyici, immünomodüle edici, vazodilatif, hipotansif, antihiperkolesterolemik, antibrowning, dezenfektan ve antitümör) ve uygulamalarının çoğu, bu küçük bileşenlere atfedilebilir. Bununla birlikte, her balın özel bileşimi, büyük ölçüde çiçek kaynağına, coğrafi bölgeye ve mevsime ve ayrıca hasattan sonra gerçekleştirilen işleme bağlıdır (Viuda-Martos ve diğ, 2008).

Dünyanın dördüncü en büyük bal üreten ülkesi olan Türkiye; iklim, topografik yapı ve bitki florasının zenginliği gibi bal üretimi için uygun koşulların ender bir karışımına sahiptir. 2006 yılında Türkiye'nin yıllık bal üretimi 80.000 ton olarak bildirilmiştir. Türkiye çok çeşitli monofloral (kestane, çam, ormangülü, akasya, kekik, astragalus, turunçgiller ve güneş çiçekleri) ve heterofloral ballar üretmektedir (Kolaylı ve diğ, 2008).

Kestane balı gibi bal örneklerinde polen konsantrasyonları %90 ve üzerinde olduğunda monofloral bal olarak tanımlanmaktadır (Alkan, 2020). Monofloral ballar arasında kestane (*Castanea sativa* L.) daha koyu bir renge sahiptir. Her yıl yaklaşık 1000-ton kestane balı üretilmektedir. Astım, solunum hastalıkları ve kanser için iyi bir etno-çare olduğuna inanılmaktadır (Küçük ve diğ, 2007).

Kestane balı (Chestnut Honey, CH), arıların kestane ağacının belirli bir döneminde bu ağacın çiçeklerinden topladıkları özlerden elde edilen bir bal türüdür (Rodríguez-

Flores ve diğ, 2016). CH koyu renkli, güçlü bir tada, belirgin, yoğun aromaya sahiptir ve ağızda acı bir tat bırakır (Alissandrakis ve diğ, 2011).

Kestane ağaçlarının çiçek açmaya başladığı haziran ayında yoğun çalışan arılar sayesinde elde edebilen bu bal, birçok çiçek balından daha az üretilbildiği için daha değerli ballar arasında kabul edilmektedir (Alkan, 2020). Ayrıca bal üretiminde kestanenin önemi, bitkinin bol nektar salgılamasının Avrupa'nın en iyi nektar ve polen üreticilerinden biri olmasından kaynaklanmaktadır (Oddo ve diğ, 2004).

1.1.2.1. Kestane balının kimyasal bileşimi

Bal arısı balı, fruktoz ve glikoz (%80–85), su (%15–17), kül (%0,2), proteinler ve amino asitler (%0,1-0,4) ve eser miktarda enzim, vitamin ve fenolik bileşikler gibi diğer maddeler dahil olmak üzere çeşitli moleküller içeren yapışkan bir çözeltidir (Rao ve diğ, 2016).

Balın bileşimi, arının nektarı tükettiği bitki türlerine bağlı olarak değişir. Ancak, dünyadaki hemen hemen tüm ballar, kafeik, elajik, ferulik ve p-kumarik asitler dahil olmak üzere benzer tipte fenolik asitler; apigenin, chrysin, galangin, hesperetin, kaempferol, pinocembrin ve quercetin gibi flavonoidler ve tokoferoller; askorbik asit, süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT) ve indirgenmiş glutatyon (GSH) gibi antioksidanlar içermektedir (Rao ve diğ, 2016). Ek olarak içeriğinde, askorbik asit (Vitamin C), tiamin (Vitamin B1), pantotenik asit (Vitamin B5), riboflavin (Vitamin B2), nikotinik asit (Vitamin B3), piridoksin (Vitamin B6), biotin (Vitamin B8)), folik asit (Vitamin B9) ve siyanocobalamin (Vitamin B12) dahil olmak üzere çeşitli vitaminler mevcuttur (Ciulu ve diğ, 2011).

Kestane balının uçucu fraksiyonunu ilk kez 1986 yılında araştırılmış (Bonaga ve diğ, 1986) ve çiçek kaynağına özgü olarak 3-aminoasetofenon tanımlanmıştır. Sonraki çalışmalar, işaretleyici bileşikler olarak asetofenon, 2-aminoasetofenon ve 1-fenletnanolün varlığını ortaya çıkarmıştır (Guyot ve diğ, 1998). Başka bir çalışmada diğer bir aminoasetofenon izomeri olan 4-aminoasetofenonun kestane balının özelliği olduğu bildirilmiştir (Jerković ve diğ, 2007). Asetofenon ve 2-aminoasetofenonun önemli bir aroma indeksi vardır (Bonvehí ve Ventura-Coll 2003) ve bu nedenle kestane balının tadına katkıda bulunmaktadır. Ayrıca, furan türevlerinin kestane balında daha yüksek miktarlarda mevcut olduğu görülmektedir (Radovic ve diğ, 2001).

Balın biyolojik olarak aktif özelliklerinin büyük çoğunluğu, matrisindeki ikincil metabolitlerden kaynaklanır. Fenolik içerik bakımından zengin olduğu bildirilen kestane balındaki biyoaktif bileşikler ile balın unifloral özelliği arasındaki ilişki yapılan çalışmalarda kanıtlanmıştır. Bu çalışmalara göre kestane balının fenolik bileşiklerinin büyük çoğunluğu, yoğunlaştırılmış tanenlerden elde edilmiştir. Tanenler, çok sayıda antosiyanin benzeri molekülden oluşan fenolik polimerlerdir (Shrivastava, 2011). Kestane balındaki toplam tanen veya yoğunlaştırılmış flavonoidleri ortaya çıkarmak için fenolik bileşikler asit hidrolizine maruz bırakılarak analiz edilmiştir. Kestane ballarının fenolik profilinde HPLC'de on üç fenolik bileşen tanımlanmıştır. Luteon ve siringik asit haricinde, p-OH benzoik, kumarik asit, protokatekuik asit ve kafeik asit, test edilen maddeler arasında başlıca fenolik bileşikler olarak tanımlanmıştır (Kolaylı ve diğ, 2016).

Genel olarak, açık çiçek balları, bal özü, kestane veya funda gibi koyu ballardan daha düşük bir mineral içeriğine sahiptir. Bu anlamda kestane balında özellikle K, P, Mg ve Ca mineral içeriği diğer çiçek ballarına göre daha yüksek kabul edilmektedir (Kropf ve diğ, 2010).

Kestane balının protokatekuik, p-OH benzoik asit (Can ve diğ, 2015) ve potasyum açısından zengin olduğu bildirilmiştir. Potasyumdan sonra en bol bulunan elementler kalsiyum ve magnezyumdur (Kolaylı ve diğ, 2016).

1.1.2.2 Kestane balının biyolojik aktivitesi

Saf kestane balı koruyucu ve tamamlayıcı bir tür olduğu için apiterapik potansiyeli yüksektir. Düzenli bal tüketimi, inflamatuvar hasarı azaltmaya ve insan savunma sistemlerini güçlendirmeye katkıda bulunabilir (Kolaylı ve diğ, 2016).

Kestane balının yüksek fenolik içeriği ve flavonoidleri nedeniyle özellikle yüksek biyolojik aktiviteye sahip olduğu bildirilmiştir (Alissandrakis ve diğ, 2011). Yapılan çalışmalar, kestane balı bileşenlerinin *in vitro* anti-tümöral, antioksidan, antimikrobiyal ve antiinflamatuvar aktivitelerini gösterirken (Kunčič ve diğ, 2012); *in vivo* ve *in vitro* çalışmalar, kestane balının hepatoprotektif, antiülserojenik ve monoaminoksidaz inhibe edici etkiler gibi birçok aktif biyolojik özelliğe sahip olduğunu göstermiştir (Nasuti ve diğ, 2006).

Tatlı kestane balları için yüksek antioksidan potansiyeli birçok araştırmacı tarafından bildirilmiştir (Rodríguez-Flores ve diğ, 2016). Sarıkaya ve diğerleri (2009), kestane propolis ve kestane ballarının, antioksidatif aktivitesinin bir sonucu olarak insanları zararlı oksidatif süreçlerden koruyabileceğini belirtmiştir. Bu bal türü, İspanya'da üretilen en yüksek antioksidan aktiviteye sahip unifloral ballara dahil edilmektedir. Galiçya ballarının botanik köken, toplam fenol ve flavonoid içeriği ve antioksidan aktivitesi arasındaki ilişki detaylı olarak Escuredo ve diğ. (2013) tarafından analiz edilmiştir. Okaliptüs veya böğürtlen balı gibi diğer bal türleriyle karşılaştırıldığında kestane ballarının en yüksek antioksidan kapasiteye sahip monofloral ballar olduğu sonucuna varmışlardır (Rodríguez-Flores ve diğ, 2016).

Kolaylı ve diğ. (2008) Türkiye'den seçilmiş 3 bal türünün (kestane, Bayburt ve Anzer) antioksidan ve antimikrobiyal aktivitelerini araştırmıştır. Bu çalışma sonucunda incelenen balların yüksek polifenol seviyelerine sahip olduğu ve yüksek antioksidan aktivite sergilediği görülmüştür. Antimikrobiyal aktivite testleri, tüm bal örneklerinin *K. pneumonia*, *H. pylori* ve *S. aureus*'u orta derecede inhibe ettiğini göstermiştir. Anzer ve kestane balları, üç bakteriye karşı daha yüksek antimikrobiyal aktivite göstermiştir. İki mayaya (*C. Albicans* ve *C. tropicalis*) karşı antimikrobiyal aktivite gözlenmemiştir. Bal örneklerinin iyi bir antioksidan kaynağı olduğu ve diyetle iyi bir antioksidan kaynağı olabilecek antimikrobiyal ajanlar olduğu kanıtlanmıştır. Bu balların çeşitli hastalıklara karşı savaşmak için ve ayrıca yara, gastrit ve ülser tedavisinde de kullanılabileceği bildirilmiştir.

Kestane balının sıçan modelinin yanık yaraları üzerindeki iyileştirme potansiyelini incelemek için yapılan bir çalışmada sıçanlarda oluşturulan topikal yanık yaralara tuzlu su, topikal bal sargısı veya gümüş sülfadiazin bandajları uygulanmıştır. Bir grup fareye de bal şerbeti (içecek olarak, bal-su çözeltisi) verilmiştir. Topikal bal pansumanı ile tedavi edilen ve bal şerbeti ile beslenen sıçanlardaki, yanık yarasının en hızlı, etkili ve tam iyileşme gösterdiği sonucuna ulaşılmıştır (Meteoğlu ve diğ, 2015).

Yıldız ve diğ. (2013) kestane arısı poleninin karbon tetraklorür (CCl₄) kaynaklı karaciğer hasarına karşı hepatoprotektif etkilerini araştırmıştır. CCl₄, hücresel ve organ hasarlarının lipid peroksidasyonuna neden olan serbest radikallerin oluşumunu artıran hepatotoksik bir ajandır. Yapılan çalışma sonucunda kestane poleninin önemli besinler içerdiği ve yüksek antioksidan özelliklerin faktörleri olan birçok fenolik bileşiğe sahip olduğu ortaya çıkmıştır. Kestane poleninin, hepatositlerin CCl₄ maruziyetinin neden

olduğu oksidatif stres ve toksisiteden korunmasında oldukça faydalı biyolojik faaliyetler sergilediği gösterilmiştir. Ayrıca, kestane polenin, oksidatif stresin inhibisyonunu artıracak bir gıda katkı maddesi olarak günlük insan diyetine güvenle dahil edilebileceği ve hepatoselüler patolojilerin tedavisinde silibine alternatif olarak kullanılabileceği bildirilmiştir.

Kynurenine yolağı deregülasyonunun, bağışıklık sistemi antikanser aktivitesinin değiştirilmesi yoluyla kanserin ilerlemesine yol açabileceğini gösteren çalışmalar vardır (Adams ve diğ, 2012). Kynurenin yolunun son metaboliti olan KYNA, farklı hücre türleri tarafından endojen olarak üretilmektedir (Turski ve diğ, 2013) ve nöroprotektif ve antikonvülzan özellikler gibi biyolojik rolü olduğuna dair çalışmalar bulunmaktadır (Adams ve diğ, 2012).

Kynurenine yolu tatlı kestane balının (*Castanea sativa* L.) çiçek kökenli sağlam bir belirteci olarak kabul edilmiştir. Kestane balı, tüm gıda türleri ve diğer tüm bal türleri arasında, son derece iştah açıcı bal arısı besleme kaynakları *C. sativa* nektarı ve poleninden kaynaklanan, bilinen en yüksek KYNA içeriğine sahiptir. (Beretta ve diğ, 2021)

Beretta ve diğ. (2021) genellikle kestane balında kombinasyon halinde bulunan alkaloidlerden triptofandan türetilmiş endojen metabolit olan kynurenik asidin (KYNA) ve 3-2 ' pyrrolonidinyl-kynurenik asidin (3-PKA-L) laktam formunun *in vitro* inhibitör özelliklerini Kastrasyona Dirençli Prostat Kanseri Hücre Hattı (CRPC) üzerinde incelemiştir. Bu çalışma sonucunda ilk kez CRPC hücrelerinde 3-PKA-L'nin rolü gösterilmiştir. Bu molekül, KYNA ile karşılaştırıldığında, insan CRPC hücrelerine karşı güçlü bir sitotoksik aktivite göstermiştir. 3-PKA-L, antikanser etkilerini, CRPC hücrelerinin apoptozunu teşvik ederek, özellikle de ekstrinsik yolun proteininin düzenlenmesi yoluyla uygulamıştır.

Kolaylı ve diğ. (2016) kestane ballarının antiinflamatuvar kapasitelerini belirlemek amacıyla, hyaluronidaz ve üreaz enzim inhibisyon testleri yapmıştır. Bu çalışma sonucuna göre kestane balının üreazı 12 ila 34 mg/mL inhibisyon konsantrasyonlarında (IC_{50}); hyaluronidazı değişen IC_{50} değerlerinde (76 ila 129 mg/mL) inhibe etmiştir. Bu inhibisyon değerlerinin balın unifloral karakteri ile ilişkili olduğu bildirilmiştir.

3 farklı balın (kestane, heterofloral ve ormangülü balı) biyolojik aktivitelerini belirlemek için yapılan çalışmada, balların süperoksit radikali ve peroksinitrit temizleme aktiviteleri testi sonucuna göre kestane balı sulu özütünün, diğer iki bal ile karşılaştırıldığında en yüksek süperoksit süpürme aktivitesini sergilediği bildirilmiştir. Tüm bal türleri için ölçülen indirgeme gücü sonucunda örnekler arasında en yüksek aktiviteyi kestane balının gösterdiği bildirilmiştir (kestane balı> heterofloral bal> ormangülü balı) (Küçük ve diğ, 2007).

E. coli ve *P. aeruginosa* fajlarının ve kestane balının tek başına ve kombine etkisi, *in vitro* (polistiren) ve *ex vivo* (domuz derisi) modeller kullanılarak ve bu bakterilerin tek ve çift tür biyofilmlerine karşı test edilmiştir. Genel olarak, birleşik faj-bal formülasyonları, muhtemelen balın bakteri hücre zarına zarar verme kapasitesinden ve ayrıca biyofilm matriksine nüfuz etme, sonraki faj enfeksiyonunu teşvik etme ve artırma kabiliyetine bağlı olarak daha yüksek etkinliklere neden olduğunu bildirilmiştir (Oliveira ve diğ, 2018).

Atalay ve diğ. (2019) kestane balı (CH) ve RJ'nin alkali yanık sonrası kornea iyileşmesi üzerindeki potansiyel rolünü araştırmıştır. Wistar sıçanlarının kornealarında NaOH ile oluşturulan alkali yanıklar RJ ve CH grupları için %1; RJ-CH tedavi grubu için %0.05 RJ ve %0.05 CH içeren bir solüsyon ile kontrol grubu için de %0.15 Na-HA (Eyestil™, SIFI S.p.A.) göz damlası ile günde 4 kez muamele edilmiştir. Sonuçlar CH-RJ ile tedavi edilen grupta, tekrarlanan ölçümlerde iyileştirilmiş kornea iyileşme skorları ve $\alpha 4\beta 1$ integrin boyama özellikleri açısından daha iyi tedavi yöntemi olabileceğini göstermiştir.

Literatür araştırmaları sonucu arı sütü (RJ) ve kestane balının (CH) yüksek biyolojik özelliklere sahip olduğu anlaşılmaktadır. Bursa Teknik Üniversitesi'nde yürütülmekte olan bir projede arı sütü; yürütülen bir tezde ise kestane balı çalışılmaktadır. Literatürde bu iki ürünün karışım halinde kullanılmasıyla ilgili çalışma bulunmamaktadır. Bu tez çalışmasında arı sütü kestane balı karışımının Folin-Cioaltea yöntemi ile toplam fenolik içeriğinin ve FRAP ve ABTS testleri ile antioksidan aktivitesi belirlendikten sonra Gram pozitif, Gram negatif bakteriler, maya ve küfler üzerindeki antimikrobiyal aktivitesinin; sağlıklı insan akciğer epitelyal hücre hattı (BEAS-2B) ve akciğer kanseri hücre hattı (A549) üzerinde nötral kırmızısı alım (NKA), 3-(4,5-dimetiltiyazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür (MTT) ve tek hücre

jel elektroforezi (Comet) testleri kullanılarak sitotoksik, genotoksik ve antigenotoksik aktivitelerinin test edilmesi amaçlanmıştır.



2. MATERYAL VE METOT

2.1 Materyaller

2.1.1 Arı Sütü ve Kestane Balı

Arı sütü ve kestane balı Dikbiyık Arı Ürünleri (Bursa) şirketinden 2020 sezonuna ait ürün taze temin edilmiştir. Soğuk zincir koşullarında laboratuvara getirilmiş olan arı sütü, analizlerin başlama süresine kadar -20°C’de; bal ise oda sıcaklığında muhafaza edilmiştir. Ürün görselleri Şekil 2.1’de verilmiştir.



Şekil 2.1 : Dikbiyık Arı Ürünleri (Bursa) şirketinden temin edilen arı sütü ve kestane balı.

2.1.2 Deneylerde kullanılan kimyasal maddeler

Deneylerde kullanılan kimyasal maddeler; RPMI-1640 (Sigma), Tripsin-EDTA (Gibco), Fetal Sığır Serum (FBS) (Sigma), Penisilin/Streptomisin (Sigma), Phosphate Buffer Saline (PBS) (Sigma), Nötral Kırmızı (Sigma), Asetik Asit (Glasiyel, %99) (Sigma), (Merck), Dimetil sulfoksit (DMSO) (Merck), Etil Alkol (Etanol) (Sigma), Dulbecco’s Fosfat Tamponlu Serum Fizyolojik (Gibco), , Tripan Mavisi (Sigma), Sodyum Hidroksit (NaOH) (Merck), Sodyum Klorür (NaCl) (Merck), 3-(4,5-Dimetiltiyazol-2-il)- 2,5- difeniltetrazolyum bromür (Sigma), Low Melting agar, 2,2',2'',2'''-(Ethane-1,2-diylidinitrilo)tetraacetic acid (EDTA), Hidrojen Peroksit, Triton-X-100, Etidyum bromür, N-Lauroylsarcosinat, Nutrient Broth ve Agar (NB ve

NA) (Oxoid), Sabouraud Dekstroz Broth ve Agar (SDB ve SDA) (Oxoid), Mueller-Hinton sıvı besiyeri (MHB) (Oxoid), Tween-80 (Oxoid), Folin (Merck), Na₂CO₃ (Emsure), Gallik Asit (Roth), Trolox, ABTS, K₂S₂O₈, Asetat, Fe₂SO₄.7H₂O, FeCl₃, HCl, TPTZ, Metanol'dür.

2.1.3 Deneylerde Kullanılan Araç ve Gereçler

Deneylerde kullanılan araç ve gereçler; Karbondioksit (CO₂) İnkübatörü (Panasonic), Distile Su Cihazı (Merck), Derin Dondurucu (-20°C) (Arçelik), Hassas Terazı (UniBloc), Lam (26x76 mm) (Marienfield), 96 Kuyucuklu Plaklar (SPL), Manyetik Karıştırıcı (BioCote), Mikropipet (100-1000µl) (Eppendorf), Buzdolabı (Arçelik, Beko), Mikropipet (30-300 µl 8 kanallı) (Eppendorf), Derin Dondurucu (-80°C) (Arctico), Inverted Mikroskop (Olympus), Mikropipet (20-200µl) (Eppendorf), Mikrosantrifüj (Beckman Coulter,), Otoklav (Hirayama), pH metre (Mettler Toledo), Mikroskop (upright) (Zeiss), Steril membran filtre (0,22µ) (Isolab), Pipet tabancası (Thermo), Steril enjektör (2 ve 10 ml'lik) (Set Inject), Santrifüj (Onilab), Spektrofotometre (BioTek), Steril Kabin (Telstar), Yatay Hücre Kültürü Şişesi (75cm²) (Isolab), Sayım lamı-Thoma lamı (Isolab), Steril pipetler (10 ve 25ml) (SPL), Steril tüp (12 ml, kırmızı kapaklı) (Cellstar), Steril Tüpler (50 ml) (Isolab), Mikroplaka okuyucu (Epoch, BioTek Instruments, Inc.) Steril Santrifüj Tüpleri (15 ml) (Isolab), Su Banyosu (Nuve, VWR), Yatay Çalkalayıcı (Daihan), Terazı (Radwag), Vorteks (BioCote), Drigalski öze, Petri kapları (Isolab)'dır.

2.1.4 Kullanılan hücre hatları

Sitotoksosite çalışmalarında BEAS-2B sağlıklı insan akciğer normal epitel hücre hattı ve A549 akciğer kanser hücre hattı kullanılarak Nötral Kırmızı Alım (NKA) ve 3-(4,5-Dimetiltiyazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür (MTT) testleri yapılmıştır. Hücreler Bursa Uludağ Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü Genetik Toksikoloji Laboratuvarı sorumluları Prof. Dr. Nilüfer Çinkılıç ve Prof. Dr. Tolga Çavaş tarafından Bursa Teknik Üniversitesi Biyomühendislik bölümündeki çalışmalar için kültür koleksiyonlarından hediye olarak verilmiştir. Bu hücreler bir süre steril şartlarda çoğaltıldıktan sonra kryotüpler içerisinde dondurularak -80°C'de saklanmıştır.

2.1.5 Test mikroorganizmaları

Çalışmada kullanılan mikroorganizmalar, Bursa Teknik Üniversitesi, Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı, mikrobiyoloji laboratuvarı kültür koleksiyonundan sağlanmıştır. Araştırmada, Gram (+) bakterilerden *Bacillus cereus* DSM 4312, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Staphylococcus epidermis* ATCC 12228, *Listeria monocytogenes* ATCC 7644 ve Gram (-) bakterilerden *Escherichia coli* O157:H7 NTCC 12900, *Salmonella Typhimurium* ATCC 14028, *Escherichia coli* ATCC 35218 ve *Klebsilla pneumonie* ATCC 700603 kullanılmıştır. Ayrıca antifungal aktivitenin belirlenmesinde; test mayaları olarak *Candida albicans* ATCC 10351 ve *Candida parapsilosis* ATCC 22019 ve test küfleri olarak *Aspergillus flavus* ve *Penicillum italicum* kullanılmıştır. Kullanılan mikroorganizmalar Çizelge 2.1’de verilmiştir.

Çizelge 2.1 : Test Mikroorganizmaları.

Bakteri		Maya-Küf
Gram (+)	Gram (-)	
<i>Bacillus cereus</i> DSM 4312	<i>Escherichia coli</i> O157:H7 NCTC 12900	<i>Candida albicans</i> ATCC 10351
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	<i>Salmonella Typhimurium</i> ATCC 14028	<i>Candida parapsilosis</i> ATCC 22019
<i>Staphylococcus epidermis</i> ATCC 12228	<i>E. coli</i> ATCC 25922	<i>Aspergillus flavus</i>
<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 7644	<i>Klebsilla pneumonie</i> ATCC 700603	<i>Penicillum digitatum</i>

2.2 Metot

2.2.1 Polen Analizi

İlk olarak temin edilen balın kestane poleni yüzdesi belirlenerek, monofloral kestane balı olduğu kanıtlanmıştır.

Kestane balının polen analizi için Louveaux ve diğ. (1978) tarafından geliştirilen ve Avrupa Birliği Enstitüleri tarafından ortak metod olarak kabul edilen yöntem kullanılmıştır.

Buna göre steril bir çubukla karıştırılarak homojen hale getirilen baldan 10 g alınarak tüp içerisinde eklenmiş ve üzerine eklenen 20 ml saf su içerisinde çözülmüştür. Oluşan çözeltiye *Lycopodium* sporu içeren tablet atılmış ve çözünmesi için içine manyetik karıştırıcı atılan tüp, ısıtıcılı karıştırıcı üzerine koyulmuştur. Tablet tamamen çözündükten sonra oluşan çözelti 3500 rpm'de 30 dk santrifüj edilmiştir. Supernatant kısmı döküldükten sonra tüp, kurutma kağıdı üzerine ters çevrilerek kurumaya bırakılmıştır. Kuruyan tüp içine 0,1 ml %50'lik gliserin ve çok az miktarda bazik fuksin ilave edilerek çözeltinin homojen şekilde karışması sağlanmıştır. Oluşan karışımdan lam üzerine 0,01 ml alınıp lamel ile kapatıldıktan sonra mikroskop altında incelenmiştir.

2.2.2 Arı Sütü ve Kestane Balı Karışımının Hazırlanması

Arı sütü ve kestane balı (RJ-CH) karışımı ağırlıkça 1:5 oranında hazırlanmıştır. Sitotoksisite ve genotoksisite testleri için bu stok karışım uygun besiyerleri ile % ağırlık/hacim (mg/mL) olarak farklı konsantrasyonlarda hazırlanmıştır. Antimikrobiyal aktivite testleri için ise bu stok karışım mikroorganizmalara uygun besiyerleri ile % hacim/hacim (mL/mL) olarak hazırlanmıştır.

2.2.3 Toplam Fenolik İçeriği ve Antioksidan Aktivite Testleri

2.2.3.1 Arı sütü-kestane balı karışım ekstresinin hazırlanması

Antioksidan aktivite testlerinde kullanılan ekstrelerin hazırlanmasında Can ve diğ. (2015) tarafından bildirilen ekstraksiyon metodu kullanılmıştır. Buna göre 1:5 oranında hazırlanan RJ-CH karışımından 5 g tartılmış ve üzerine 25 mL %80'lik metanol eklenmiştir. Elde edilen karışım, 24 saat boyunca oda sıcaklığında karıştırıcıda ekstraksiyona bırakılmıştır. Süre sonunda 3500 rpm'de 10 dk santrifüj

edilen çözelti, daha sonra filtre kağıdı kullanılarak süzölmüştür. Süzöntü toplam fenolik miktarı ve antioksidan aktivite belirleme testlerinde kullanılmıştır.

2.2.3.2 Toplam Fenolik İçeriğı (TPC)

RJ-CH metanol ekstresinin toplam fenolik içeriğı, Folin–Ciocalteu yöntemi (Möller ve diğ, 2010) kullanılarak belirlenmiştir. Kalibrasyon eğrisinin hazırlanması için, distile su ile seyreltme yoluyla 10-100 mg/L aralığında gallik asit standart çözelti dilüsyonları hazırlanmıştır. 20 µL RJ-CH metanol ekstresi, her standart çözelti ve blank (dH₂O), 96 kuyucuklu plakanın belirlenen kuyucuğına eklenmiştir.

Ardından her kuyucuğı 100 µL 0,2 N Folin–Ciocalteu reaktifi eklenip 5 dakika karıştırılmıştır. Kuyucuklara 75 µL %7,5'lik Na₂CO₃ (75g/L) eklendikten sonra tekrar karıştırılmış ve oda sıcaklığında karanlık ortamda 2 saat inkübasyona bırakılmıştır. Inkübasyon sonrasında plakalar 740 nm'de okutulmuştur. 10-100 µg/L konsantrasyonlarında hazırlanan gallik asit kullanılarak çizilen standart grafiğınden yararlanılarak RJ-CH karışımının toplam fenolik bileşik içeriğı gallik asit eşdeğerleri (GAE) mg/100 g olarak hesaplanmıştır.

2.2.3.3 FRAP Testi

FRAP testi ile RJ-CH metanol ekstresinin demiri indirgeyen antioksidan gücünü belirlemek için birkeç modifikasyonla Al-Duais ve diğ. (2009) metodu kullanılmıştır. Hazırlanan 1000 µmol/L stok Troloks standart çözeltisinden kalibrasyon eğrisinin hazırlanması için seyreltilerek 20-250 µmol/L aralığında dilüsyonlar hazırlanmıştır.

Asetat tampunu hazırlamak için 59,45 mg sodyum asetat 25 ml içinde çözölmüştür. Daha sonra 0,8165 mL glacial asetik asit ve 15 mL saf su eklenmiştir. 0,1 N NaOH kullanılarak çözelti pH'ı 3,6'ya ayarlandıktan sonra üzeri 50 mL'ye kadar saf su ile tamamlanmıştır.

Demir(III) klorür (FeCl₃) hazırlamada 32,4 mg FeCl₃ 10 mL su içerisinde çözdürölmüştür. 2,4,6-tri(2-piridil)-1,3,5-triazin (TPTZ) solüsyonu hazırlamak için 31,224 mg TPTZ 10 mL 40 mM HCl içerisinde çözdürölmüştür. Hazırlanan bu çözeltiilerden 10 hacim asetat tamponu, 1 hacim FeCl₃ ve 1 hacim TPTZ karıştırılarak FRAP çözeltisi hazırlanmıştır.

96 kuyucuklu plakaya 50 µL 1:2, 1:4, 1:10 ve 1:20 oranında seyreltilen RJ-CH ekstreleri, standart çözeltiler ve blank (HPLC su) eklendikten sonra üzerine 150 µL FRAP çözeltisi eklenmiştir. 37°C karanlık ortamda inkübasyona bırakılan plakalar 4. ve 30. dakikalarda 593 nm’de okutulmuştur. Elde edilen FRAP değerleri ile RJ-CH karışımının antioksidan kapasitesi µmol TE/100 g numune olarak belirlenmiştir.

2.2.3.4 ABTS Testi

ABTS testi ile RJ-CH metanol ekstresinin troloks eşdeğeri antioksidan gücünü belirlemek için Yang ve diğ. (2020) metodu uygulanmıştır. Hazırlanan 1000 µmol/L stok Troloks standart çözeltisinden kalibrasyon eğrisinin hazırlanması için seyreltilerek 20-250 µmol/L aralığında dilüsyonlar hazırlanmıştır.

ABTS+ %stok solüsyonu oluşturmak için 5 mL 7 mmol/L 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sülfonik asit (ABTS) çözeltisi ve 5 mL 2.45 mmol/L potasyum persülfat çözeltisi karıştırıldıktan sonra oda sıcaklığında 12 saat karanlıkta inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrasında absorbansı 0.70 ± 0.02 'ye (734 nm) getirmek için solüsyon 40 kat seyreltilmiştir.

96 kuyucuklu plakaya 50 µL 1:2, 1:4, 1:10 ve 1:20 oranında seyreltilen RJ-CH ekstreleri, standart çözeltiler ve blank (%50 etanol) eklendikten sonra üzerine 150 µL ABTS çözeltisi eklenmiştir. 6 dakika boyunca karanlıkta inkübasyona bırakılan plakanın 734 nm’de absorbans değerleri okutulmuştur. Elde edilen absorbans değerleri ile RJ-CH karışımının antioksidan kapasitesi µmol Troloks eşdeğeri (TE)/100 g numune olarak belirlenmiştir.

2.2.4 Antimikrobiyal aktivite testleri

2.2.4.1 Test mikroorganizmalarının hazırlanması

Çizelge 3.1’de belirtilen bakteriler için Mueller-Hinton Broth ve Agar (MHB ve MHA), mayalar için ise Sabouraud Dekstroz Broth ve Agar (SDB ve SDA) kullanılmıştır. İnokulumlar için doğrudan koloni süspansiyonu yöntemi kullanılmıştır. Bakteri, maya sırasıyla 37°C de 24 saat ve 28°C’de 48 saatlik inkübasyon sonrasında, uygun besiyeri ile 0.5 McFarland bulanıklığına ayarlanmıştır (Clinical and Laboratory Standards Institute, CLSI M07-A10, 2015; National Committee for Clinical Laboratory Standards, NCCLS M27-A2, 2002)

Balouiri ve diğ. (2016) metodu kullanılarak sayım yapmak için çalışmada yer alan küflerin, Sabouraud Dekstroz Agarda (SDA) 25°C’de 5-7gün gelişimi ile sporlanması sağlanmıştır. Küf sporlarının yüzeyden toplanması amacıyla; steril %0,1’lik Tween 80 çözeltisi (yaklaşık 5 mL) ile petri yüzeyi yıkanarak sporlar steril tüpe aktarılmıştır. 9 mL FTS (%8,5 NaCl) içerisine alındıktan sonra seri dilüsyon yapılarak yayma plak yöntemiyle SDA üzerinde ekim yapılmıştır. 72 saat inkübasyondan sonra küf sayımı yapılmış ve sonuçları Çizelge 2.2’ de verilmiştir.

Çizelge 2.2 : İnoküle edilen test küflerinin sayım sonuçları.

Küf	Kob/mL
<i>A. flavus</i>	1,5x10 ⁷
<i>P. digitatum</i>	3,4x10 ⁷

2.2.4.2 Agar kuyucuk difüzyon yöntemi

RJ-CH karışımının antimikrobiyal aktivitesi agar kuyucuk difüzyon yöntemi ile belirlenmiştir. 0.5 McFarland’a ayarlanmış olan kültürlerden 100µL inokulum, bakteriler için MHA, mayalar ise SDA besiyeri yüzeyine drigalski spatülü ile yayılmıştır.

Küf sporları 9 mL’lik FTS’de 0,4-5x 10⁶ aralığında ayarlandıktan sonra SDA yüzeyine 100 µL inokulum drigalski ile yayılmıştır. 5 mm çapındaki steril bir uç ile agar üzerine kuyucuklar açılmış ve bu kuyucuklara farklı konsantrasyonlardaki RJ-CH karışımından 30 µL ilave edilmiştir.

Bakteriler 37°C’de 24 saat, mayalar ve küfler 28°C’de 72 saat inkübasyona bırakılmıştır. Süre sonunda oluşan inhibisyon zon çapları (mm) ölçülmüştür.

2.2.4.3 Sıvı mikrodilüsyon yöntemi ile MİK – MBK/MFK değerlerinin belirlenmesi

RJ-CH karışımının Minimum İnhibitör Konsantrasyon (MİK) değerleri sıvı mikrodilüsyon yöntemiyle bakteriler için CLSI M07-A10 kılavuzuna göre, mayalar için ise NCCLS M27-A2 kılavuzuna göre belirlenmiştir. Çizelge 2.3’de belirtilen

konsantrasyonlarda hazırlanmış olan RJ-CH (1:5) karışımından kuyucuklara 180 µL aktarılmıştır.

Mikroplakada istenen final inokulum konsantrasyonu bakteriler için 5×10^5 kob/mL ve mayalar için $(0,5-2,5) \times 10^4$ kob/mL 0,5 McFarland bulanıklık standardında hazırlanan inokulumlar 1:20 oranında seyreltilmiştir ((Balouiri ve diğ, 2016).). Küf sporları için 9 mL'lik FTS'de $0,4-5 \times 10^4$ kob/mL aralığında ayarlanmıştır. Hazırlanan son inokulum konsantrasyonlarından mikroplakaya 20 µL inokulum aktarılmıştır.

Her mikroplakada bir sterilite kontrol kuyucuğu (yalnızca besiyeri, 200 µL) ve bir üreme kontrol kuyucuğu (yalnızca mikroorganizma eklenmiş besiyeri; 20µL+180µL) bulunmaktadır. Mikroplakalar bakteriler için 37°C 18-24 saat, maya ve küfler için 28°C 48-72 saat inkübasyona bırakılmıştır.

Mikroorganizma yoğunluğu 600 nm de mikropilaka okuyucu (BioTek Instruments, Inc. EPOCH SN 15062915) ile belirlenmiştir. Bulanıklık görülmeyen ve üremenin tamamen inhibe edildiği en düşük konsantrasyon MİK değeri olarak belirlenmiştir (Bilikova ve diğ, 2015). MİK değeri belirlenen kuyucuklardan alınan 20 µL kültür süspansiyonu bakteriler için MHA, mayalar ve küfler için SDA yüzeyine nokta ekim yapılmıştır. Petriler, 37°C'de 24 saat(bakteri), 28°C'de 48-72 saat (maya ve küf) inkübasyona bırakılmıştır (Moghim et al., 2015). Gelişme olmayan konsantrasyon Minimum Bakterisidal Konsantrasyon (MBK)/Minimum Fungisidal Konsantrasyon (MFK) olarak değerlendirilmiştir (Moghim ve diğ, 2015).

Çizelge 2.3 : Sıvı mikrodilüsyon yönteminde kullanılan RJ-CH karışımı konsantrasyonları.

Mikroorganizma	RJ-CH Karışımı Konsantrasyonu (mL/mL)							
Bakteri-Maya	%0,625	%1,25	%2,5	%5	%7,5	%10	%12,5	%15
Küf	%10	%20	%30	%40	%50	%60	%70	%80

2.2.5 Sitotoksosite testleri

Sitotoksosite çalışmalarında BEAS-2B sağlıklı insan akciğer normal epitel hücre hattı ve A549 akciğer kanser hücre hattı kullanılarak Nötral Kırmızı Alım (NKA) ve 3-(4,5-Dimetiltiyazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür (MTT) testleri yapılmıştır.

2.2.5.1 NKA ve MTT testinde kullanılan çözeltiler

Hücre kültür ortamı hazırlamak için 500 mL RPMI 1640 besiyerine 50 mL (%10) fetal sığır serumu (FBS) ve 5 mL (%1) penisilin/streptomisin eklenmiş ve hazırlanan besi ortamı +4°C’de saklanmıştır.

Nötral kırmızı (NK) stok çözeltisi, 20 mg NK boyasının 5 mL bazal besi yeri içerisinde çözdürülmesiyle hazırlanmıştır. Su banyosunda çalkalanarak çözünmesi sağlandıktan sonra alüminyum folyoya sarılarak +4°C’de saklanmıştır.

Nötral kırmızı (NK) standart çözeltisi için deney gününden bir gün önce 50 mL bazal besi yeri içerisine 625 µL NK stok çözeltisi eklenmiştir. Membran filtreden geçirilen çözelti, 37°C’de 24 saat boyunca inkübe edilmiştir.

Fiksasyon (sabitlenme) çözeltisi, 98 mL distile su, 2 mL asetik asit ve 100 mL etil alkol karıştırılarak hazırlanmış ve +4°C’de saklanmıştır.

3-(4,5-Dimetiltiyazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür (MTT) çözeltisi, 1 mL Dulbecco’s Fosfat Tamponlu Serum Fizyolojik içerisinde 5 mg MTT çözdürülmesiyle hazırlanmıştır. Hazırlanan çözelti karanlık ortamda membran filtreden süzülerek ışık geçirmeyen, steril bir tüpe içerisinde ışıktan korunarak, 4°C’de saklanmıştır.

2.2.5.2 Nötral kırmızı alım (NKA) yöntemi

Hücreler çalışmaya başlanmadan önce 37°C’ye getirilmiş olan su banyosunda 1-2 dakika bekletilerek oda sıcaklığına getirilmiştir.

1 mL hücre ve 9 mL besiyeri steril bir tüp içerisinde karıştırılmış ve 400 g’de 10 dakika santrifüjleme yapılarak süpernatant kısmı atılmıştır. Bu aşamada yıkama yapılarak saklama ortamındaki RPMI uzaklaştırılması sağlanmıştır.

Hücre pelleti, hacimce %90 RPMI, %10 fetal sığır serumu (fetal bovine serum, FBS), %1 penisilin-streptomisin çözeltisi içeren besiyeri ile karıştırılarak yatay kültür kapları içerisine aktarılmıştır.

Hücreler, %5 CO₂ ve %95 nem içeren 37°C’deki inkübatör içerisinde kültür edilerek steril ortamda çoğalması sağlanmıştır.

Yatay kültür kaplarındaki hücreler, 2-3 günlük süre içerisinde inverted mikroskopta doygunluğu ve kontaminasyon durumu açısından kontrol edilmiştir.

Zemine tutunarak tüm kültür ortamını kapladıkları ve %70 doygunluğa ulaştıkları gözlemlenen hücrelerden besiyeri uzaklaştırılmıştır. Besiyeri uzaklaştırıldıktan sonra, hücreler 10 ml PBS ile yıkanmış ve 3 ml Tripsin-EDTA çözeltisi eklenerek 3 dakika boyunca inkübatörde bekletilmiştir.

Tripsin muamelesi ile zeminden ayrılarak süspansiyon haline gelmesi sağlanan hücrelerin üzerine 3 ml %10 FBS içeren besiyeri eklenerek Tripsin inaktivasyonu sağlanmıştır. Süspansiyon hale gelen hücreler steril bir tüp içerisinde alınmıştır.

Yatay kültür kabı 5 ml PBS ile yıkanarak içerisinde kalan hücreler de toplanarak tüp içerisine eklenmiştir. Tüp içinde toplanan hücre süspansiyonu 400 g'de 10 dakika boyunca santrifüj edilmiştir.

Steril kabin içerisinde süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra dipte toplanan hücre pelleti 2 ml besiyeri ile dikkatli bir şekilde karıştırılmıştır. Hücre süspansiyonundan 200 µL alınarak ependorf tüpe aktarılmış ve üzerine 200 µL tripan mavisi çözeltisi (%0,4) eklenerek iyice karıştırılmıştır.

Lamel, hücre sayım lamı (Thoma lamı) üzerine yerleştirilmiş ve yaklaşık 10 µL hücre süspansiyonu kapiler etki sayesinde doldurulmuştur. Thoma lamında sayılan hücreler 200 µl 10⁴ hücre/kuyucuk olacak şekilde çoklu pipet yardımıyla 96 kuyucuklu plakalara ekim yapılmıştır.

96 kuyucuklu plaka inkübatöre kaldırılarak hücrelerin kuyucuklar içinde tutunarak çoğalmaları için 24 saat beklenmiştir. 24 saat inkübasyon sonrasında steril şartlarda besiyeri uzaklaştırılmıştır.

RJ-CH karışımının farklı konsantrasyonlarını içeren besiyeri ortamları, negatif kontrol için normal besiyeri ortamı ve pozitif kontrol için %1 TritonX-100 içeren besiyeri ile muamele edilen hücreler 24 saat boyunca 37°C'de inkübasyona bırakılmıştır.

Bir sonraki gün çalışma sırasında kullanılacak olan nötral kırmızı çözeltisi (50 mL besiyeri+625 µL Nötral kırmızı stok çözeltisi) hazırlanarak 37°C'de inkübasyona bırakılmıştır. 24 saat sonra plaka içindeki besiyerleri boşaltılmıştır.

Bir gün önce hazırlanmış olan nötral kırmızı çözeltisinden her bir kuyucuğa 200 µL eklenmiş ve 3 saat daha 37°C'de inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrasında nötral kırmızı boyası ortamdan uzaklaştırılarak tüm kuyucuklar 2-3 defa PBS ile yıkanmıştır. Yıkanan plakalar süzgeç kağıdına vurularak kurutulmuştur.

Tüm hücrelere 200 µL fiksasyon çözeltisi (%50 metil alkol, %1 glasiyel asetik asit ve %49 distile su) eklenmiş ve plaka çalkalayıcı üzerinde 20 dakika boyunca çalkalanmıştır. Hücrelerin optik yoğunlukları 540 nm dalga boyunda plaka okuyucuda okutulmuştur. Bu çalışmanın tüm aşamaları nötral kırmızı boyası ışıkta bozulduğu için, mümkün olduğunca karanlıkta yapılmıştır.

2.2.5.3 3-(4,5-Dimetiltiyazol-2-il)- 2,5-difeniltetrazolyum bromür (MTT) yöntemi

Hücreler, NKA testinde anlatıldığı şekilde çoğaltılmıştır.

MTT analizi için 10^4 hücre/kuyucuk olacak şekilde 96 kuyucuklu kültür kaplarına ekilen hücreler, 24 saat boyunca inkübe edilerek kuyucuklar içerisine tutunmaları sağlanmıştır.

Ertesi gün besiyeri uzaklaştırılarak arı sütü ve kestane balı karışımının farklı konsantrasyonlarını içeren besiyeri ortamı, pozitif ve negatif kontrol besiyeri ortamları 200 µL/kuyucuk olacak şekilde hücreler üzerine eklenmiştir.

24 saat inkübasyondan sonra besiyerleri uzaklaştırılmış ve her bir kuyucuğa 100 µL besiyeri ve aynı gün hazırlanan MTT çözeltisinden 10 µL eklenmiştir.

37°C’de %5 CO₂ ve %95 nem içeren inkübatör içerisinde 4 saat inkübasyona bırakılan hücrelerden süre sonunda MTT çözeltisi uzaklaştırılmıştır.

Her kuyucuğa 100 µL DMSO eklenerek oluşması beklenen formazan kristallerinin çözünmesi sağlanmıştır. Yatay çalkalayıcıya 10 dakika çalkalanan plaka, 570 nm dalga boyunda plaka okuyucuda okutulmuştur.

Tüm deneyler her iki hücre hattı için de farklı zamanlarda 3 kez tekrarlanmış ve elde edilen sonuçların ortalama değerleri hesaplanmıştır.

2.2.6 Genotoksisite ve Antigenotoksisite Testleri

2.2.6.1 Comet testinde kullanılan çözeltiler

Stok lizing çözeltisi için 146,1 g NaCl, 37,2 g EDTA, 1,2 g Tris, 10 g NaOH ve 500 ml distile su ile karıştırılmıştır. Hazırlanan çözeltinin pH’ı 10’a ayarlandıktan sonra içerisine eklenen 10 g N-Lauroylsarcosinat çözündükten sonra distile su eklenerek toplam hacim 900 ml olarak ayarlanmıştır. Hazırlanan çözelti +4°C’de saklanmıştır.

Lizing çözeltisi için 5,5 mL Tryton-x-100, 55 ml DMSO ve 489,5 mL stok lizing çözeltisi karıştırılmış ve 4°C’de saklanmıştır.

Elektroforez çözeltisi için deney günü 18 mL NaOH (10 N), 3 mL EDTA (10mM) ve 579 ml soğuk distile su karıştırılmış ve 4°C’de saklanmıştır.

Nötralizasyon çözeltisi, 48,5 g Tris ve 750 mL distile su karıştırılmış ve pH değeri 7,5 olarak ayarlandıktan sonra toplam hacim 1000 mL olana kadar distile su ilave edilmiştir. Hazırlanan çözelti oda sıcaklığında saklanmıştır.

2.2.6.2 Tek hücre jel elektroforez (COMET) yöntemi

BEAS-2B ve A549 hücreleri , NKA testinde anlatıldığı şekilde çoğaltılmıştır.

Thoma lamında sayılan hücreler, besi yeri içerisinde süspanse edilerek her bir kuyucuğa 1 mL (100000 hücre/kuyucuk) olacak şekilde 6 kuyucuklu plakaya ekimi yapılmıştır.

Kuyucuklara (10^5) ekilen hücreler 37°C’de, %5 CO₂ ve %95 nem içeren inkübatörde 24 saat boyunca inkübasyona bırakılmıştır.

İnkübasyondan sonra arı sütü ve kestane balı karışımının farklı konsantrasyonlarını içeren besiyeri ortamı, pozitif ve negatif kontrol besiyeri ortamları 1 mL/kuyucuk olacak şekilde hücreler üzerine eklenmiştir.

Hücre süspansiyonları incelenen bileşiklerin çözeltileriyle 37°C’de, %5 CO₂ ve %95 nem içeren inkübatörde 24 saat boyunca inkübasyona bırakılmıştır.

Maddelerle inkübasyonu takiben hücreler 1 mL PBS ile iki defa yıkanmış ve her bir kuyucuğa 400 µl tripsin-EDTA çözeltisi ilave edilerek hücrelerin kuyucuk tabanından ayrılması için 3 dakika boyunca inkübatörde bekletilmiştir.

Süre sonunda 600 µL besi yeri kuyucuklara ilave edilerek tripsininin inaktivasyonu sağlanmıştır.

1000 µL hücre süspansiyonu eppendorf tüplere alınarak mikrosantrifüjde 2000 rpm’de 5 dakika süreyle santrifüj edildikten sonra süpernatant kısmı atılmıştır.

1 mL PBS ile süspanse edilen hücrelerden 10 µL bir eppendorf tüpe aktararak üzerine 10 µL tripan mavisi çözeltisi eklenmiş ve iyice karıştırılmıştır.

Thoma sayım lamı üzerine lamel kapatılarak yaklaşık 10 µL hücre süspansiyonu tripan mavisi karışımı sayım lamına yüklenmiştir.

Işık mikroskobu altında, sayım lamını oluşturan karelerin kenar çizgileri hariç üzerlerindeki parlak ve renksiz olan yaşayan hücreler soldan sağa ve yukarıdan aşağıya gidilerek sayılarak yaşayan hücrelerin sayısı hesaplanmıştır.

Sayılan BEAS-2B ve A549 hücreleri, genotoksisite grupları için her bir lamda 10.000-20.000 arasında hücre olacak şekilde hesaplanarak $37^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ 'de eritilmiş olan %65'lik LMPA çözeltisinden 100 μL alınarak 100 μL hücre süspansiyonu ile karıştırılmıştır.

Antigenotoksisite grupları için ise ayrı bir eppendorf tüpünde 850 μL PBS üzerine 100 μL hücre ve en son 50 μL H_2O_2 ilave edilerek 5 dk süre ile $+4^{\circ}\text{C}$ buzdolabında bekletilmiştir.

3000 rpm'de 5 dk süre ile santrifüj edildikten sonra 850 μL süpernant atılmış ve dipte kalan 150 μL hücre 50 μL %65'lik LMA ile karıştırılmıştır.

Önceden %1'lik NMPA çözeltisine daldırılıp agar ile kaplanmış olan lamlara yayılan hücre karışımı üzerine lamel kapatılmıştır.

10-15 dakika boyunca buzlu yüzey üzerinde bekletilen lamlar üzerinde bulunan lameller, agarın katılaşmasının ardından zedelenmeden alınmıştır.

Lamlar daha önceden hazırlanıp buzdolabında bekletilen soğuk lizis çözeltisi içinde 1,5 saat buzdolabında bekletilmiştir.

Lizis işleminin ardından lamlar elektroforez tankının içine yerleştirilmiştir. Önceden hazırlanıp buzdolabında bekletilmiş olan elektroforez çözeltisi tank içerisine doldurulmuştur.

Lamlar akım uygulamadan önce elektroforez küvetinin içerisinde 20 dakika bekletilmiştir.

Ardından 21 V ve 600 mA akım altında 20 dakika elektroforez uygulanmıştır.

Elektroforez işlemi sonunda lamlar 15 dakika boyunca nötralizasyon tampon çözeltisinde bekletilmiştir.

Nötralizasyondan sonra 5 dakika distile suda bekletilen lamlar sırasıyla 5'er dakika %50'lik, %75'lik ve %99'luk etanol çözeltisinde tutulmuş ve mikroskopik analizler öncesinde kurumaları için en az 1 gün bekletilmiştir.

Mikroskobik analizler sırasında lamaların üzerine 60 µL 20 µg/mL etidiyum bromür çözeltisi ilave edilmiştir.

Floresan mikroskobu altında her lamda sayılan 100 hücre, bilgisayar programı yardımıyla DNA hasar derecesi kuyruk uzunluğu, kuyruk yoğunluğu ve kuyruk momenti olarak değerlendirilmiştir.

Tüm bu işlemler ek bir DNA hasarını önlemek amacıyla karanlık ortamda yapılmış ve çalışmalar 3 kez tekrarlanmıştır.



3. BULGULAR VE TARTIŞMA

3.1 Polen Analizi sonuçları

Melissopalinojik inceleme sonuçlarına göre 10 gr baldaki Toplam Polen Sayısı (TPS) 250375 olarak belirlenmiştir. Bu polenlerin ait olduğu taksonlar ve miktarı (%) Çizelge 3.1’de gösterilmiştir.

Çizelge 3.1 : Kestane balında tespit edilen polenlerin ait olduğu taksonlar ve miktarı(%).

Tespit Edilen Polenlerin Ait Olduğu Taksonlar	Miktar (%)
<i>Amaranthaceae</i>	0,32
<i>Brassicaceae</i>	0,24
<i>Castanea sativa</i>	91,38
<i>Cichoridae</i>	1,34
<i>Cistus</i>	0,63
<i>Erica</i>	0,4
<i>Paliurus spina-christii</i>	2,77
<i>Papaveraceae</i>	0,16
<i>Plantago</i>	0,47
<i>Poaceae</i>	0,95
<i>Rosaceae</i>	1,19
<i>Tilia</i>	0,55

Louveaux ve ark. (1978) göre baldaki toplam oranı %45’in üzerinde olan polenlere dominant, %15-45 arasında olan polenlere sekonder, %3-15 arasında olan polenlere minör, %3’den az olan polenlere ise eser polenler adı verilmekte olup balların polen içeriklerinin değerlendirilmesinde bu oranlar kullanılmaktadır.

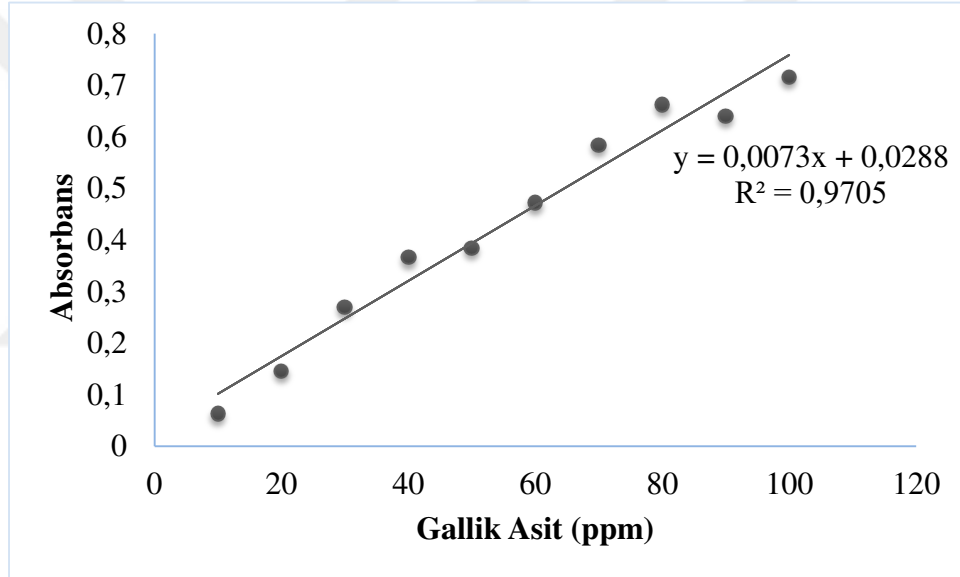
Yapılan melissopalinojik inceleme sonuçlarına göre çalışmada kullanılan balın %91,38 oranında kestane (*Castanea sativa*) poleni içerdiği ve unifloral kestane balı olduğu tespit edilmiştir.

3.2 Toplam Fenolik İçeriği ve Antioksidan Aktivite Testlerinin Değerlendirilmesi

RH-CH karışımının yapılan testler sonucunda toplam fenolik içeriği ve antioksidan aktivitesi belirlenmiş ve çizelge 3.2’ de gösterilmiştir.

Çizelge 3.2: RJ-CH karışımının toplam fenolik içeriği ve antioksidan aktivite değerleri.

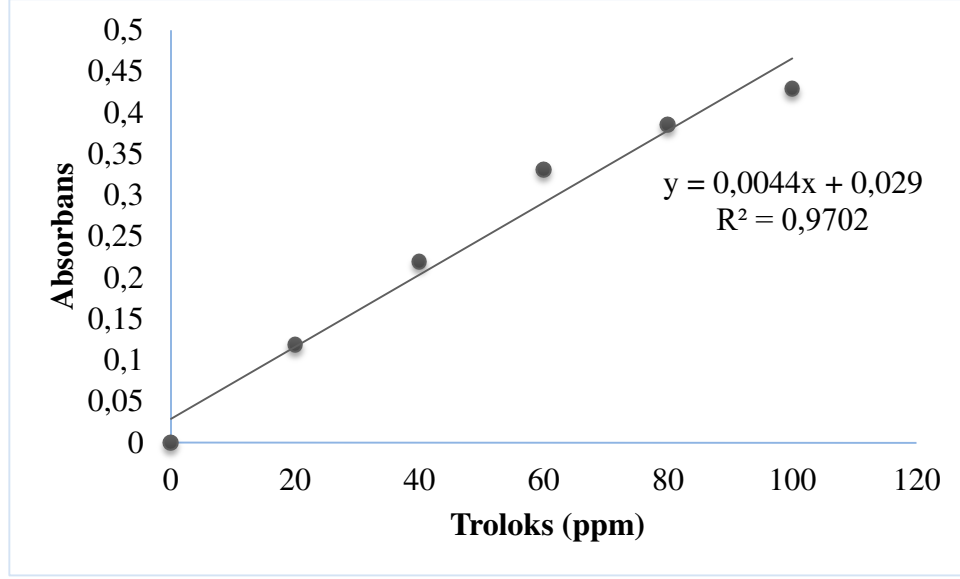
Yapılan test	Değer
TPC	74±3,86 mg GAE/100 g
FRAP	381,9±23,55 µM TE/100 g
ABTS	506±4,38 µM TE/100 g



Şekil 3.1: Gallik asit standart grafiği.

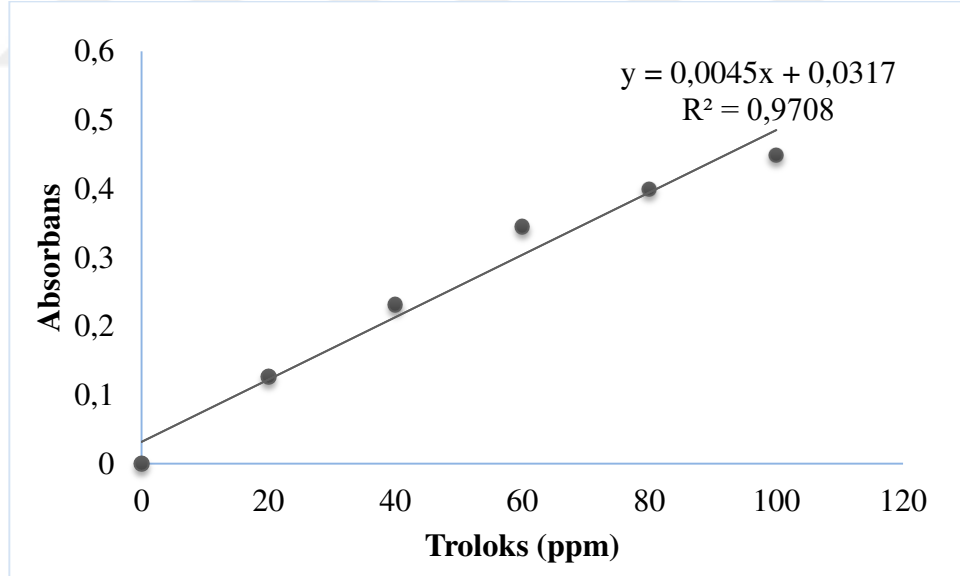
RH-CH karışımının toplam fenolik miktarını belirlemek için kullanılan Folin-Ciocalteu yöntemine göre standart olarak kullanılan gallik asit (GA) konsantrasyonlarının absorbansa karşı çizilen grafiği Şekil 3.1’te gösterilmiştir. Bu grafikten elde edilen doğrusal denklemden yararlanılarak RJ-CH karışımının toplam fenolik miktarı $73,73 \pm 3,86$ mg GAE/100 g RJ-CH olarak belirlenmiştir.

Karışımın antioksidan aktivitesini belirlemek için indirgeyici antioksidan gücü belirleyen FRAP testi yapılmıştır. Standart olarak Troloks kullanılmış ve Şekil 3.2’te verilen kalibrasyon eğrisi kullanılarak karışımın FRAP değeri $381,9 \pm 23,55$ µM TE/100 g olarak hesaplanmıştır.



Şekil 3.2: Troloks standart grafiği (FRAP).

ABTS testi ile RH-CH karışımının troloks eşdeğeri (TE) antioksidan kapasitesi belirlenmiştir. Şekil 3.3'te gösterilen Troloks absorbans değerlerinin kalibrasyon grafiği kullanılarak yapılan hesaplamalar sonucunda karışımın antioksidan kapasitesinin $506 \pm 4,38 \mu\text{M TE}/100 \text{ g}$ olduğu görülmüştür.



Şekil 3.3 : Troloks standart grafiği (ABTS).

Literatürde arı sütü ve kestane balının karışım halinde toplam fenolik içeriğini ve antioksidan kapasitesini belirlemeye yönelik çalışmalar bulunmayıp; ürünlerin ayrı ayrı kullanıldığı çalışmalar bulunmaktadır.

Özkök ve diğ. (2017) yaptıkları çalışmada, bal arısı ürünleri (bal, polen, RJ ve propolis) ve bunların karışımlarından oluşan 70 örneğin toplam fenolik içeriğini (TPC) belirlemiştir. Folin-Ciocalteu yöntemine göre kestane balının 3570.78 ± 38.58 mg GAE/100 g ile en yüksek TPC değerine sahip olduğu; karışımlarda ise en düşük değer ise RJ-multifloral bal kombinasyonlarında olduğu görülmüştür.

Doğu Karadeniz Bölgesi'nin farklı illerinden toplanan çiçek ve kestane ballarının toplam fenolik ve antioksidan aktivitesini belirlemek için yapılan çalışmada kestane balının çiçek balına göre daha yüksek antioksidan aktiviteye sahip olduğu bulunmuştur. Toplam fenolik miktarı en yüksek 57.18 ± 5.43 mg GAE/g ile Artvin bölgesinden alınan kestane balında belirlenmiştir. FRAP testine göre ise en yüksek antioksidan aktivite 49.92 ± 1.33 μ mol FeSO₄ /g sample ile Artvin bölgesinden temin edilen diğer bir kestane balı örneğinde tespit edilmiştir (Özlem Saral, 2018).

Giresun ve Ordu ilinden temin edilen 10 farklı kestane balının toplam fenolik içeriği ve antioksidan kapasitesini belirlemek için yapılan bir çalışmada toplam fenolik içeriği 19.222-146.804 mg GAE/100 g arasında olduğunu belirlemiştir. FRAP antioksidan değerlerinin 9.8-89.3 μ mol FeSO₄.7H₂O/100 g aralığında; ABTS SC₅₀ değerlerinin ise 0.10-0.43 mg/mL aralığında olduğu yine aynı çalışmada tespit edilmiştir (Karaçelik ve Şahin, 2018).

Koca ve diğ. (2018) Türkiye'nin 25 farklı ilinden topladıkları kestane balı örneklerinin antioksidan aktivitesini belirlemeye yönelik çalışmalar yapmıştır. Yapılan testler sonucunda bal örneklerinin toplam fenolik miktarının 332.56-114.61 mg GAE/kg; antioksidan aktivitelerinin ise FRAP ve DPPH testlerine göre sırasıyla 8.83-62.88 mmol Fe⁺²/g ve 5.71-74.97 mmol/g arasında olduğu bildirilmiştir.

Kestane, Bayburt ve anzer balı kullanılarak yapılan bir çalışma sonucunda 430 ± 68 mg GAE/g ile en yüksek TPC değerinin kestane balında olduğunu görmüştür. Aynı çalışmada kestane balının FRAP değeri 90 ± 4 , DPPH (SC₅₀) değeri ise 66 ± 17 mg/g olarak bulunmuştur (Kolaylı ve diğ, 2008).

Bulgaristan'ın farklı bölgelerinden temin edilen ve marketten alınan RJ örneklerinin toplam fenolik miktarı ve antioksidan aktivitesini belirlemek için çalışma yapılmıştır. Analiz edilen RJ numunelerinin toplam polifenol içeriklerinin 11.66–36.73 mg GAE/g RJ aralığında değiştiği ve ortalama TPC değerinin 19.54 mg GAE/g olarak rapor edilmiştir. Antioksidan aktiviteyi belirlemek için yapılan FRAP testi sonuçlarının

0.44–8.49 mM Fe⁺/g aralığında; DPPH testinin ise 10.17 – 39.39 (% inhibisyon) aralığından olduğu bildirilmiştir (Balkanska ve diğ, 2017).

Fas, Portekiz ve İspanya'da elde edilen 6 adet arı sütü numunesi ile yapılan çalışmada toplam fenol içeriğinin 3-9 mg GAE/g RJ olduğunu bildirmiştir. ABTS ve DPPH antioksidan aktivite IC₅₀ değerlerinin ise sırasıyla 2-15,7 mg/ml ve 0,2-11,7 mg/mL aralığında olduğu görülmüştür (El-Guendouz ve diğ, 2020).

Tayland'dan temin edilen 6 arı sütü örneğinin toplam fenolik miktarı ve antioksidan aktivitesini belirlemek için çalışmalar yapılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre, örneklerin toplam fenolik içeriğinin 1.39±0.35 to 1.65±0.34 mg GAE/g RJ arasında; antioksidan aktivitesinin ise ABTS testine göre 0.93±0.05 ile 1.08±0.28 mg TEAC/g RJ ve IC₅₀ değerlerinin 218.88±10.07-289.60±19.07 mg/ml aralığında olduğu bildirilmiştir (Uthaibutra ve diğ, 2020).

Bayram ve diğ. (2021) Türkiye ve yurt dışından temin ettikleri farklı arı sütü örnekleri ile yaptığı çalışmalar sonucunda arı sütü numunelerinin toplam fenolik içeriğinin 1.86 ± 0.03 - 3.12 ± 0.02 mg GAE/g aralığında olduğu görmüştür. CUPRAC antioksidan aktivite testine göre ise arı sütü örneklerinin yüksek antioksidan aktivite (3,81±0,06 - 5,21 ± 0,02 mg TE/g) sergilediği belirlenmiştir.

3.3 Arı Sütü-Kestane Balı Karışımının Antimikrobiyal Aktivitesinin Değerlendirilmesi

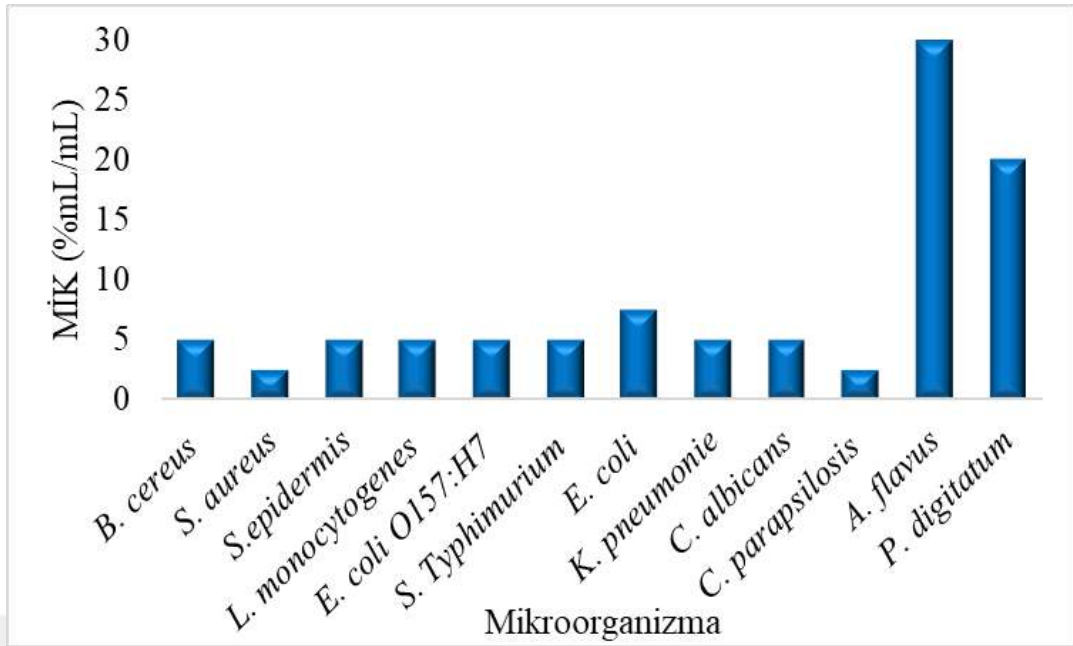
Bu çalışmada Bursa bölgesinden temin edilen arı sütü ve kestane balının antimikrobiyal etkinliği bakteri, maya ve küf mikroorganizmaları üzerinde denenmiştir. 1:5 (mg/mg) oranında karıştırılan RJ-CH karışımının agar kuyucuk difüzyon yöntemi ile zon çapları ölçülerek mikroorganizmalar dirençli, orta derece duyarlı ve duyarlı olarak tanımlanırken, sıvı mikrodilüsyon yöntemi ile MİK ve MBK/MFK değerleri belirlenmiştir.

Çizelge 3.3'te arı sütü-kestane balı karışımından elde edilen MİK ve MBK/MFK sonuçları verilmiştir. *S. epidermis*'in ve *L. monocytogenes*'in %5 (mL/mL) ile en düşük MBK değeri ile RJ-CH karışımına en duyarlı bakteriler olduğu saptanmıştır. Ayrıca ikinci sırada *K. pneumonie*'nin bunu takip ettiği (%7,5 mL/mL) belirlenmiştir. RJ-CH karışımının test mikroorganizmaları üzerinde belirlenmiş MİK değerleri grafiği Şekil 3.7'de, MBK/MFK değerleri grafiği ise Şekil 3.8'de verilmiştir.

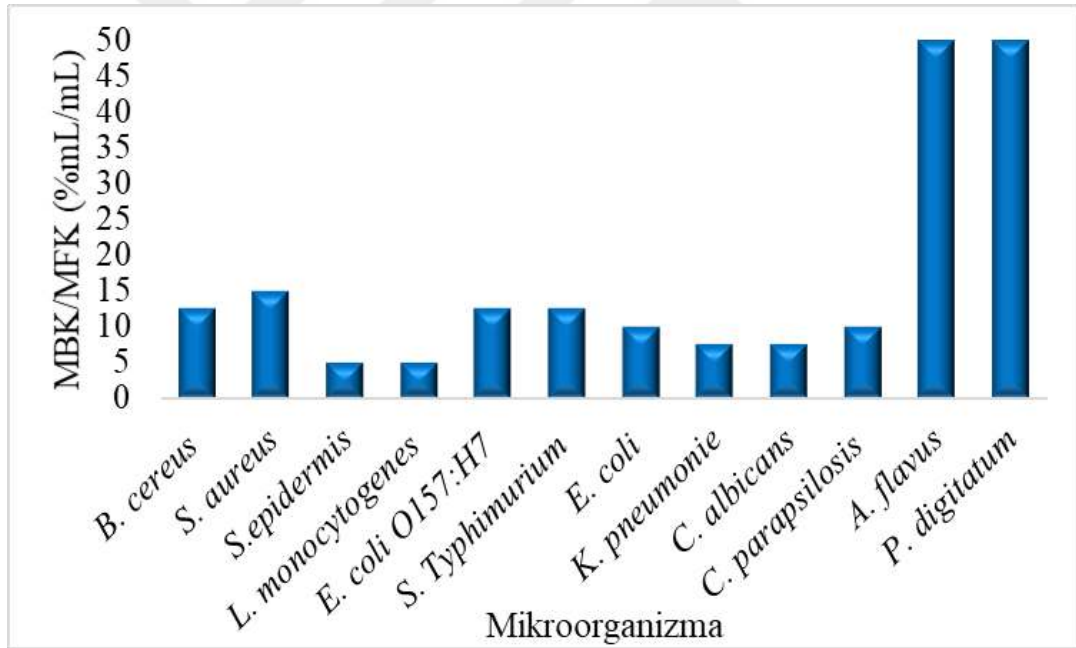
Çizelge 3.3 ve grafikler incelendiğinde MBK/MFK değerlerinin genel olarak MİK değerlerinden yüksek olduğu görülmüştür. Gram (+) *S. epidermis* ve *L. monocytogenes* bakterilerinin MİK ve MBK değerlerinin eşit (%5 mL/mL) olduğu tespit edilmiştir. Aynı şekilde Gram (-) bakterilerden *E.coli* O157:H7 ve *K. pneumonie*'nin %5(mL/mL) ile aynı MİK değerine sahip oldukları belirlenmiştir. MİK ve MBK değerlerindeki en büyük farklılık sırasıyla %2,5 ve %15 ile *S. aureus*'ta saptanmıştır. MBK değeri test edilen en yüksek konsantrasyonda (%15) görülmüştür. Bu durum *S. aureus*'un karışıma karşı en dirençli bakteri olduğunu göstermiştir.

Çizelge 3.3 : RJ-CH karışımının test mikroorganizmaları üzerinde belirlenmiş MİK ve MBK/MFK değerleri (% mL/mL).

Bakteri	MİK	MBK
<i>Bacillus cereus</i> DSM 4312	5	12,5
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	2,5	15
<i>Staphylococcus epidermis</i> ATCC 12228	5	5
<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 7644	5	5
<i>Escherichia coli</i> O157:H7 NCTC 12900	5	12,5
<i>Salmonella Typhimurium</i> ATCC 14028	5	12,5
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	7,5	10
<i>Klebsilla pneumonie</i> ATCC 700603	5	7,5
Maya-Küf	MİK	MFK
<i>Candida albicans</i> ATCC 10351	5	7,5
<i>Candida parapsilosis</i> ATCC 22019	2,5	10
<i>Aspergillus flavus</i>	30	50
<i>Penicillium digitatum</i>	20	50



Şekil 3.4 : RJ-CH karışımının test mikroorganizmaları üzerinde belirlenmiş MİK değerleri.



Şekil 3.5 : RJ-CH karışımının test mikroorganizmaları üzerinde belirlenmiş MBK/MFK değerleri.

MFK değerleri incelendiğinde; test edilen küf türlerinin mayalardan çok daha yüksek ve eşit (%50) MFK değerine sahip olduğu görülmüştür. Ayrıca en düşük MFK değerinin *C. albicans* üzerinde (%7,5) kaydedildiği tespit edilmiştir (Çizelge 3.4).

Ronsisvalle ve diğ. (2019) Etna'nın (Sicilya) farklı yerlerinde bulunan iki farklı üreticiden aldıkları *Castanea sativa* Miller (kestane) ballarının *E. coli* ATCC 25922,

Pseudomonas aeruginosa ATCC 27853, *Enterococcus faecalis* ATCC 29211 ve *S. aureus* ATCC 29213 bakterilerine karşı inhibisyon aktivitesini araştırmışlardır. Her iki bal örneği de tüm mikroorganizmalara karşı iyi bir antibakteriyel aktivite gösterirken en düşük MİK değeri %10(mL/mL) ile *S. aureus* ATCC 29213 için elde edilmiştir. Çalışmamızda *S. aureus*’a karşı elde edilen MİK değerinin %2,5(mL/mL) ile daha düşük olduğu tespit edilmiştir. Bu durumun kestane balına arı sütü eklenmesinin karışımının *S. aureus*’a karşı antibakteriyel aktivitesini arttırdığından kaynaklandığı düşünülmektedir.

Arjantin’de iki farklı bölgeden alınan RJ numunesinin *S. aureus*, *S. epidermidis*, *Micrococcus luteus*, *Streptococcus uberis*, *Enterococcus faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *E. coli* ve *K. pneumoniae*’ye karşı antibakteriyel aktivitesi test edilmiştir. İlk RJ numunesinin, *K. pneumoniae* ve *S. uberis*’in gelişimini; ikinci RJ numunesinin, *K. pneumoniae*’nin gelişimini inhibe etmediği gözlenmiştir. İlk RJ numunesinin MİK değerleri, 3,3-10,3 mg/mL; ikinci RJ numunesinin ise 7,1-14,5 mg/mL konsantrasyon aralığında olduğu görülmüştür. MBK konsantrasyon aralıklarının ise RJ numuneleri için sırasıyla 125 ve 250 mg/mL arasında ve 63 ile 250 mg/mL arasında olduğu ve hem MİK hem de MBK değerlerinde gözlenen farklılıkların, coğrafi kökenler veya arı kolonileri arasındaki genetik değişkenlikle ilişkili olabileceği bildirilmiştir (García ve diğ., 2010). Yalnızca arı sütü kullanılarak yapılmış olan bu çalışmada MİK ve MBK değerlerinde önemli farklılıklar olduğu görülürken; bizim çalışmamızda *K. pneumoniae*’ye ait MİK ve MBK değerlerinin %5(mL/mL) ve %7,5(mL/mL) ile birbirine çok yakın olduğu belirlenmiştir. Bu durumun kestane balı karıştırılmasının, arı sütünün bakteriler üzerindeki öldürücü aktivitesini artırmasından kaynaklandığı düşünülmektedir.

Yaptığımız çalışmaya göre arı sütü-kestane balı karışımının MİK değeri *C. parapsilosis*’e karşı %2,5 iken *C. albicans*’a karşı %5 olarak tespit edilmiş olması karışımın *C. parapsilosis*’e karşı daha etkin antifungal aktiviteye sahip olduğunu göstermiştir. Diğer taraftan test edilen RJ-CH karışımın, incelenen küfler üzerinde mayalara kıyasla daha zayıf antifungal etki gösterdiği belirlenmiştir. En yüksek MİK değerine (%30) sahip mikroorganizmanın *A. flavus* olduğu, *P. digitatum*’un ise %20 MİK değeri ile ikinci sırada yer aldığı tespit edilmiştir.

Moselhy ve diğ. (2013) biri Çin ve ikisi Mısır’dan temin edilen arı sütünün antimikrobiyal aktivitelerini karşılaştırmıştır. Çin arı sütünün test edilen

konsantrasyonlarda *C. albicans*'a karşı MİK değeri tespit edilemezken; kafur ve narenciye arı sütlerinin MİK değerlerinin sırasıyla 125 ve 62,5 µg/mL olduğu tespit edilmiştir. Arı sütünün elde edildiği mevsimin ve bölgenin farklı olmasının antimikrobiyal aktivitesini etkileyeceği bildirilmiştir. Bizim çalışmamızda *C. albicans*'a karşı daha düşük MİK değeri (%5) tespit edilmesinin kestane balının *C. albicans*'a karşı daha etkin olması ve arı sütü orijininin farklı olmasının sebep olabileceği düşünülmüştür.

Farklı botanik kökenlerden alınan dört çeşit bal (portakal ve okaliptüs) ve RJ'nin ayrı ayrı ve kombine halinde yapılan çalışmada *Staphylococcus aureus* (ATCC 29523)'a karşı antibakteriyel aktivitesini değerlendirmiştir. Yapılan çalışmalar sonucunda dört bal çeşidinin MİK değeri %20 ile %21 (mL/mL) arasında değişirken ve RJ'ninki %2 (mL/mL) olarak gözlenmiştir. Birlikte kullanıldığında, tüm bal çeşitleri %1(mL/mL) RJ ile MİK değerlerinde %50'den fazla azalma olduğu bildirilmiştir. Tüm bal çeşitleri ve RJ arasında güçlü bir doğrusal etkileşim olduğu rapor edilmiştir (Boukraa ve diğ, 2008b).

Corynebacterium spp., metisiline dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA), *Pseudomonas aeruginosa*, *S. aureus* ve *S. epidermidis* gibi patojen bakterilere karşı 6 farklı RJ'nin antibakteriyel etkinliğini belirlemek için yapılan bir araştırmada agar kuyucuk difüzyon ve sıvı dilüsyon yöntemleri kullanılmıştır. Sonuç olarak; RJ'nin, *P. aeruginosa* haricindeki tüm test bakterileri üzerinde 9.33 ± 0.58 ile 21.67 ± 2.08 mm arasında inhibisyon zon çapına sahip olduğu bildirilmiştir. Ayrıca 1 ve 2 numaralı RJ örneğinin sırasıyla 18.75 ve 18.75 mg/mL MİK ve MBK değerleri ile *Corynebacterium spp.*'ye karşı en yüksek aktiviteye sahip olduğu bildirilmiştir (Uthaibutra ve diğ, 2020).

Çizelge 3.4'te RJ-CH karışımının farklı konsantrasyonlarının test mikroorganizmaları üzerinde belirlenen zon çapları verilmiştir. Sonuçlar incelendiğinde *S. aureus* üzerinde %12,5'tan itibaren; *S. Typhimurium* üzerinde ise %20'den itibaren test edilen tüm konsantrasyonlarda zon çapı gözlenmiştir. *B. cereus*, *S. epidermis*, *L. monocytogenes* ve *E.coli* üzerinde ise %35'ten itibaren zon oluşumu tespit edilmiştir. Ayrıca oluşan zon çaplarının konsantrasyon artışına paralel olarak artış gösterdiği saptanmıştır.

Çizelge 3.4 : RJ-CH karışımının test mikroorganizmaları üzerinde belirlenmiş zon çapları (mm).

Bakteri	12,5	15	17,5	20	22,5	25	27,5	30	32,5	35	37,5	40
<i>B. cereus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	9,05±0,11 ^{cC}	10,19±0,3 ^{bC}	10,52 ^{aCD}
<i>S. aureus</i>	8,79 ^d	9,07±0,37 ^c	9,36±0,07 ^c	9,83±0,6 ^{cB}	10,28±0 ^{bB}	10,43±0,22 ^{bB}	10,55±1,3 ^{bB}	10,6±1,3 ^{bB}	11,09±0,3 ^{aB}	11,09±1,02 ^{aC}	11,40±0,52 ^{aC}	12,33±0,1 ^{aC}
<i>S. epidermis</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	21,19±0,23 ^{bA}	26,12±1,9 ^{aA}	27,49±0,88 ^{aA}
<i>L. monocytogenes</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	9,06 ^{aC}	9,23 ^{aC}	9,89 ^{aD}
<i>E. coli</i> O157:H7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>S. Typhimurium</i>	-	-	-	15,49 ^{eA}	16,88±0,3 ^{dA}	16,94±0,81 ^{dA}	18,51 ^{cA}	18,66±0,34 ^{cA}	19,47±0,59 ^{bA}	19,9±0,55 ^{bAB}	20,25±0,26 ^{bB}	22,08±0,9 ^{aB}
<i>E. coli</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	7,78 ^{bD}	8,22 ^{aD}	8,25 ^{aD}
<i>K. pneumoniae</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Maya	15	20	25	30	35	40	45	50	55	60	65	70
<i>C. albicans</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>C. parapsilosis</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Küf			10	20	30	40	50	60	70	80		
<i>A. flavus</i>			-	-	5,06±0,19 ^{cC}	7,945±0,14 ^{bD}	8,31±0,23 ^b	11,17±0,51 ^a	11,22±0,43 ^a	11,857±0,51 ^a		
<i>P. digitatum</i>			-	-	-	-	-	-	-	-		

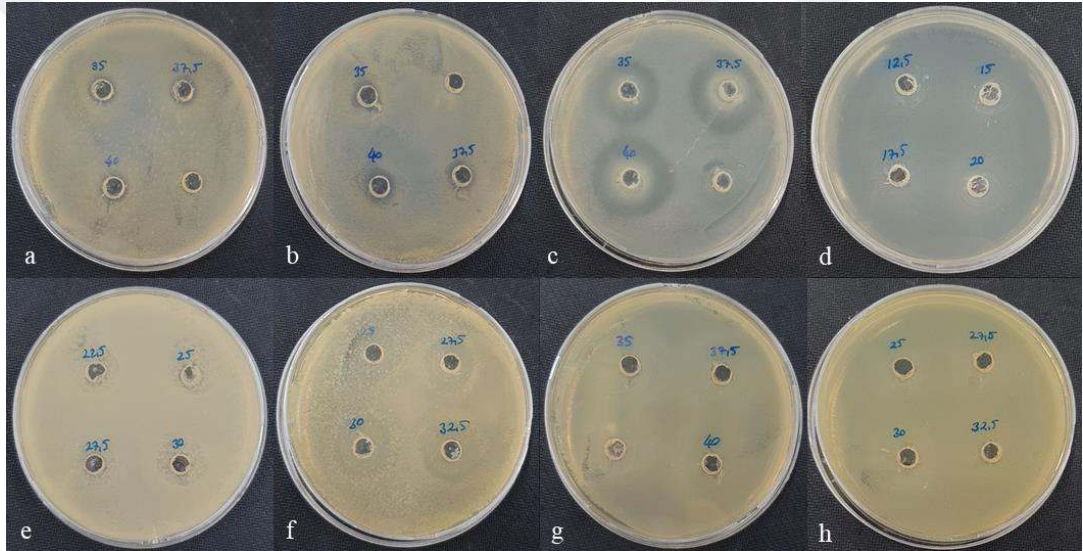
Dirençli ≤ 14, Orta derecede duyarlı 15-18, Duyarlı ≥ 19 (NCCLS, 1991).

Büyük harfler, mikroorganizmalar; küçük harfler konsantrasyonlar arası istatistiki olarak farklılığı göstermektedir (p<0,05).

(-) Zon oluşumu gözlenmedi.

Yapılan istatistiksel analiz sonucunda RJ-CH karışımının %35 ve %37,5 (ml/ml)'lik konsantrasyonunun *S. Typhimurium*, *E. coli* ve *S.epidermis* bakterileri üzerinde oluşturduğu inhibisyon zonları arasında istatistiksel olarak farklılık bulunurken ($p<0,05$); *B. cereus*, *S. aureus* ve *L. monocytogenes* üzerinde oluşturduğu inhibisyon zonları arasında ise istatistiksel olarak farklılık bulunamamıştır ($p>0,05$).

%40 konsantrasyonunda ise *S. aureus* ile *B. cereus* üzerinde RJ-CH karışımının oluşturduğu inhibisyon zonları arasında ise istatistiksel olarak farklılık bulunamamıştır ($p>0,05$). Benzer şekilde *L. monocytogenes* ile *B. cereus* arasında da oluşsan zon çapları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığı görülmüştür ($p>0,05$). Şekil 3.6'da Arı sütü-kestane balı karışımının Gram (+) ve Gram (-) üzerinde belirlenmiş inhibisyon zon çaplarının görüntüleri verilmiştir.



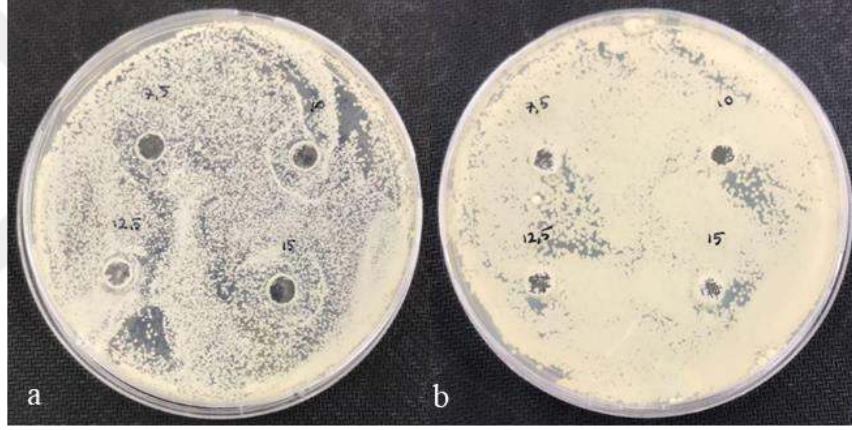
Şekil 3.6 : RJ-CH karışımının Gram (+) ve Gram (-) üzerinde belirlenmiş inhibisyon zon çapları (mm).

(a: *B. cereus*, b: *S. aureus*, c: *S. epidermis*, d: *L. monocytogenes*, e: *E. coli* O157:H7, f: *S. Typhimurium*, g: *E.coli*, h: *K. pneumoniae*)

Türkiye'nin farklı bölgelerinden toplanan otuz kestane ve yirmi altı çiçek balının *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *E.coli* ve *Candida albicans*'a karşı antimikrobiyal aktivitelerini araştırılmıştır. Araştırma sonucunda %100 konsantrasyondaki kestane balının *S. aureus*'a (25.30 ± 1.31 mm) karşı antibakteriyel aktivitesinin, aynı konsantrasyondaki çiçek balına göre daha yüksek olduğu bildirilmiştir. %50 konsantrasyonda, sadece kestane balının *S. aureus*'a karşı ortalama (12.43 ± 1.01 mm) zon çapı gösterdiği, %25 konsantrasyonda, her iki bal türünün de *S. aureus* 'a karşı daha düşük inhibisyon çapına (kestane balı: 7.53 ± 1.32 mm; çiçek

balı: 5.81 ± 1.81 mm) sahip olduğu görülmüştür. Bu çalışma sonucunda *S. aureus*'un, kestane balına karşı en hassas bakteri olduğu tespit edilmiştir (Güneş ve diğ, 2017). Yaptığımız araştırmada ise arı sütü ve bal karışımının *S. aureus*'a karşı %12,5 konsantrasyonunda 8,79 mm ve %15 konsantrasyonunda $9,07 \pm 0,37$ mm zon çapına sahip olduğu görülmüştür. Mevcut çalışmamızda arı sütü kestane balı karışımı daha düşük konsantrasyonlarda kullanılmasına rağmen *S. aureus* bakterisinde daha yüksek zon çapı elde edildiği belirlenmiştir. Bu durum kestane balına arı sütü ilavesinin antimikrobiyal etkinliği artırdığı şeklinde yorumlanmıştır.

Al-Abbadi (2019) yaptıkları çalışma sonucunda Çin arı sütünün sulu ekstraktının (10g/10mL) *C. albicans* üzerindeki $1.38 \pm 0,06$ cm; Ürdün arı sütünün sulu ekstraktının (10g/10mL) ise $1.79 \pm 0,10$ cm inhibisyon zon çapına sahip olduğunu bildirmiştir. Şekil 3.5'te mayalar üzerinde belirlenen inhibisyon zon çaplarına ait görseller verilmiştir.

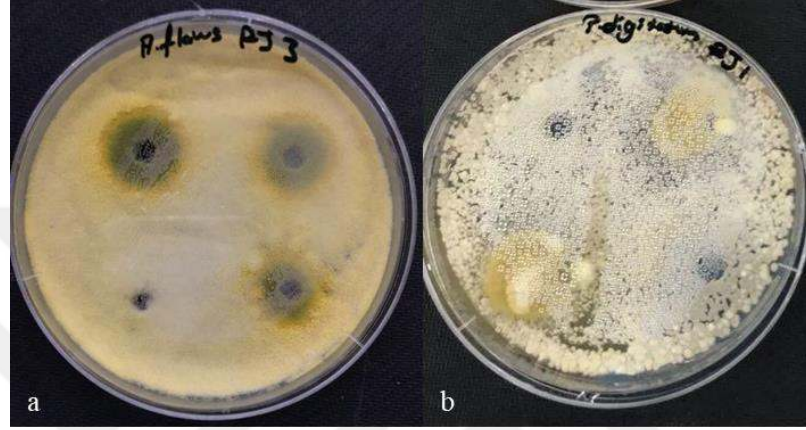


Şekil 3.7 : RJ-CH karışımının *C. albicans* (a) ve *C. parapsilosis* (b) üzerinde belirlenmiş inhibisyon zon çapları (mm).

İkisi Mısır ve biri Çin'den alınan 3 farklı RJ'nin antimikrobiyal aktivitesini karşılaştırmak için yapılan bir çalışmaya göre 5 mg/mL konsantrasyonunda kafur ve narenciye arı sütünün *C. albicans* üzerinde oluşturduğu zon yarıçapları sırasıyla 12.4 ± 1.24 ve 14.2 ± 0.7 mm; Çin arı sütünün bu konsantrasyonda zon oluşturmadığı belirtilmiştir (Moselhy ve diğ, 2013). Yaptığımız çalışmada ise RJ-CH karışımının mayalar üzerindeki inhibisyon zonlarına bakıldığında *C. parapsilosis* ve *C. albicans* üzerinde test edilen hiçbir konsantrasyonunda zon oluşumu gözlenmemiştir. Kullanılan RJ orijinin farklı olmasının bu duruma sebep olabileceği düşünülmüştür.

RJ-CH karışımının *A. flavus* ve *P. digitatum* üzerinde oluşturduğu zon çapları Şekil 3.6'da verilmiştir. *A. flavus* üzerinde RJ-CH karışımının %20,30,40,50,60 ve

%70(mL/mL) konsantrasyonlarında inhibisyon zonları olduğu görülmüş (Çizelge 3.3) ve istatistiksel olarak konsantrasyonlar arasında anlamlı bir fark olduğu belirlenmiştir ($p<0,05$). *P. digitatum*'da ise test edilen hiçbir RJ-CH konsantrasyonunda inhibisyon görülmemiştir. Küfler üzerinde test edilen konsantrasyonların çok daha yüksek olduğu düşünüldüğünde *P. digitatum*'un test edilen tüm mikroorganizmalar arasında en dirençli mikroorganizma olduğu tespit edilmiştir.



Şekil 3.8 : RJ-CH karışımının *A. flavus* (a) ve *P. digitatum* (b) üzerinde belirlenmiş inhibisyon zon çapları (mm).

Boukraa (2008a) farklı botanik orijinlerden elde ettikleri 4 bal çeşidine (2 portakal çiçeği ve 2 okaliptüs) farklı oranlarda RJ ekleyerek *P. aeruginosa*'ya karşı antibakteriyel aktivitesini incelemiştir. Okaliptüs çeşitlerinin MİK değerlerinin, her iki örnek için yüzde 12 (mL/mL) olduğu; portakal balı çeşitlerinin MİK değerlerinin sırasıyla yüzde 17 ve 18 (mL/mL) olduğu bildirilmiştir. RJ'nin MİK değeri ise yüzde 4 (mL/mL) olarak ölçülmüş ve RJ'nin test edilen bakteri suşuna karşı baldan daha etkili olduğu tespit edilmiştir. Test edilen her bal çeşidine %3(mL/mL) RJ eklendiğinde MİK'te yüzde 90'dan fazla; %2(mL/mL) RJ eklendiğinde MİK'te %66,6 ve %1(mL/mL) RJ eklendiğinde MİK'te %50 düşüş gözlemlendiği ifade edilmiştir. Bunun yanı sıra bal örneklerinin MİK gözlenen konsantrasyonun yarısı ve üçte biri RJ ile karıştırılmış ve RJ MİK değerlerinin sırasıyla %75 ve %50 azaldığı bildirilmiştir.

Dinkov ve diğ. (2016) arı sütü ve kolza balının ayrı ayrı ve karışım (RJ:RH, 1:100 mg/mg) halinde metisilin dirençli *Staphylococcus aureus*'a (MRSA) karşı antibakteriyel aktivitesini test etmişlerdir. Bu amaçla bakterilerin inkübasyon öncesi ve %10, 20, 30 ve 40 konsantrasyonlarındaki ürünlerle inkübasyon sonrasındaki sayımları karşılaştırılmıştır. Yapılan çalışma sonucunda, %40 kolza balı, %20 ve %30

RJ, %30 RJ: RH (1:100) konsantrasyonlarının MRSA sayısında en az 0,3 azalmaya neden olduğu gözlenmiştir. RJ ve kolza balı karışımının tek başına kolza balından daha yüksek antibakteriyel aktiviteye sahip olduğu sonucuna varılmıştır. Ayrıca, bal ve RJ'nin, tek tek veya kombinasyon halinde, MRSA enfeksiyonlarına karşı alternatif terapötik ajanlar olma potansiyeline sahip olduğu bildirilmiştir.

Literatürde RJ ve farklı bal türleri ile yapılan antimikrobiyal çalışmalar sonucunda RJ-CH karışımının bu maddelerin ayrı ayrı kullanımından daha yüksek antimikrobiyal aktiviteye sahip olduğu gösterilmektedir. Ayrıca kestane balının diğer ballarla karşılaştırıldığında daha yüksek antimikrobiyal aktivite gösterdiğini kanıtlayan çalışmalar da bulunmaktadır. Bu nedenle çalışmamızda kullandığımız RJ-CH karışımının antimikrobiyal aktivitesinin test edilmesi önem kazanmaktadır.

3.4 NKA ve MTT Yöntemi ile Sitotoksitenin Değerlendirilmesi

Bursa bölgesinde bir üreticiden taze olarak temin edilen RJ ve CH 1:5 (w/w) oranında karıştırılmış ve bu karışımının sitotoksik etkisi BEAS-2B ve A549 hücrelerinde NKA ve MTT yöntemleri ile değerlendirilmiştir. Sitotoksik aktivitenin belirlenmesi için uygun şartlarda çoğaltılıp 96'lı plakalara ekilen hücreler deney günü RPMI 1640 besiyerinde %0,5-%50 (w/v) konsantrasyon aralığında hazırlanan RJ ve bal karışımı ile muamele edilmiştir. Negatif kontrol grubu için yalnızca besiyeri kullanılırken; pozitif kontrol için ise %1 Triton X-100 içeren besiyeri kullanılmıştır. Negatif kontrol grubundaki hücre canlılığı %100 kabul edilerek tüm örnekler için kontrole kıyasla yaşayan hücre yüzdeleri belirlenmiştir.

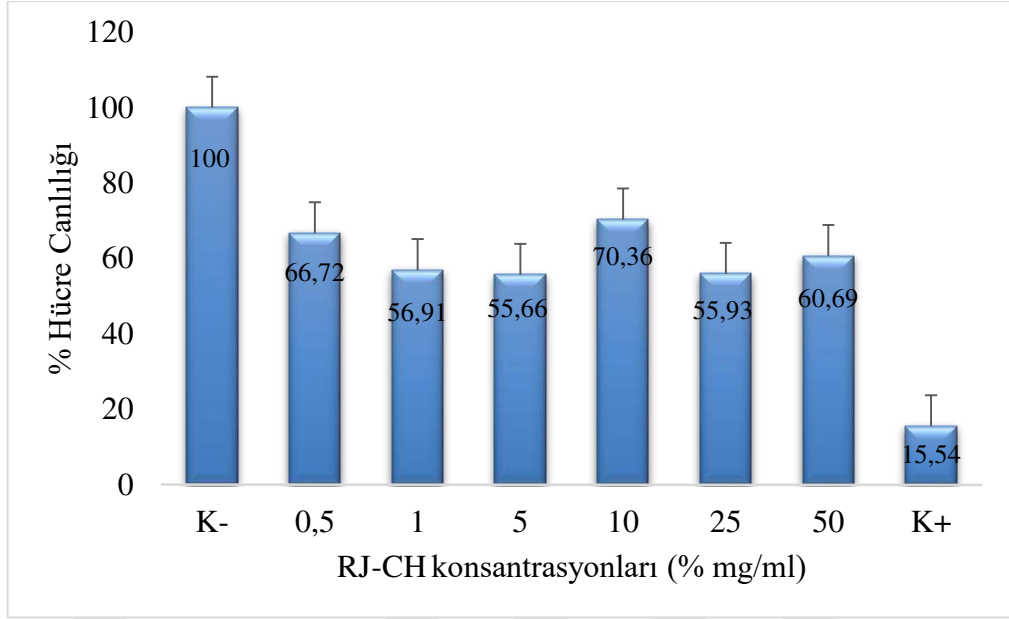
Nötral kırmızı alım (NKA) sitotoksite deneyi, Rockefeller Üniversitesi'nde hücre canlılığı belirlemeye yönelik kemosenitivite deneyi olarak geliştirilmiştir (Borenfreund ve Puerner, 1985). Bu test canlı hücrelerin supravital boya olan nötral kırmızıyı alım ve bağlama yeteneğine dayanmaktadır. Bu zayıf katyonik boya, iyonik olmayan pasif difüzyonla hücre zarlarına nüfuz eder ve lizozomlarda birikir, burada elektrostatik hidrofobik bağlarla lizozomal matrisin anyonik ve/veya fosfat gruplarına bağlanır (Winckler, 1974). Boya daha sonra asitleştirilmiş bir etanol solüsyonu kullanılarak canlı hücrelerden ekstrakte edilir ve çözündürülmüş boyanın absorbansı bir spektrofotometre kullanılarak ölçülür (Repetto ve diğ, 2008).

Nötral kırmızı alımı, hücrenin ATP üretimi yoluyla pH gradyanlarını koruma kapasitesine bağlıdır. Fizyolojik pH'ta boya, sıfıra yakın bir net yük sunarak hücre zarlarına nüfuz eder. Lizozomların içinde, sitoplazmanınkinden daha düşük bir pH'ı korumak için bir proton gradyanı vardır. Böylece boya yüklenir ve lizozomların içinde tutulur (Repetto ve diğ, 2008).

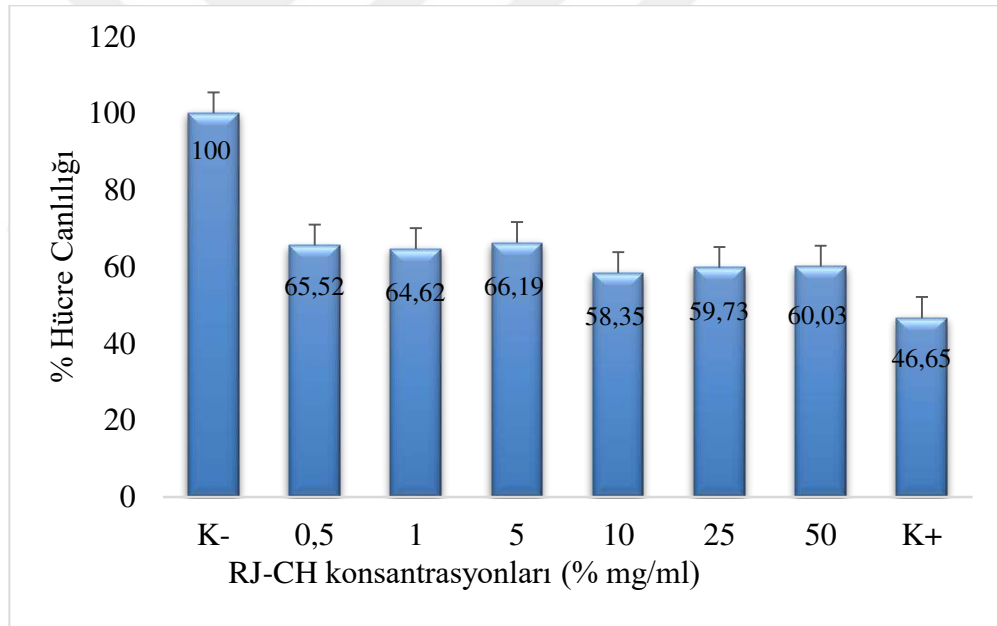
Nötral kırmızı alımı maksimum 3.5 saatte olmak üzere, boya ile 2 saat temasa kadar önemli ölçüde artar. 1 saatlik maruziyetten sonra bile sitotoksiteye neden olduğu, sonuçların değişkenliğini önemli ölçüde artırdığı, boya çökeltilerine neden olduğu ve kültürlerin morfolojik incelemesini engellediği için konsantre nötral kırmızı solüsyonu kullanılması önerilmez (Repetto ve diğ, 2008).

Hücre öldüğünde veya pH gradyanı azaldığında, boya hücrede tutulmaz. Sonuç olarak, tutulan boya miktarı canlı hücre sayısı ile orantılıdır. Ek olarak, canlı hücreler tarafından nötral kırmızı alımı, hücre yüzeyindeki veya lizozomal membranlardaki değişikliklerle değiştirilebilir (Bitensky, 2008). Böylece canlı, hasarlı veya ölü hücreleri boya alımları üzerinden spesifik lizozomal kapasitelerine göre ayırmak mümkündür (Bitensky, 2008). Nötral kırmızı boyanın eşzamanlı bağlanmasıyla birlikte lizozomal bütünlük, hücre canlılığının oldukça hassas bir göstergesidir. NKA testi hücre canlılığını ölçer ve yoğunluğa bağlı olarak hücre replikasyonunu, sitostatik etkileri veya hücre ölümünü ölçmek için kullanılabilir (Repetto ve diğ, 2008).

Şekil 3.9'da BEAS-2B ve Şekil 3.10'da A549 hücreleri için NKA testi ile belirlenen yaşayan hücrelerin canlılık yüzdesinin uygulanan madde konsantrasyonlarına karşı grafiği verilmiştir. BEAS-2B ve A549 hücrelerinde 24 saatlik madde muamelesi ardından uygulanan NKA testi sonuçlarına bakıldığında tüm konsantrasyonlarda hücre canlılığının negatif kontrol grubuna oranla daha az olduğu ancak bu etkinin konsantrasyona bağımlı olmadığı görülmüştür. Hücre canlılığı tüm konsantrasyonlarda %70'in altında olduğu görülmüş ancak %50 altında olmadığı için karışımın iki hücre üzerinde de sitotoksik etkisi bulunmadığı sonucuna varılmıştır.



Şekil 3.9 : RJ-CH karışımının NKA yöntemine göre BEAS-2B hücrelerindeki sitotoksik etkisi.



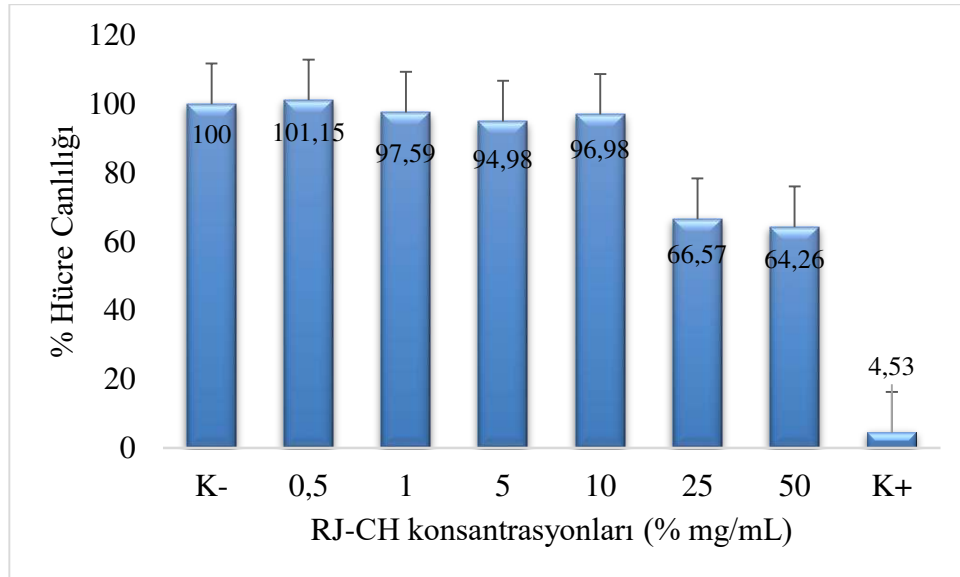
Şekil 3.10 : RJ-CH karışımının NKA yöntemine göre A549 hücrelerindeki sitotoksik etkisi.

Bu tez çalışmasında RJ-CH karışımının sitotoksik etkilerini araştırılmasında kullanılan bir diğer teknik MTT (3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolyum bromür), testidir. MTT kolorimetrik testi, hücre canlılığının bir göstergesi olarak mitokondrinin işlevsel durumunu belirler (Vajrabhaya ve Korsuwannawong, 2018). MTT mitokondri içinde süksinat dehidrojenaz tarafından tetrazolyum halkasının bölünmesiyle çözünmeyen mor bir formazana dönüştürülen (Bacanli ve diğ, 2017) suda çözünür bir

tetrazolyum tuzudur (Fotakis & Timbrell, 2006). Formazan ürünü hücre zarlarını geçirmez ve bu nedenle sağlıklı hücrelerde birikir (Bacanlı ve diğ, 2017) (Fotakis ve Timbrell 2006). Üretilen toplam formazan miktarı, kültürdeki canlı hücre sayısı ile doğru orantılıdır; bu nedenle, MTT testi hücre canlılığını değerlendirmek için kullanılan standart bir yöntem haline gelmiştir (Lim ve diğ, 2015).

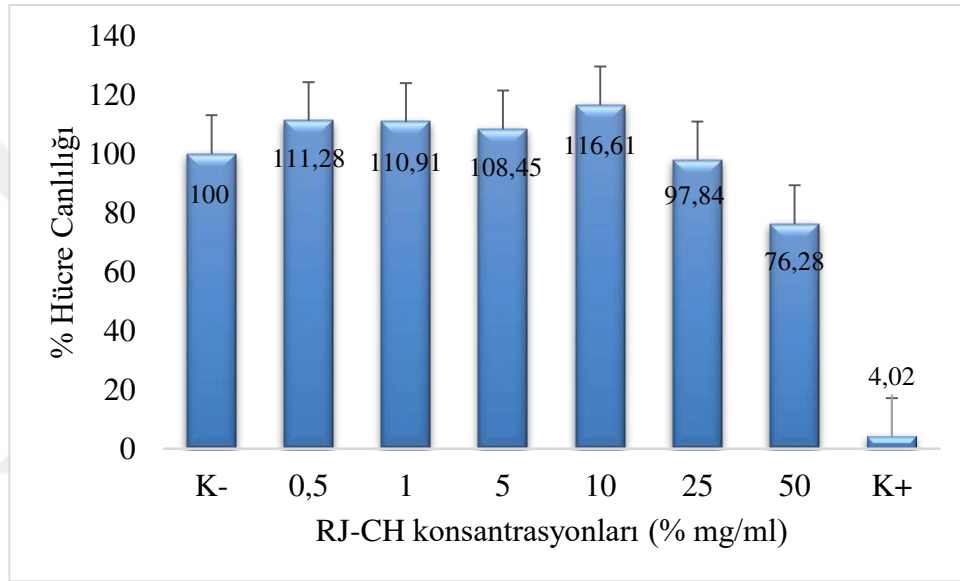
MTT testi geçerliliği çeşitli hücre hatlarında test edilmiştir. Yapılan araştırmalar, MTT'nin indirgenmesinin hücrelerde ve mitokondri dışında NADH veya NADPH tarafından da sağlandığını göstermektedir (Fotakis ve Timbrell, 2006). Testin tekrarlanabilirliğini ve duyarlılığını geliştirmek için Mossmann (1983) tarafından açıklanan ilk protokolün daha fazla modifikasyonu önerilmektedir (Fotakis ve Timbrell, 2006).

Bu tez çalışmasında 24 saatlik madde muamesinin ardından MTT testi uygulanmıştır. Şekil 3.11'de BEAS-2B hücreleri için MTT testi ile belirlenen yaşayan hücrelerin canlılık yüzdesinin uygulanan madde konsantrasyonlarına karşı grafiği verilmiştir. BEAS-2B hücrelerinde MTT testi sonuçlarına göre %0,5 konsantrasyonunda kontrole göre artış görülmüştür. %1, %5 ve %10 (mg/mL) konsantrasyonlarında karışımın BEAS-2B hücrelerinde önemli bir etki oluşturmadığı ancak %25'ten itibaren hücre canlılığını azalttığı görülmüştür. BEAS-2B hücrelerinde karışıma ait IC₅₀ değeri %61,45 (mg/mL) olarak bulunmuştur.



Şekil 3.11 : RJ-CH karışımının MTT yöntemine göre BEAS-2B hücrelerindeki sitotoksik etkisi.

A549 hücreleri için MTT testi ile belirlenen yaşayan hücrelerin canlılık yüzdesinin uygulanan madde konsantrasyonlarına karşı grafiği Şekil 3.12’de verilmiştir. A549 hücrelerinde 24 saatlik madde muamelesi ardından uygulanan MTT testi sonuçlarına göre %0,5-10 (mg/mL) konsantrasyon aralığında kontrol grubuna göre hücre canlılığında artış görülürken; %25 (mg/mL) konsantrasyonlarında kontrole göre hafif bir azalma olduğu görülmüştür. %50 (mg/mL) konsantrasyonunda ise hücre canlılığında azalma olduğu ancak %70’in altında olmadığı için RJ-CH karışımının A549 hücrelerine karşı toksik etkisi olmadığı sonucuna varılmıştır. A549 hücrelerinde karışıma ait IC₅₀ değeri %89,37 (mg/mL) olarak bulunmuştur.



Şekil 3.12 : RJ-CH karışımının MTT yöntemine göre A549 hücrelerindeki sitotoksik etkisi.

Bu tez çalışmasında RJ-CH karışımının sitotoksik aktivitesini belirlemek için MTT ve NKA olmak üzere 2 test yapılmıştır. İki test sonuçlarına bakıldığında farklılıklar olduğu görülmüştür. Bu farklılıkların MTT’nin mitokondriyal; NKA’nın lizozomal aktiviteyi hedef almasından kaynaklandığı düşünülmektedir. Schröterová ve diğ. (2009) hücre modelinin tipi ve test edilen kimyasalların doğası ile uç noktaların duyarlılığındaki farklılıkların, rapor edilen sonuçlardaki tutarsızlıkları açıklayabileceğini bildirmiştir. Ayrıca, tümör hücre hatlarının apoptoza karşı daha dirençli olması, sağlıklı ve kanser hücrelerinin, metabolik aktivite ve moleküler kompozisyonundaki farklılıklar gibi yapı ve işlevlerinde farklılıklar göstermesi gerçeğiyle de açıklanabilir (Frey ve diğerleri, 2007). Her hücre tipinin belirli

özellikleri, çeşitli savunma mekanizmalarına ve sonuç olarak kimyasal bir bileşiğin toksik etkisine karşı farklı hassasiyete yol açabilir.

Testler sonucunda alınan yanıtların kullanılan sitotoksik testine bağlı olarak değiştiğine dair çalışmalar bulunmaktadır (Fotakis ve Timbrell, 2006). Başlangıçta, MTT azalmasının yalnızca mitokondriyal bölgede meydana geldiği varsayılmıştır; ancak daha sonraki çalışmalar, MTT'nin mikrozomal ve sitozolik fraksiyonlarda oksido-redüktaz tipi enzimler tarafından da azaltıldığını göstermiştir (Berridge ve diğ, 2005). NKA testi, bozulmamış plazma zarlarına sahip canlı hücrelerin supravital NK boyasını lizozomlara dahil etme ve bağlama kapasitesine dayanmaktadır. Bu süreç, hücrenin ATP üretimi yoluyla pH gradyanlarını koruma kapasitesine bağlıdır (Repetto ve diğ, 2008). NKA uç noktasının hücre tipleri arasında, doğalarından bağımsız olarak evrensel olduğu varsayılırken, tetrazolyum bazlı testler ekspresyonu, lokalizasyonu ve aktivitesi hücre tipine bağlı olan hücre içi enzimlerin aktivitesini ölçtüğü için daha spesifiktir (Schröterová ve diğ, 2009).

Nogueira ve diğ. (2011) MTT ve NKA testlerini karşılaştırmak için lizin-bazlı yüzey aktif maddelerin farklı hücre hatlarında sitotoksik etkilerini incelemişlerdir. Yapılan karşılaştırmalar sonucunda değerlendirilen hücre hattı veya bileşik ne olursa olsun, MTT testinin hücre hasarını tespit etmede NKA testinden daha duyarlı olduğu gösterilmiştir. MTT testi, NKA testi ile önemli bir sitotoksik etkinin gözlenmediği konsantrasyonlarda canlılık kaybını ortaya çıkarmıştır (Nogueira ve diğ, 2011). Bu tez çalışmasında ise A549 hücrelerinde NKA'da daha yüksek hücre ölümü tespit edilmiş olup; şekerli bir ürün olan balın hücre enerji metabolizmasını desteklerken, hücrelerde lizozomal hasara yol açabileceği sonucuna varılmıştır.

Literatürde RJ-CH karışımının sitotoksik etkilerini içeren çalışmalar bulunmamasına rağmen arı ürünlerinin çeşitli hücre hatları üzerinde sitotoksik etkilerinin araştırıldığı birçok çalışma bulunmaktadır.

Cheraghi ve diğ. (2018) RJ'nin insan endotel hücrelerini yüksek glikoz seviyesinden korumadaki farklı etkilerini değerlendirmek için, insan umbilikal ven endotel hücrelerini, 5 ve 30 mM glikoz içeriği varlığında, 0.625 ila 10 mg/mL arasında çeşitli konsantrasyonlarda RJ'ye 72 saat boyunca maruz bırakmıştır. Yapılan MTT testi, 2,5 mg/mL'den düşük konsantrasyonlarda RJ takviyesinin hücrelerin hayatta kalma oranını etkilemediğini ve 30 mM glikozun sitotoksik etkilerini kısmen azalttığını

göstermiştir. Sonuç olarak, RJ'nin daha yüksek konsantrasyonda kullanıldığında 5 ve 30 mM glikoz seviyelerinde HUVEC'ler için güçlü bir sitotoksik ajan olduğu bildirilmiştir.

Jovanović ve diğ. (2018), Sırbistan kaynaklı RJ örneklerinin normal insan fibroblast (MRC-5) ve kolorektal kanser (HCT-116 ve SW-480) hücreleri üzerindeki biyolojik etkilerini belirlemek için çalışmalar yapmıştır. Sitotoksik aktiviteyi belirlemek için yapılan MTT hücre canlılığı testi sonucunda RJ'nin test edilen tüm hücre hatları üzerinde önemli bir sitotoksik etki göstermediği bildirilmiştir. 24 saatlik tedaviden sonra hücre canlılığının belirgin biçimde arttığı ve test edilen üç hücre hattının hepsinde daha düşük konsantrasyonlarda proliferasyonun RJ tarafından indüklendiği görülmüştür. Daha yüksek RJ konsantrasyonları, test edilen tüm hücre hatlarında hücre canlılığında azalmaya neden olsa da kanser hücrelerinde iyileşme gözlenmiştir. 250 µg/ml konsantrasyonda test edilen kanser hücre hatlarında RJ'nin hafif sitotoksik etkisi görülmüş ve kanser hücreleri, tedaviye normal fibroblast hücrelerine göre biraz daha yüksek duyarlılık göstermiştir. RJ'nin etkisi, sitotoksikite için bir parametre olarak kullanılan IC₅₀ değeri için 500 µg/ml'den yüksek çıkmıştır. Zayıf antiproliferatif etkiler dikkate alındığında, IC₅₀ değerleri uygulanan en yüksek RJ konsantrasyonundan daha yüksek olduğu, hesaplanamayacağı ve RJ'nin, araştırılan hücre hatları üzerinde sitotoksik etki göstermediği bildirilmiştir.

Özkök ve diğ. (2021) Türkiye'nin 5 farklı bölgesinden (RJ1: Balıkesir 1, RJ2: Bursa 1, RJ3: Çanakkale 1, RJ4: Yalova 1, RJ5: Bursa 2) temin edilen RJ'lerin yağ dokusu kaynaklı mezenkimal kök hücreler (AdMSC'ler) üzerinde proliferasyon potansiyellerini 24, 48 ve 72 saatlik periyotlarla değerlendirmiştir. Yapılan analiz sonuçlarının bölgeden bölgeye değiştiği; hücrelerin canlılığının RJ konsantrasyonları ile RJ5 dışında ilişkili olmadığını ortaya koymuştur. Konsantrasyona bağımlı yanıt ancak hücrelerin canlılığının arttığı 3. günde RJ5 tedavisinden sonra gözlenmiş; en düşük RJ5 konsantrasyonu ile muamele edilen hücrelerde, daha düşük canlılık görülmüştür.

Abandansari ve diğ. (2018) doğal bir madde olarak RJ ve doksorubisinin prostat kanser (PC3) hücrelerinin canlılığı üzerindeki eşzamanlı etkisini ve RJ'nin doksorubisin tarafından oluşturulan sitotoksik etkiyi artırma yeteneğini belirlemek için çalışma yapmıştır. Bu çalışmanın sonuçları, RJ'nin sitotoksik etkilerinin hem konsantrasyona hem de zamana bağlı olduğunu göstermiştir. Ayrıca, RJ'nin PC3 hücreleri üzerindeki

en iyi sitotoksik etkisin, 72 saatlik inkübasyondan sonra 100 mg/mL konsantrasyonda RJ ile 10 µg/mL konsantrasyonda DOX birlikte uygulandığında tespit edilmiştir. Ayrıca, PC3 hücrelerinin çeşitli konsantrasyonlarda RJ ile ön tedavisinin, doksorubisinin sitotoksik etkilerini daha düşük konsantrasyonlarda arttırdığı bildirilmiştir.

Kurdi ve Alhusayni (2019) en yaygın kullanılan terapötik ajanlardan biri olan 5-Flourourasil (5-FU), doğal arı ürünleri ve kombinasyon konsantrasyonlarının MCF-7 meme kanseri hücre hatlarına karşı sitotoksik etkilerini araştırmak için çalışmalar yapmıştır. Bal, RJ, polen taneleri ve bunların 5-FU'lu veya 5-FU'suz kombinasyonlarından oluşan örneklerin meme kanser hücre hatlarına karşı (MCF-7) etkilerini *in vitro* sülforodamin B (SRB) testi ile araştırmışlardır. Bal ve 5-Fu ile takviyenin, MCF-7 meme kanseri hücre hatlarının canlılığını *in vitro* olarak inhibe ettiği, IC₅₀'nin yalnızca 5-FU ile 7.79 µM/ml'ye karşı 7.65 µM/ml'ye düştüğü görülmüştür. Benzer şekilde, RJ ile 5-FU uygulamasının, MCF-7 meme kanseri hücrelerinin büyümesini önemli ölçüde inhibe ettiği, IC₅₀'yi 4,95µM'ye düşürdüğü belirlenmiştir. Ayrıca, polen taneleri ve arı ürünleri (H+RJ+PG) ile 5-FU takviyesinde, sırasıyla IC₅₀ değerlerinin 23,45 ve 4,26 µM/ml olarak hesaplanmıştır. Yapılan değerlendirmeler sonucunda bal, RJ ve arı poleni ile temsil edilen arı ürünlerinin 5-Furacilin sitotoksitesini arttırmak ve sonuç olarak meme kanserini ve metastazını yenmek için kullanılabileceği bildirilmiştir. Bunun yanı sıra, arı ürünlerinin kombinasyon halinde kullanımının tek tek kullanımdan daha etkili olduğu IC₅₀ değerlerinden anlaşılmaktadır.

Seyhan ve diğ. (2017) kestane, sedir, çam ve çok çiçekli ballardan elde edilen belirli ağaç kökenli balların, kadınlarda en sık görülen kanser olan meme kanseri, MCF7, SKBR3 ve MDAMB-231 farklı türlerini temsil eden hücre hatları ile kontrol olarak MCF10A fibrokistik meme epitel hücre hattı üzerindeki sitotoksik etkilerini araştırmıştır. Bal örneklerinin hücre canlılığına etkileri etanol/su çözeltilerinin konsantrasyona (1, 2.5, 5, 7.5 ve 10 µg/mL) ve zamana (24., 48. ve 72. saat) bağlı olarak suda çözünür WST-1 yöntemiyle incelenmiştir. Kestane balının, düşük konsantrasyonlarda bile (1 µg/mL'den başlayan bal konsantrasyonları) kontrol MCF10A hücreleri de dahil olmak üzere tüm hücre hatlarında %50'nin üzerinde sitotoksitesiteye neden olduğu görülmüştür. Benzer şekilde sedir balının en etkili ikinci bal olduğu da gözlemlenmiştir. 1 µg/mL konsantrasyonlu sedir balı, MCF10A, MCF7

ve SKBR3'te istatistiksel olarak yüksek derecede anlamlı bulunmuştur. Buna karşılık, çam balı, aynı zaman noktasında 1 µg/mL konsantrasyonla yalnızca MDAMB 231 hücrelerinde önemli ölçüde önemli sitotoksikite göstermiştir. Çam balı, sedir ve kestane balları gibi 2,5-5 µg/mL konsantrasyonlarda MCF-7 ve SKBR3 kanser hücre hatlarında antikanser etki yaratırken, 2,5-5 µg/mL konsantrasyonlarla MCF10A kontrol hücrelerinin canlılığını arttırmıştır. Çam balı, sadece MCF10A hücre hattında daha yüksek konsantrasyonlarda (10 µg/mL) sitotoksikite göstermiştir. Bal örneklerinin MCF-7 hücre hattı üzerindeki apoptotik etkileri kestane>çam>sedir>multifloral olarak bulunmuştur. Kestane, sedir ve çam balı, meme kanseri hücre dizileri, MCF7, SKBR3 ve hatta hedeflenen antikanser tedavisinden yoksun üçlü negatif meme kanserini temsil eden en agresif MDAMB 231 üzerinde dikkate değer bir sitotoksik etki göstermiştir. Kestane ve sedir balları tüm hücre dizilerinde en sitotoksik olarak öne çıkarken, çam balının kanser hücreleri üzerinde toksik iken kontrol hücrelerinde diğer ballara göre en az toksik etkili olduğu bulunmuştur.

İmtara ve diğ. (2019) Filistin (H1-6) ve Fas'ta (H7-12) farklı lokasyonlardan toplanan on iki bal örneğinin fenolik bileşiklerini karakterize etmek ve insan kolorektal karsinom hücre hattı HCT-116 ve meme kanseri hücre hattı MCF-7 üzerinde sitotoksik ve sitostatik etkilerini değerlendirmiştir. MTT test sonuçlarına göre Filistin örnekleriyle işleme tabi tutulan her iki hücre dizisinde de hücre canlılığında önemli bir azalma gözlenmemiştir. Morar balı (H1), Morar akhdar (H2), Bochnikha (H9), Kabbar (H10), Dagmos (H11) ve Arbousie (H12) balları 2000 µg/ml numune konsantrasyonunda HCT hücreleri üzerinde antiproliferatif aktivite göstermiştir. Kabbar bal örneği (H10), kontrol hücrelerine kıyasla hücre canlılığında %42 azalma ile en yüksek sitotoksik etkileri göstermiştir. Zaatar (H7) ve Limon (H8) bal örnekleri HCT hücrelerinin çoğalmasını arttırmıştır. Bu sonuçlar, bu numunelerin hidrojen peroksit seviyesi ile açıklanabileceği; balın kanser hücrelerinde proliferatif etkisinden hidrojen peroksitin sorumlu olduğu bildirilmiştir.

Çelebioğlu (2020) kestane balının probiyotik bakteriler üzerindeki etkilerini ve probiyotikler ile kestane balı kombinasyonunun kanser hücreleri üzerindeki *in vitro* sitotoksik etkilerini araştırmıştır. Kestane balının bakteri üremesi üzerindeki etkileri incelendikten sonra *Lactobacillus acidophilus* LA-5 ve *Lactobacillus rhamnosus* GG'nin probiyotik özellikleri üzerine etkileri incelenmiştir. Bakteriler, kestane balı

üzerinde çoğaldıktan sonra, sırasıyla meme ve kolon kanseri hücre dizileri, MCF-7 ve Caco-2 ve kanserli olmayan bir meme epitel hücre dizisi MCF-10A üzerindeki *in vitro* sitotoksik etkileri araştırılmıştır. Sonuç olarak, kestane balı, büyümeyi artırarak ve otoagregasyon ve yüzey hidrofobikliği gibi probiyotik özelliklerini modüle ederek probiyotik bakterileri olumlu yönde etkilemiştir. Ayrıca kestane balı üzerinde yetiştirilen probiyotikler, kanser hücre hatları üzerinde tek başına probiyotiklerden veya baldan daha fazla sitotoksik etki göstermiştir. Bu çalışmada bal ve probiyotik kombinasyonlarının yeni nutrasötikler formüle etme potansiyeline sahip olduğu bildirilmiştir (Celebioglu, 2020).

Literatürdeki çalışmalar değerlendirildiğinde arı ürünlerinin ayrı ayrı ve kombine çalışmalarına göre arı ürünlerinin karışım halinde kullanılmasının çok daha etkili olduğu sonucuna varılmaktadır. Kestane balının da diğer ballara göre daha yüksek aktivitesi olduğunu gösteren çalışmalar dikkate alınarak bu çalışmada RJ-CH karışımı kullanılmıştır. Ancak yapılan testler sonucunda karışımın uygulanan konsantrasyonlarında sağlıklı (BEAS-2B) ve kanserli (A549) hücre üzerinde seçici bir sitotoksik etkisi veya sitostatik bir etkisi olmadığı görülmüştür.

Yapılan bir çalışmada yüksek RJ konsantrasyonlarının, daha düşük RJ konsantrasyonlarına kıyasla hücrelerin büyümesi ve çoğalması için daha uygun bir pH'ya hizmet edebileceği bildirilmiştir (Özkök ve diğ, 2021). Ayrıca, RJ proteinlerinin U-937 monositlerinin (Watanabe ve diğ, 1998) proliferasyonunu ve hepatosit DNA sentezini ve albümin üretimini (Kamakura ve diğ, 2001) uyardığı bildirilen çalışmalar da bulunmaktadır. Bu durumun, hepatosit DNA sentezinin uyarılmasında rol oynayan birkaç önemli hücre içi sinyal faktörünün aktivasyonu ile sağlandığı ve arı sütündeki 57-kDa proteini de hücrelerin apoptozdan korunmasında rol oynadığı bildirilmiştir (Kamakura, 2002). Başka bir çalışmada ise araştırmalar, arı sütünün içeriği (büyüme faktörleri veya hormonlar) aracılığıyla hücre büyümesini teşvik ettiğini iddia etmiştir (Kamakura, 2002). Narita ve diğ. (2006), RJ'nin fare osteoblast benzeri MC3T3-E1 hücrelerinin proliferasyonunu uyardığını bildirmiştir. Ayrıca farelere RJ'nin oral yoldan verilmesinin kemik kül içeriğinde bir artışa ve tip I prokollajen gen ekspresyonunun yukarı regülasyonuna neden olduğunu da belirtmişlerdir (Özkök ve diğ, 2021). Bu tez çalışmasındaki sonuçların da arı sütünün yukarıda belirtilen özelliklerinden kaynaklı olabileceği düşünülmektedir.

Literatürde glikoz ve fruktoz miktarının hücre proliferasyonu etkileri olduğuna dair çalışmalar da bulunmaktadır. Han ve diğ. (2015) yaptıkları çalışma sonucunda düşük glikozun hücre büyümesini inhibe ettiğini, apoptozu indüklediğini ve hücre döngüsü G1 kontrol noktasında durmasına neden olduğunu, yüksek glikozun ise endometriyal kanserde yapışma ve invazyon kabiliyetini artırdığını göstermiştir. Ayrıca glikozun, AMPK, AKT/mTOR/S6 ve MAPK yollarını düzenleyerek glikolitik aktiviteyi arttırdığı ve hücre proliferasyonunu uyardığı bildirilmiştir.

Fruktoz metabolizması, tümörlerin gelişimi ve ilerlemesinde de rol oynamaktadır (Han ve diğ, 2015). Çalışmalar, akut miyeloid lösemi (AML) hücrelerinin, glukoz yokluğunda hücre çoğalmasını teşvik etmek için ikame olarak fruktoz kullandığını göstermiştir (Chen ve diğ, 2016). Fruktozun meme kanseri hücrelerinde lipoksijenaz-12 ve ilgili bir yağ asidi 12-HETE üretimini indükleyerek meme kanseri ilerlemesi ve metastaz riskini artırabileceğini gösteren çalışmalar da mevcuttur (Jiang et al., 2016).

Glikoz ve fruktozun kanser hücrelerinde proliferasyonun artıran çalışmalar göz önüne alındığında; hazırlanan karışımda bulunan kestane balının glukoz ve fruktoz içeriğinin A549 akciğer kanser hücreleri üzerinde proliferasyonu artırıcı etki yaptığı düşünülmüştür.

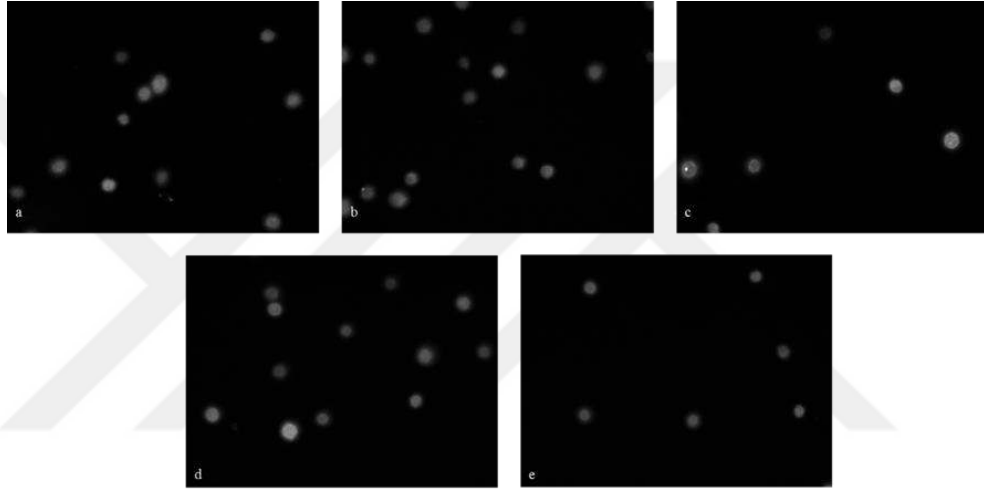
Literatürdeki çalışmalar incelendiğinde de genel olarak hücre canlılığının konsantrasyona bağımlı olmadığı görülmüştür. Bu sonuç tez çalışmamızdaki sonuçlarla benzerdir. Ayrıca arı sütü kullanılarak yapılan çalışmalarda IC₅₀ değerlerinin yüksek çıktığı bildirilmekle birlikte testlerde kullanılan konsantrasyonlarla bu çalışmadaki konsantrasyonlar kıyaslandığında, sitotoksik bir aktivite gözlenmemesine rağmen kestane balının arı sütünün hücre canlılığı üzerindeki etkisini değiştirdiği söylenebilir.

RJ-CH karışımının BEAS-2B ve A549 hücre hatları üzerinde yapılan testler sonucunda hücre canlılığının konsantrasyona bağımlı olmadığı ve sitotoksik bir etki göstermediği sonucuna varılmıştır.

3.5 Comet Yöntemi ile Genotoksisite ve Antigenotoksisitenin Değerlendirilmesi

1:5 (w/w) oranında karıştırılan arı sütü ve kestane balının hücreler üzerinde yapılan sitotoksisite testleri sonucunda her iki hücre hattı için de sitotoksik etki göstermediği belirlenen %1, %5, %10 ve %25 konsantrasyonlarında genotoksik ve antigenotoksik

etkiyi belirlemek için Comet testi yapılmıştır. İstatistiksel analiz için IBM SPSS 22.0 bilgisayar programında Oneway ANOVA testi yapılmış ve karşılaştırmalar için kuyruk uzunluğu, kuyruk yoğunluğu ve kuyruk momenti parametreleri kullanılmıştır. RJ-CH karışımının genotoksik etkisini incelemek için BEAS-2B ve A549 hücreleri direkt olarak karışımın belirlenen konsantrasyonlarında muamele edilirken; antigenotoksik etkisini incelemek için öncelikle BEAS-2B ve A549 hücreleri H₂O₂ ile muamele edilerek DNA hasarı oluşturulmuştur. Ardından farklı konsantrasyonlardaki RJ-CH karışımı uygulanarak karışımın H₂O₂ kaynaklı DNA hasarını onarmadaki etkisi değerlendirilmiştir. Şekil 3.13'te BEAS-2B hücrelerinin genotoksisite Comet testi görüntüleri verilmiştir.



Şekil 3.13 : BEAS-2B hücrelerinin genotoksisite Comet Testi görüntüleri.

(a:Kontrol; b:%1; c:%5; d:%10; e:%25)

Çizelge 3.5'te Arı sütü-kestane balı karışımının BEAS-2B hücrelerinde oluşturduğu genotoksik ve antigenotoksik etkisine ilişkin deney sonuçları verilmiştir. Yapılan istatistiksel analizler sonucunda RJ-CH karışımının negatif kontrol ile kıyaslandığında %10 ara konsantrasyonunda BEAS-2B hücrelerinde sebep olduğu DNA hasarında kontrole kıyasla arttığı ancak bu artışın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı görülmüştür ($p>0,05$). %5 konsantrasyonunda kontrole kıyasla DNA hasarındaki azalmanın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı ($p>0,05$); %1 ve %25 konsantrasyonlarında ise kontrol ile kıyasla DNA hasarının istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azaldığı görülmüştür ($p<0,05$).

Çizelge 3.5 : RJ-CH karışımının BEAS-2B hücreleri üzerinde genotoksik ve antigenotoksik etkisine ilişkin bulgular.

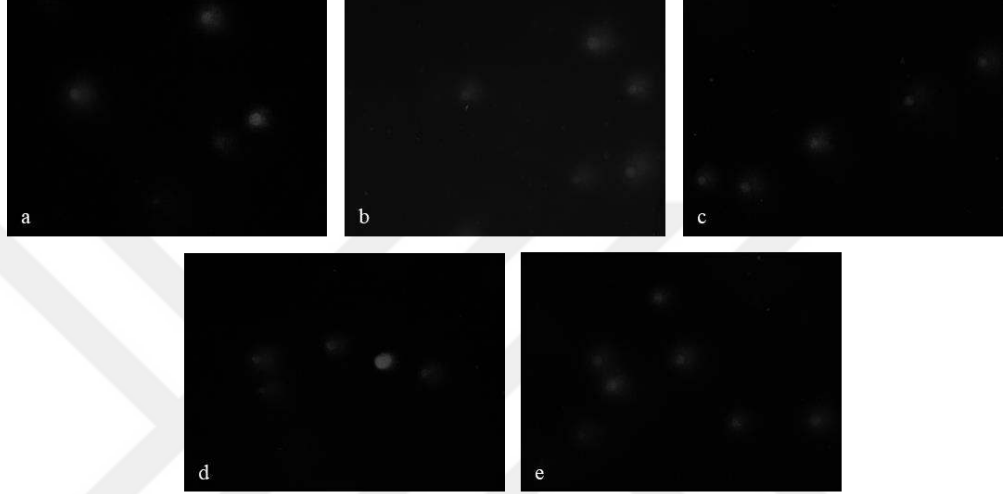
Gruplar	Kuyruk Uzunluğu Ortalama (±standart hata)	Kuyruk Yoğunluğu Ortalama (±standart hata)	Kuyruk Momenti Ortalama (±standart hata)
Negatif Kontrol	24,695±0,614	12,116±1,353	1,862±0,296
%1 RJ-CH	24,667±0,434	7,369±0,883 ^a	0,993±0,165 ^a
%5 RJ-CH	28,764±0,662 ^a	11,891±1,059	1,656±0,157
%10 RJ-CH	28,808±0,507 ^a	12,616±1,004	1,807±0,166
%25 RJ-CH	24,902±0,394	7,675±0,821 ^a	0,993±0,145 ^a
Pozitif Kontrol (H ₂ O ₂)	46,390±1,274 ^a	39,058±1,230 ^a	8,642±0,369 ^a
%1 RJ-CH + H ₂ O ₂	44,118±1,111 ^a	33,762±1,415 ^{a, b}	7,203±0,399 ^{a, b}
%5 RJ-CH + H ₂ O ₂	44,021±0,827 ^a	33,479±1,229 ^{a, b}	6,896±0,288 ^{a, b}
%10 RJ-CH + H ₂ O ₂	50,314±1,106 ^{a, b}	44,707±1,365 ^{a, b}	10,996±0,475 ^{a, b}
%25 RJ-CH + H ₂ O ₂	47,344±1,075 ^{a, b}	31,080±1,387 ^{a, b}	7,318±0,405 ^{a, b}

Sonuçlar iki çalışmanın ortalama değeri ± standart hata olarak verilmiştir.

^a Negatif kontrole göre p<0,05 düzeyinde anlamlı

^b Pozitif kontrole göre p<0,05 düzeyinde anlamlı

RJ-CH karışımının H_2O_2 ile hasara uğratılmış BEAS-2B hücreleri üzerindeki antigenotoksik etkisi yapılan istatistiksel analizler sonucunda pozitif kontrol grubu ile kıyaslandığında H_2O_2 uygulanan gruplara karşı RJ-CH karışımının yalnızca %10 konsantrasyonunda hücrelerde oluşan DNA hasarında istatistiksel olarak anlamlı bir artış gösterdiği ($p<0,05$); %1, %5 ve %25 konsantrasyonlarının ise istatistiksel olarak anlamlı bir azalma gösterdiği ($p<0,05$) belirlenmiştir. Şekil 3.14'te BEAS-2B hücrelerinin antigenotoksikite Comet Testi görüntüleri verilmiştir.



Şekil 3.14 : BEAS-2B hücrelerinin antigenotoksikite Comet Testi görüntüleri.

(a:Kontrol; b:%1; c:%5; d:%10; e:%25)

Çizelge 3.6'da arı sütü-kestane balı karışımının A549 hücrelerinde neden olduğu genotoksik ve antigenotoksik etkilerine ilişkin deney sonuçları verilmiştir. İstatistiksel analizler sonucunda negatif kontrol grubu ile kıyaslandığında RJ-CH karışımının tüm konsantrasyonlarda DNA hasarında artışa sebep olduğu ancak bu artışın %10 konsantrasyonunda istatistiksel olarak anlamlı olduğu ($p<0,05$); %1, %5 ve %25 konsantrasyonlarının ise anlamlı olmadığı ($p>0,05$) görülmüştür. Şekil 3.15'te A549 hücrelerinin genotoksikite Comet testi görüntüleri verilmiştir.

Yapılan istatistiksel analizler sonucunda RJ-CH karışımının H_2O_2 ile hasara uğratılmış A549 hücreleri üzerindeki antigenotoksik etkisi pozitif kontrol grubu ile kıyaslandığında RJ-CH karışımının yalnızca %1 konsantrasyonunda hücrelerde oluşan DNA hasarında istatistiksel olarak anlamlı bir azalma gösterdiği ($p<0,05$); %5, %10 ve %25 konsantrasyonlarının ise istatistiksel olarak anlamlı bir artış gösterdiği ($p<0,05$) belirlenmiştir.

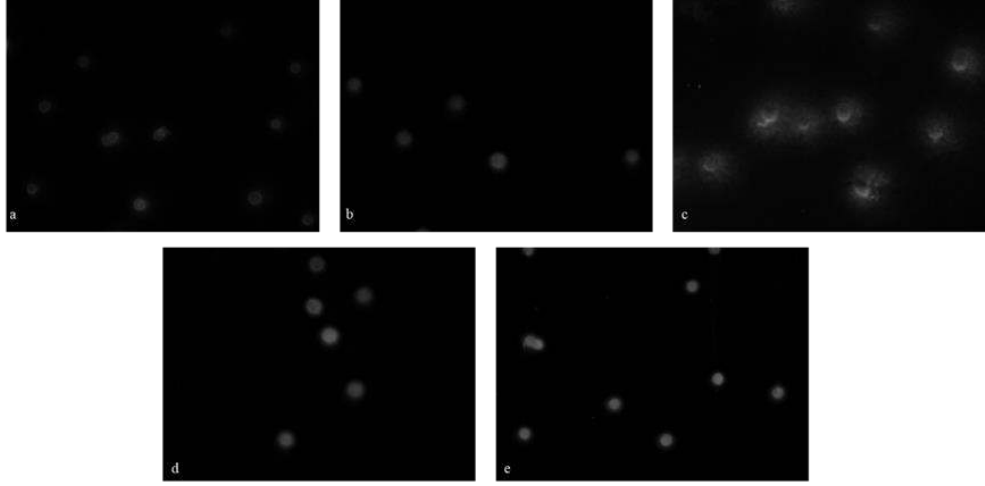
Çizelge 3.6 : RJ-CH karışımının A549 hücreleri üzerinde genotoksik ve antigenotoksik etkisine ilişkin bulgular.

Gruplar	Kuyruk Uzunluğu Ortalama (±standart hata)	Kuyruk Yoğunluğu Ortalama (±standart hata)	Kuyruk Momenti Ortalama (±standart hata)
Negatif Kontrol	43,853±1,022	15,312±1,175	2,795±0,271
%1 RJ-CH	42,566±1,125	17,050±1,391	2,998±0,364
%5 RJ-CH	45,682±1,293	17,728±1,475	3,936±0,503
%10 RJ-CH	56,761±2,103 ^a	25,007±1,847 ^a	6,573±0,768 ^a
%25 RJ-CH	47,779±1,511	17,870±1,326	3,997±0,231
Pozitif Kontrol	48,624±1,264 ^a	35,286±1,771 ^a	8,470±0,571 ^a
H ₂ O ₂ + %1 RJ-CH	43,299±1,022	28,714±2,004 ^{a,b}	6,783±0,577
H ₂ O ₂ + %5 RJ-CH	51,722±1,426 ^{a, b}	41,836±1,954 ^{a,b}	11,244±0,742 ^{a,b}
H ₂ O ₂ + %10 RJ-CH	54,086±1,205 ^{a, b}	46,771±1,824 ^{a,b}	11,984±0,601 ^{a,b}
H ₂ O ₂ + %25 RJ-CH	57,748±1,624 ^{a, b}	43,940±2,004 ^{a,b}	12,902±0,859 ^{a,b}

Sonuçlar iki çalışmanın ortalama değeri ± standart hata olarak verilmiştir.

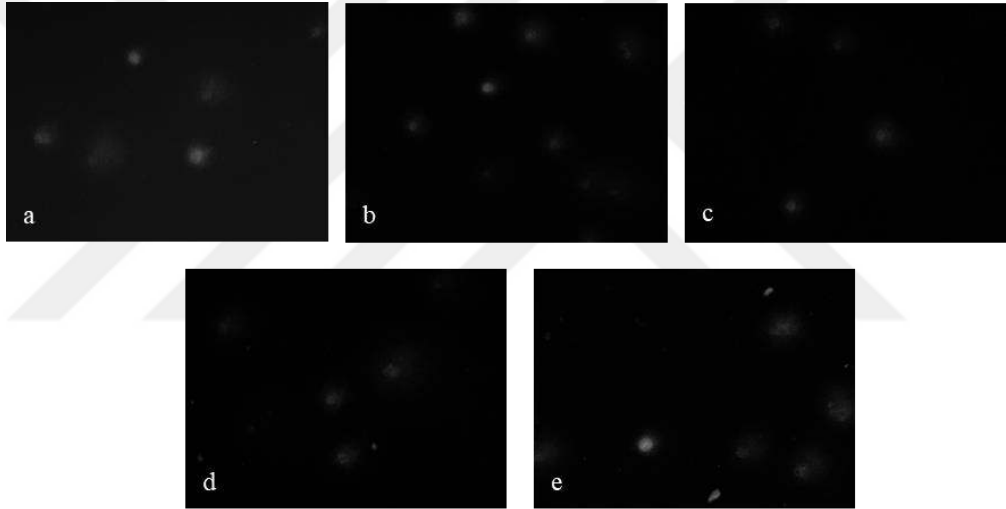
a Negatif kontrole göre p<0,05 düzeyinde anlamlı

b Pozitif kontrole göre p<0,05 düzeyinde anlamlı



Şekil 3.15 : A549 hücrelerinin genotoksisite Comet Testi görüntüleri

(a:Kontrol; b:%1; c:%5; d:%10; e:%25)



Şekil 3.16 : A549 hücrelerinin antigenotoksisite Comet Testi görüntüleri

(a:Kontrol; b:%1; c:%5; d:%10; e:%25)

Genetik toksikoloji, hücrelerin DNA ve kromozomlarına zarar verebilecek ajanların incelenmesidir. Ökaryotik organizmalarda somatik hücrelerdeki genetik hasar maligniteye yol açabilir. Eşey hücrelerinde üremeyi olumsuz etkileyebilir veya kalıtsal mutasyonları tetikleyebilir. Sonuç olarak, bir bileşiğin genotoksisitesini araştırmak, genellikle kanserojenlik mekanizmasını anlamaya çalışmak bağlamında yürütülür. Genotoksisitenin araştırılması, yeni bir bileşiğin kanserojen ve/veya mutajen olup olmadığının değerlendirilmesinde de önemlidir ve bu süreç, hücreler için temel tehlike tanımlama sürecine katkıda bulunur (Phillips ve Arlt, 2009).

Bu tez çalışmasında arı sütü ve kestane balı karışımının BEAS-2B ve A549 hücre hatları üzerindeki genotoksik ve antigenotoksik etkilerini belirlemek için Comet testi kullanılmıştır.

Comet testi (Tek hücre jel elektroforezi), yeni ilaç adaylarının güvenliğini değerlendirmek için bir genotoksisite testi olarak kullanılmaktadır. Yeni kimyasalların veya farmasötiklerin erken ve güvenilir genotoksisite taraması için değerli bir araçtır. Tek hücre jel elektroforezi, çeşitli uygulamalarla DNA hasarını ve onarımını incelemek için yararlı bir tekniktir. Bu mikrojel elektroforez tekniğinde, bir mikroskop lamı üzerinde ince bir agaroz jel içinde süspanse edilen az sayıda hücre parçalanır, elektroforeze tabi tutulur ve bir floresan DNA bağlayıcı boya ile boyanır. Artan DNA hasarına sahip hücreler, elektroforezde çekirdekten anoda doğru, bir kuyruklu yıldızın şeklini andıran kromozomal DNA'nın artan göçünü gösterir (Speit and Hartmann, 2006).

Comet analizinde, hücreler tek tek halde mikroskop lamı üzerinde agaroz içine gömülür, pH 10.0'da deterjan ve yüksek bir tuz konsantrasyonu ile parçalanır ve daha sonra pH>13.0 olan alkali koşullar altında kısa bir süre elektroforeze tabi tutulur. Lizis sırasında, yüksek oranda süper sarmallı deoksiribonükleik asit (DNA) içeren nükleoidler dışındaki hücre içerikleri çıkarılır. Alkaliye yerleştirildiğinde, DNA ipliği kopma bölgelerinden gevşemeye başlar, böylece daha fazla DNA hasarı olan hücreler, DNA'nın nükleoidlerden anoda doğru göçünü artırarak bir “kuyruklu yıldız” görünümü verir. Nükleoidler floresan bir DNA bağlayıcı boya ile boyanır, floresan mikroskobu ile görselleştirilir ve DNA hasarı görüntü analizi veya görsel puanlama ile ölçülür (Žegura ve Filipič, 2004).

Literatürde sütü ve kestane balı karışımının genotoksik ve antigenotoksik etkisini araştıran çalışma olmayıp; yalnızca arı sütünün veya diğer arı ürünlerinin genotoksik ve antigenotoksik etkileri ile ilgili çalışmalar bulunmaktadır.

Galaly ve diğ. (2014) arı sütünün (RJ), epilepsinin hem jeneralize hem de parsiyel nöbetleri için yaygın olarak kullanılan bir antiepileptik ilaç olan Valproik asit (VPA) ile indüklenen genotoksisite ve nefrotoksisite üzerindeki anti-mutajenik ve anti-histopatolojik etkilerini araştırmak için erkek albino fareler üzerinde çalışmalar yapmıştır. Farelerin 21 gün boyunca 50, 100 ve 200 mg/kg konsantrasyonlarında VPA ile eş zamanlı olarak RJ ile tedavisi, 50 ve 100 mg/kg konsantrasyonları için

kromozomal anormalliklerde önemli azalma ve mitotik indekste ($P<0,05$) yükselme ile böbrek dokularındaki histolojik değişikliklerin azalmasıyla tek başına VPA ile tedavi edilenlere kıyasla daha iyi bir koruma göstermiştir. 50 ve 100 mg/kg konsantrasyonlarında RJ, iyileştirici etkiyi uygulamada daha güçlü görüldüğü bildirilmiştir.

Çavuşoğlu ve diğ. (2009), RJ ile takviyenin albino farelerde Kadmiyum'un neden olduğu genotoksisite ve oksidatif hasarlara karşı yararlı etkiler yarattığını ve indüklenen kromozomal aberasyonlar üzerinde koruyucu bir etkiye sahip olduğunu belirtmiştir. El-Nekeety ve ark. (2007), arjinin fumonisin toksik tehlikelerine karşı potansiyel koruyucu etkisini belirlemiş, RJ'nin glutatyon peroksidaz oluşumunun artmasına ve lipid peroksidasyonunun ve serbest radikal oluşumunun baskılayıcı etkilerine ek olarak oksijen radikali temizleyici ve antioksidan özelliklere sahip olduğunun kanıtlandığını belirtmiştir. Ayrıca, Abd El-Monem (2011), arı sütünün antioksidan durumda önemli bir iyileşmeye ve malondialdehit üretiminin önemli bir inhibisyonuna neden olduğunu ve malathion tarafından indüklenen DNA hasarını ve genotoksisiteyi iyileştirdiğini ortaya koymuştur.

Ali Acar (2021) sodyum benzoatın potansiyel toksik etkilerine karşı arı sütünün (RJ) koruyucu rolünü, *Allium cepa* L. test materyali üzerinde araştırmıştır. Sodyum benzoat (100 mg/L), RJ (25 mg/L ve 50 mg/L konsantrasyonları) ve sodyum benzoat-RJ kombinasyonları ile muamele sonucunda uygulama konsantrasyonuna bağlı olarak, RJ'nin sodyum benzoat kaynaklı DNA hasarını azalttığı ve kuyruk DNA, kuyruk momenti ve Olive kuyruk momenti yüzdesinde bir azalmaya neden olduğu görülmüştür. Antimutajenik etki, kuyruk DNA yüzdesindeki azalma ile değerlendirilmiş ve RJ uygulamalarının sodyum benzoat genotoksisitesine karşı antimutajenik etkisi 25 mg/L için %41,22 ve 50 mg/L için %57,33 olarak belirlenmiştir. DNA hasarının nedeninin, sodyum benzoatın neden olduğu oksidatif strese bağlı olabileceği ve hasardaki azalmanın, RJ uygulamasının DNA onarım süreçleri ile etkileşiminden kaynaklanıyor olabileceği bildirilmiştir.

Türkmen ve diğ. (2009) arı sütü'nün (RJ) *Allium cepa* L. kök ucu hücrelerinde petrol atık sularının neden olduğu genotoksisite ve lipid peroksidasyonu üzerindeki koruyucu etkisini araştırmıştır. Genotoksisite ve lipid peroksidasyonunu belirlemek için malondialdehit (MDA) düzeyi, mitotik indeks (MI), mikronükleus sıklığı (MN) ve kromozomal anormallikleri (KA) testleri uygulanmıştır. Hücreler, ardışık 10 gün

boyunca yalnızca atık su, yalnızca RJ (25 ve 50 µm konsantrasyonlar) ve RJ + atık su ile muamele edilmiştir. Atık suya maruz kalma, KA'larda ve MN oluşumunda önemli bir artışa neden olurken; MI'da bir azalmaya neden olduğu ve atık suya maruz kalan köklerin MDA seviyelerinde önemli bir artış olduğu gözlenmiştir. Petrol atık suyundaki ağır metaller, lipid peroksidasyonunu gösteren MDA üretimini önemli ölçüde artırmıştır. Test edilen her bir RJ konsantrasyonunun (25-50 µm) atık su toksisitesine karşı koruma sağladığı ve en güçlü koruyucu etkinin 50 µm konsantrasyonunda gözlemlendiği bildirilmiştir. *In vivo* sonuçlar, arı sütünün petrol atık sularının neden olduğu toksisiteye karşı potansiyel bir koruyucu olduğunu ve koruyucu rolünün konsantrasyona bağımlı olduğunu göstermiştir.

Fahmy ve diğ. (2015) bir bal arısı ürünü karışımının (bal, arı sütü ve polen taneleri) antikanser ilacı siklofosfamidin (CP) neden olduğu genotoksisiteye karşı koruyucu rolünü değerlendirmek için çalışma yapmıştır. Farelere CP enjekte edildikten sonra, bal arısı ürünleri karışımı, insanların günlük alımına tam olarak eşdeğer bir konsantrasyonda 5, 10 ve 15 günlük farklı sürelerde ağızdan verilmiştir. Sonuçlar, bal karışımının CP'nin genotoksik yan etkilerini iyileştirdiğini ortaya koymuştur. Kromozomal anormallikleri, CP uygulanan grupta % 25,20±1,30'a ulaşırken, 15 gün boyunca bal karışımı ile ön işlem görmüş CP grubunda bu değer yarısı %12,30±0,54'e ulaşılmıştır. Bal arısı ürünlerinin karışımının, antikanser ilacı CP'nin genotoksik yan etkilerini en aza indirmek için kemopreventif ajan olarak kullanılabileceği ve bunun için alanı açabileceği sonucuna varmıştır.

Yapılan literatür araştırmaları doğrultusunda arı sütü ve kestane balı karışımının kullanımıyla ilgili çalışma bulunmadığı ve yalnızca arı sütünün hücrelerde meydana gelen genetik hasarı iyileştirici etki gösterdiği görülmüştür. RJ-CH karışımının BEAS-2B ve A549 hücre hatları üzerindeki genotoksik ve antigenotoksik etkisini belirlemek için Comet yöntemi kullanılmış ve kuyruk yoğunluğu parametresine göre değerlendirme yapılmıştır. Buna göre karışımın, her iki hücre hattı için de %10 konsantrasyonunda genotoksik etkiye neden olduğu belirlenmiştir. Bunun yanısıra karışımın BEAS-2B hücreleri için %1, %5 ve %25 konsantrasyonlarının; A549 hücreleri için de %1 konsantrasyonunun antigenotoksik etki gösterdiği tespit edilmiştir. Yapılan değerlendirmelere göre RJ-CH karışımının H₂O₂ ile indiklenmiş DNA hasarını onarmada

4. SONUÇ VE ÖNERİLER

Son zamanlarda doğal ürünlerin hastalıkların tedavisinde kullanımına olan ilgi oldukça artmıştır. Bu artış, araştırmacıları birçok arı ürününün tedavi yöntemi olarak kullanıldığı apiterapiye yönlendirmektedir. Bal, arı sütü, polen ve propolis gibi arı ürünleri antitümöral, antiinflamatuvar, antimikrobiyal, antioksidan gibi birçok biyolojik özelliklere sahiptir. Bu ürünlerin ayrı ayrı kullanımına dair eski zamanlardan beri birçok çalışma yapılmıştır. Son çalışmalarda ise bu ürünlerin kombinasyon halinde kullanımının biyolojik aktivitelerini arttırdığına dair kanıtlar bulunmaktadır.

Bu tez çalışmasında arı sütü ve kestane balı karışımının toplam fenolik içeriği, antioksidan aktivitesi, Gram (+) ve Gram (-) bakteri, maya ve küfler üzerindeki antimikrobiyal aktivitesinin yanı sıra sağlıklı insan akciğer epitelyal hücre hattı (BEAS-2B) ve akciğer kanseri hücre hattı (A549) üzerindeki sitotoksik ve genotoksik aktiviteleri araştırılmıştır.

Folin-Cioaltea yöntemi ile yapılan test sonuçlarına göre RJ-CH karışımının toplam fenolik içeriği $74 \pm 3,86$ mg GAE/100 g olarak; antioksidan aktiviteyi belirlemek için yapılan FRAP ve ABTS testlerine göre karışımın antioksidan aktivite değerleri $381,9 \pm 23,55$ μ M TE/100 g ve $506 \pm 4,38$ μ M TE/100 g olarak belirlenmiştir.

Antimikrobiyal aktivitenin belirlenmesinde; agar kuyucuk difüzyon ve sıvı mikrodilüsyon yöntemleri kullanılmıştır. En yüksek MBK değerine sahip olan *S. aureus*'un karışıma en dirençli bakteri olduğu görülürken; en düşük MBK değerine sahip bakterilerin *S. epidermis* ve *L. monocytogenes*'in karışıma en duyarlı bakteriler olduğu saptanmıştır. Karışımın MİK/MFK değerleri incelendiğinde; RJ-CH karışımının test mayalarına karşı küflerden daha yüksek antifungal aktivite gösterdiği belirlenmiştir.

Nötral kırmızısı alım (NKA) ve 3-(4,5-dimetiltiyazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür (MTT) yöntemleri kullanılarak değerlendirilen sitotoksik aktivite bulgularına

göre karışımın test edilen konsantrasyonlarda (%0,5, %1, %5, %10, %25, %50 mg/ml) her iki hücre hattı için de sitotoksik olmadığı belirlenmiştir.

Genotoksik aktiviteyi belirlemek için Comet testi uygulanmış ve DNA hasarı ölçümüne yönelik veriler değerlendirildiğinde arı sütü-kestane balı karışımının A549 ve BEAS-2B hücreleri için yalnızca %10 konsantrasyonunda muamelesiz kontrol grubuna kıyasla genotoksik etki gösterdiği sonucuna varılmıştır.

Antigenotoksik aktiviteyi belirlemek için hücreler H₂O₂ ile DNA hasarına uğratılmış ve Comet testi uygulanmıştır. Sonuçlara göre RJ-CH karışımı A549 hücrelerinde yalnızca %1 konsantrasyonunda DNA hasarını onarırken; BEAS-2B hücrelerinde %1, %5 ve %25 konsantrasyonlarında DNA hasarını onardığı belirlenmiştir.

Literatür incelemelerimiz sonucunda arı sütü ve kestane balının biyolojik aktiviteleriyle ilgili bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu tez çalışmasında arı sütü kestane bali karışımının biyolojik aktivitesi ilk kez çalışılmıştır ve bu sonuçların gelecek çalışmalar için önemli olacağı düşünülmektedir. Karışımın biyolojik aktivitesine yönelik daha fazla *in vitro* ve *in vivo* çalışma planlanması ve kimyasal içeriğinin araştırılması her ikisi de güçlü aktivitelere sahip bu iki ürünün karışımının etkisini daha net ortaya koyacaktır. Böylelikle, karışımın hücreler üzerindeki etki mekanizması daha net bir şekilde açıklanabilecektir. Devam eden araştırmalarda farklı kanser hücre hatları üzerindeki etkisinin karşılaştırılması yapılabileceği gibi farklı test yöntemleri kullanılarak testler arası farklılıkların da belirlenebileceği düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

- Abandansari, Rouzbeh Mohammadi.** (2018). Effect of Simultaneous Treatment with Royal Jelly and Doxorubicin on the Survival of the Prostate Cancer Cell Line (PC3): An *in Vitro* Study, *International Journal of Cancer Management*, 11(4).
- Abdelatif, M, M Yakoot, and M Etmaan.** (2008). Safety and Efficacy of a New Honey Ointment on Diabetic Foot Ulcers: A Prospective Pilot Study, *Journal of wound care*, 17(3): 108–10.
- Abd El-Monem, D. D., & Abd, D.** (2011). The Ameliorative Effect of Royal Jelly against Malathion Genotoxicity in Bone Marrow and Liver of Rat. *Journal of American Science*, 7(January), 1251–1256.
- Abu-Serie, Marwa M., and Noha H. Habashy.** (2019). Two Purified Proteins from Royal Jelly with *in Vitro* Dual Anti-Hepatic Damage Potency: Major Royal Jelly Protein 2 and Its Novel Isoform X1, *International Journal of Biological Macromolecules*, 128:782–95.
- Acar, Ali.** (2021). Correction to: Therapeutic Effects of Royal Jelly against Sodium Benzoate Induced Toxicity: Cytotoxic, Genotoxic and Biochemical Assessment, *Environmental Science and Pollution Research*, 28:34410–34425.
- Adams, Seray.** (2012). The Kynurenine Pathway in Brain Tumor Pathogenesis, *Cancer research*, 72(22): 5649–57.
- Adjare, M.,** (1990). Beekeeping in Africa, *FAO Agricultural Series*, Bulletin 68(6):130.
- Ahmad, Saboor, Maria Graça Campos, Filippo Fratini, Solomon Zewdu Altaye, and Jianke Li.** (2020). New Insights into the Biological and Pharmaceutical Properties of Royal Jelly, *International Journal of Molecular Sciences*, 21(2).
- Albert, Štefan, Jaroslav Klaudiny, and Jozef Šimúth.** (1999). Molecular Characterization of MRJP3, Highly Polymorphic Protein of Honeybee (*Apis Mellifera*) Royal Jelly, *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 29(5), 427–34.

- Alissandrakis, Eleftherios, Petros A. Tarantilis, Christos Pappas, Pashalis C. Harizanis, and Moshos Polissiou.** (2011). Investigation of Organic Extractives from Unifloral Chestnut (*Castanea Sativa* L.) and Eucalyptus (*Eucalyptus Globulus Labill.*) Honeys and Flowers to Identification of Botanical Marker Compounds, *LWT - Food Science and Technology*, 44(4):1042–51.
- Al-Abbadi, Amal A.** (2019). Antimicrobial Potential of Royal Jelly against Some Pathogenic Bacteria and Fungi, *Jordan Journal of Biological Sciences*, 12(4): 445–51.
- Al-Duais, M., Müller, L., Böhm, V., & Jetschke, G.** (2009). Antioxidant capacity and total phenolics of *Cyphostemma digitatum* before and after processing: Use of different assays. *European Food Research and Technology*, 228(5), 813–821.
- Al-Jabri, Ali.** (2006). Honey, Milk and Antibiotics, *African Journal of Biotechnology*, 4:1580–87.
- Alkan, Perihan Erkan.** (2020). Pollen Analysis of Chestnut Honey in Some Provinces of the Black Sea, *Mellifera*, 20(2):18–31.
- Amira, Mohammed Ali, and Omar Hendawy Amin.** (2019). Royal Jelly Acid, 10-Hydroxy-Trans-2-Decenoic Acid for Psychiatric and Neurological Disorders: How Helpful Could It Be?!, *Edelweiss Journal of Food Science and Technology*, (1):1–4.
- Antinelli, Jean François, Sarah Zeggane, Renée Davico, Catherine Rognone, Jean Paul Faucon, and Louise Lizzani.** (2003). Evaluation of (E)-10-Hydroxydec-2-Enoic Acid as a Freshness Parameter for Royal Jelly, *Food Chemistry*, 80(1):85–89.
- Atalay, Kursat, Kubra Serefoglu Cabuk, Ahmet Kirgiz, and Aysel Kara Caglar.** (2019). Treatment of Corneal Alkali Burn with Chestnut Honey, Royal Jelly, and Chestnut Honey-Royal Jelly Combination, *Beyoglu Eye Journal*, 4(3):196–201.
- Bacanli, Merve, Hatice Gül Anlar, A. Ahmet Başaran, and Nurşen Başaran.** (2017). Fenoliklerin Sitotoksosite Profillerinin Değerlendirilmesi: Farklı Hücrelerde Farklı Zaman Aralıklarında Nötral Kırmızı ve MTT Yöntemlerinin Karşılaştırılması, *Turkish Journal of Pharmaceutical Sciences*, 14(2):95–107.
- Balkanska, Ralitsa, Liviu-Alexandru Marghitas, and Crenguta Ioana Pavel.** (2017). Antioxidant Activity and Total Polyphenol Content of Royal Jelly from Bulgaria, *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 6(10):578–85.

- Balouiri, Mounyr, Moulay Sadiki, and Saad Koraichi Ibensouda.** (2016). Methods for in Vitro Evaluating Antimicrobial Activity: A Review, *Journal of Pharmaceutical Analysis*, 6(2):71–79.
- Bălan, Andreea.** (2020). Royal Jelly — A Traditional and Natural Remedy for Postmenopausal Symptoms and Aging-Related Pathologies, *Molecules*, 25(14).
- Bărnăuțiu, Lavinia Ioana, Liviu Al. Mărghițaș, Daniel S. Dezmirean, Cristina Manuela Mihai, and Otilia Bobiș.** (2011). Chemical Composition and Antimicrobial Activity of Royal Jelly – Review, *Scientific Papers Animal Science and Biotechnologies*, 44(2):67–72.
- Bee Products-Chemical and Biological Properties.*** (2017). Alvarez-Suarez, José M.
- Bengü, Aydın Şükrü, Adnan Ayna, Sedanur Özbolat, Abdullah Tunç, and Gürkan Aykutoğlu.** (2020). Content and Antimicrobial Activities of Bingöl Royal Jelly Bingöl Arı Sütünün İçeriği ve Antimikrobiyal Aktivitesi, *Türk Tarım ve Doğa Bilimleri Dergisi*, 7:1–7.
- Berridge, Michael V, Patries M Herst, and An S Tan.** (2005). Tetrazolium Dyes as Tools in Cell Biology: New Insights into Their Cellular Reduction, *Biotechnology annual review*, 11: 127–52.
- Bíliková, K., J. Hanes, E. Nordhoff, W. Saenger, J. Klaudiny, and J. Šimúth.** (2002). Apisimin, a New Serine-Valine-Rich Peptide from Honeybee (*Apis Mellifera* L.) Royal Jelly: Purification and Molecular Characterization, *FEBS Letters*, 528(1–3):125–29.
- Bílikova, Katarina, Sheng-Chang Huang, I. Ping Lin, Jozef Šimúth, and Chi-Chung Peng.** (2015). Structure and Antimicrobial Activity Relationship of Royalisin, an Antimicrobial Peptide from Royal Jelly of *Apis Mellifera*, *Peptides*, 68:190–96.
- Bitensky, Lucille.** (2008). The Reversible Activation of Lysosomes in Normal Cells and the Effects of Pathological Conditions, *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine*, 362–83.
- Blum, Murray S., Arthur F. Novak, and Stephen Taber.** (1959). 10-Hydroxy- Δ^2 -Decenoic Acid, an Antibiotic Found in Royal Jelly, *Science*, 130(3373): 452–53.
- Bonaga, Giorgio, Angelo G. Giumanini, and Grazia Gliozzi.** (1986). Chemical Composition of Chestnut Honey: Analysis of the Hydrocarbon Fraction, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 34(2):319–26.
- Bonvehí, Josep, and Francesc Ventura-Coll.** (2003). Flavour Index Aroma Profiles of Fresh and Processed Honeys, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 83:275–82.

- Borenfreund, Ellen, and James A. Puerner.** (1985). A Simple Quantitative Procedure Using Monolayer Cultures for Cytotoxicity Assays (HTD/NR-90), *Journal of Tissue Culture Methods*, 9(1):7–9.
- Boukraa, Laïd.** (2008a). Additive Activity of Royal Jelly and Honey against *Pseudomonas aeruginosa*, *Alternative Medicine Review*, 13(4): 330–33.
- Boukraâ, Laïd, Abdellatif Niar, Hama Benbarek, and Mokhtar Benhanifia.** (2008b). Additive Action of Royal Jelly and Honey against *Staphylococcus aureus*, *Journal of medicinal food*, 11(1): 190–92.
- Boukraâ, Laïd, Abdelmalek Meslem, Mokhtar Benhanifia, and Si Mohamed Hammoudi.** (2009). Synergistic Effect of Starch and Royal Jelly against *Staphylococcus Aureus* and *Escherichia Coli*, *Journal of Alternative and Complementary Medicine*, 15(7): 755–57.
- Bratko Filipič.** (2016). Water Soluble Propolis and Royal Jelly Enhance the Antimicrobial Activity of Honeys and Promote the Growth of Human Macrophage Cell Line, *Journal of Agricultural Science and Technology B*, 6(1).
- Buttstedt, Anja, Carmen I. Mureșan, Hauke Lilie, Gerd Hause, Christian H. Ihling, Stefan H. Schulze, Markus Pietzsch, and Robin F. A. Moritz.** (2018). How Honeybees Defy Gravity with Royal Jelly to Raise Queens, *Current Biology*, 28(7):1095-1100.
- Buttstedt, Anja, Christian H. Ihling, Markus Pietzsch, and Robin F. A. Moritz.** (2016). Royalactin Is Not a Royal Making of a Queen, *Nature*, 537(7):E10–12.
- Buttstedt, Anja, Robin F. A. Moritz, and Silvio Erler.** (2013). More than Royal Food - Major Royal Jelly Protein Genes in Sexuals and Workers of the Honeybee *Apis Mellifera*, *Frontiers in Zoology*, 10(1):1–10.
- Can, Zehra, Oktay Yildiz, Huseyin Sahin, Emine Akyuz Turumtay, Sibel Silici, and Sevgi Kolayli.** (2015). An Investigation of Turkish Honeys: Their Physico-Chemical Properties, Antioxidant Capacities and Phenolic Profiles, *Food Chemistry*, 180:133–41.
- Celebioglu, Hasan Ufuk.** (2020). Probiotic Bacteria Grown with Chestnut Honey Enhance In vitro Cytotoxicity on Breast and Colon Cancer Cells, *Archives of Biological Sciences*, 72(3):329–38.
- Chen, Wen-Lian, Yue-Ying Wang, Aihua Zhao, Li Xia, Guoxiang Xie, Mingming Su, Linjing Zhao, Jiajian Liu, Chun Qu, Runmin Wei, Cynthia Rajani, Yan Ni, Zhen Cheng, Zhu Chen, Sai-Juan Chen, and Wei Jia.** (2016). Enhanced Fructose Utilization Mediated by SLC2A5 Is a Unique Metabolic Feature of Acute Myeloid Leukemia with Therapeutic Potential, *Cancer Cell*, 30(5):779–91.

- Chen, Yi Fan, Meng Meng You, Yi Chen Liu, Yi Zhen Shi, Kai Wang, Yuan Yuan Lu, and Fu Liang Hu.** (2018). Potential Protective Effect of Trans-10-Hydroxy-2-Decenoic Acid on the Inflammation Induced by Lipoteichoic Acid, *Journal of Functional Foods*, 45(3):491–98.
- Cheraghi, Omid, Mina Abdollahpourasl, Aysa Rezabakhsh, and Reza Rahbarghazi.** (2018). Distinct Effects of Royal Jelly on Human Endothelial Cells under High Glucose Condition, *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, 17(4): 1361–70.
- Ciulu, Marco, Silvia Solinas, Ignazio Floris, Angelo Panzanelli, Maria I. Pilo, Paola C. Piu, Nadia Spano, and Gavino Sanna.** (2011). RP-HPLC Determination of Water-Soluble Vitamins in Honey, *Talanta*, 83(3):924–29.
- Cornara, Laura, Marco Biagi, Jianbo Xiao, and Bruno Burlando.** (2017). Therapeutic Properties of Bioactive Compounds from Different Honeybee Products, *Frontiers in Pharmacology*, 8(9).
- Çavuşoğlu, Kültiğin, Kürşad Yapar, and Emine Yalçın.** (2009). Royal Jelly (Honey Bee) Is a Potential Antioxidant against Cadmium-Induced Genotoxicity and Oxidative Stress in Albino Mice, *Journal of Medicinal Food*, 12(6):1286–92.
- Dinkov, Dinko, Deyan Stratev, Ralitsa Balkanska, Daniel Sergelidis.** (2016a). Reduction Effect of Royal Jelly and Rape Honey Alone and in Combination against Methicillin-Resistant *Staphylococcus Aureus* (MRSA) Strains, *Journal of Bacteriology and Virology*, 46(1): 36–43.
- Ecem Bayram, Nesrin, Nur Çebi, Saffet Çelik, Yusuf Can Gerçek, Sinan Bayram, Ash Elif Tanuğur Samancı, Osman Sağdıç, and Ash Özkök.** (2021). Turkish Royal Jelly: Amino Acid, Physicochemical, Antioxidant, Multi-Elemental, Antibacterial and Fingerprint Profiles by Analytical Techniques Combined with Chemometrics, *Journal of Apicultural Research*, 1–14.
- El-Gayar, Mona H., Khaled M. Aboshanab, Mohammad M. Aboulwafa, and Nadia A. Hassouna.** (2016). Antivirulence and Wound Healing Effects of Royal Jelly and Garlic Extract for the Control of MRSA Skin Infections, *Wound Medicine*, 13:18–27.
- El-Guendouz, Soukaïna, Alexandra M. Machado, Smail Aazza, Badiaâ Lyoussi, Maria G. Miguel, Maria C. Mateus, and A. Cristina Figueiredo.** (2020). Chemical Characterization and Biological Properties of Royal Jelly Samples From the Mediterranean Area, *Natural Product Communications*, 15(2)..
- El-Nekeety, Aziza A., Wafaa El-Kholy, Naglaa F. Abbas, Ahmad Ebaid, Hassan A. Amra, and Mosaad A. Abdel-Wahhab.** (2007). Efficacy of Royal

Jelly against the Oxidative Stress of Fumonisin in Rats, *Toxicon*, 50(2):256–69.

Eshraghi, S, and F Seifollahi. (2003). Antibacterial Effects of Royal Jelly on Different Strains of Bacteria, *Iranian Journal of Public Health*, 32(1): 25–30.

Eshtiyaghi, Mahbobeh, Hamid Deldar, Zarbakht Ansari Pirsaraei, and Bahram Shohreh. (2016). Royal Jelly May Improve the Metabolism of Glucose and Redox State of Ovine Oocytes Matured in Vitro and Embryonic Development Following in Vitro Fertilization, *Theriogenology*, 86(9): 2210–21.

Escuredo, O., Míguez, M., Fernández-González, M., & Carmen Seijo, M. (2013). Nutritional value and antioxidant activity of honeys produced in a European Atlantic area, *Food chemistry*, 138(3):851–856.

Ezz El-Arab, Aly M., Shenouda M. Girgis, Eman M. Hegazy, and Azzat B. Abd El-Khalek. (2006). Effect of Dietary Honey on Intestinal Microflora and Toxicity of Mycotoxins in Mice, *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 6:6.

Fahmy, Maha Aly, Nagwa Hassan Aly Hassan, Samia Ahmed El-Fiky, and Heba Gamal Elalfy. (2015). A Mixture of Honey Bee Products Ameliorates the Genotoxic Side Effects of Cyclophosphamide, *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*, 5(8):638–44.

Fontana, Renato. (2004). Jelleines: A Family of Antimicrobial Peptides from the Royal Jelly of Honeybees (*Apis Mellifera*), *Peptides*, 25(6): 919–28.

Fotakis, George, and John A. Timbrell. (2006). In Vitro Cytotoxicity Assays: Comparison of LDH, Neutral Red, MTT and Protein Assay in Hepatoma Cell Lines Following Exposure to Cadmium Chloride, *Toxicology Letters*, 160(2):171–77.

Fratellone, Patrick M., Flora Tsimis, and Gregory Fratellone. (2016). Apitherapy Products for Medicinal Use.” *Journal of Alternative and Complementary Medicine*, 22(12):1020–22.

Fratini, Filippo, Giovanni Cilia, Simone Mancini, and Antonio Felicioli. (2016). Royal Jelly: An Ancient Remedy with Remarkable Antibacterial Properties, *Microbiological Research*, 192:130–41.

Frey, Christian. (2007). Comparative Cytotoxicity of Alkyl Gallates on Mouse Tumor Cell Lines and Isolated Rat Hepatocytes, *Comparative biochemistry and physiology. Part A, Molecular & integrative physiology*, 146(4): 520–27.

Galaly, Sanaa R., Ehab M. Abdella, Hanaa M. Mohammed, and Sally M. khadrawy. (2014). Effects of Royal Jelly on Genotoxicity and

Nephrotoxicity Induced by Valproic Acid in Albino Mice, *Beni-Suef University Journal of Basic and Applied Sciences*, 3(1):1–15.

García, Mariana Celeste, Mónica Silvia Finola, and Juan Miguel Marioli. (2010). Antibacterial Activity of Royal Jelly against Bacteria Capable of Infecting Cutaneous Wounds, *Journal of ApiProduct and ApiMedical Science*, 2(3):93–99.

GARDNER, T. S. (1948). The Use of *Drosophila Melanogaster* as a Screening Agent for Longevity Factors; Pantothenic Acid as a Longevity Factor in Royal Jelly, *Journal of Gerontology*, 3(1):1–8.

Ghanbari, Elham, Vahid Nejati, and Mozafar Khazaei. (2016). Antioxidant and Protective Effects of Royal Jelly on Histopathological Changes in Testis of Diabetic Rats.” *International Journal of Reproductive BioMedicine*, 14(8): 511–18.

Gu, Hyejung. (2018). Antioxidant Activity of Royal Jelly Hydrolysates Obtained by Enzymatic Treatment.” *Korean Journal for Food Science of Animal Resources*, 38(1): 135–42.

Guyot, C., A. Bouseta, V. V Scheirman, and S. Collin. (1998). Floral Origin Markers of Chestnut and Lime Tree Honeys, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46(2):625–33.

Güneş, Mesut Ertan. (2017). Determination of Phenolic Compounds Profile in Chestnut and Floral Honeys and Their Antioxidant and Antimicrobial Activities, *Journal of Food Biochemistry*, 41(3): 1–12.

Han, Jianjun, Lu Zhang, Hui Guo, Weiya Z. Wysham, Dario R. Roque, Adam K. Willson, Xiugui Sheng, Chunxiao Zhou, and Victoria L. Bae-Jump. (2015). Glucose Promotes Cell Proliferation, Glucose Uptake and Invasion in Endometrial Cancer Cells via AMPK/MTOR/S6 and MAPK Signaling, *Gynecologic Oncology*, 138(3):668–75.

Han, Bin. (2014). In-Depth Phosphoproteomic Analysis of Royal Jelly Derived from Western and Eastern Honeybee Species, *Journal of Proteome Research*, 13(12): 5928–43.

Hattori, Noriko, Hiroshi Nomoto, Hidefumi Fukumitsu, Satoshi Mishima, and Shoei Furukawa. (2007a). Royal Jelly and Its Unique Fatty Acid, 10-Hydroxy-Trans-2-Decenoic Acid, Promote Neurogenesis by Neural Stem/Progenitor Cells in Vitro, *Biomedical Research*, 28(5):261–66.

Hattori, Noriko, Hiroshi Nomoto, Hidefumi Fukumitsu, Satoshi Mishima, and Shoei Furukawa. (2007b). Royal Jelly-Induced Neurite Outgrowth from Rat Pheochromocytoma PC12 Cells Requires Integrin Signal Independent of Activation of Extracellular Signal-Regulated Kinases, *Biomedical Research*, 28(3):139–46..

- Husein, M Q, and R T Kridli.** (2002). Reproductive Responses Following Royal Jelly Treatment Administered Orally or Intramuscularly into Progesterone-Treated Awassi Ewes, *Animal Reproduction Science*, 74(1): 45–53.
- Imtara, Hamada.** (2019). Chemical Analysis and Cytotoxic and Cytostatic Effects of Twelve Honey Samples Collected from Different Regions in Morocco and Palestine, *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine*, (10).
- Isidorov, V. A., S. Bakier, and I. Grzech.** (2012). Gas Chromatographic-Mass Spectrometric Investigation of Volatile and Extractable Compounds of Crude Royal Jelly, *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 885–886:109–16.
- Jamnik, Polona, Peter Raspor, and Branka Javornik.** (2012). A Proteomic Approach for Investigation of Bee Products: Royal Jelly, Propolis and Honey, *Food Technology and Biotechnology*, 50(3): 270–74.
- Jeffrey, Amy, and Carlos Echazarreta.** (1996). Medical Uses of Honey, *Rev. Biomed*, 7.
- Jerković, I., J. Mastelić, Z. Marijanović, Z. Klein, and M. Jelić.** (2007). Comparison of Hydrodistillation and Ultrasonic Solvent Extraction for the Isolation of Volatile Compounds from Two Unifloral Honeys of Robinia Pseudoacacia L. and Castanea Sativa L., *Ultrasonics Sonochemistry*, 14(6):750–56.
- Jiang, Yan, Yong Pan, Patrea R. Rhea, Lin Tan, Mihai Gagea, Lorenzo Cohen, Susan M. Fischer, and Peiying Yang.** (2016). A Sucrose-Enriched Diet Promotes Tumorigenesis in Mammary Gland in Part through the 12-Lipoxygenase Pathway, *Cancer Research*, 76(1):24–29.
- Jovanović, Milena.** (2018). Effects of Royal Jelly on Energy Status and Expression of Apoptosis and Biotransformation Genes in Normal Fibroblast and Colon Cancer Cells, *Kragujevac Journal of Science*, 40(40): 175–92.
- Kaku, Masaru.** (2014). Royal Jelly Affects Collagen Crosslinking in Bone of Ovariectomized Rats, *Journal of Functional Foods*, 7: 398–406.
- Kamakura, M., T. Fukuda, M. Fukushima, and M. Yonekura.** (2001). Storage-Dependent Degradation of 57-KDa Protein in Royal Jelly: A Possible Marker for Freshness, *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 65(2):277–84.
- Kamakura, Masaki.** (2002). Signal Transduction Mechanism Leading to Enhanced Proliferation of Primary Cultured Adult Rat Hepatocytes Treated with Royal Jelly 57-KDa Protein, *Journal of Biochemistry*, 132(6):911–19.
- Karaçelik, Ayça Aktaş, and Huseyin Sahin.** (2018). Determination of Enzyme Inhibition and Antioxidant Activity in Some Chestnut Honeys, *Foods*

- Khazaei, Mozafar, Atefe Ansarian, and Elham Ghanbari.** (2018). New Findings on Biological Actions and Clinical Applications of Royal Jelly: A Review, *Journal of Dietary Supplements*, 15(5):757–75.
- Kim, Bo Yeon, and Byung Rae Jin.** (2015). Apolipophorin III from Honeybees (*Apis Cerana*) Exhibits Antibacterial Activity, *Comparative Biochemistry and Physiology Part - B: Biochemistry and Molecular Biology*, 182:6–13.
- Kim, Bo Yeon, and Byung Rae Jin.** (2019). Antimicrobial Activity of the C-Terminal of the Major Royal Jelly Protein 4 in a Honeybee (*Apis Cerana*), *Journal of Asia-Pacific Entomology*, 22(2):561–64.
- Koca, I., B. Tekguler, B. Turkyilmaz, and B. Tasci.** (2018). Some Physical, Chemical and Antioxidant Properties of Chestnut (*Castanea Sativa* Mill.) Honey Produced in Turkey, *Acta Horticulturae*, 1220:227–33.
- Kodai, Tetsuya, Kazue Umebayashi, Takafumi Nakatani, Kaori Ishiyama, and Naoki Noda.** (2007). Compositions of Royal Jelly II. Organic Acid Glycosides and Sterols of the Royal Jelly of Honeybees (*Apis Mellifera*), *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 55(10):1528–31.
- Kolaylı, Sevgi, Rezzan Aliyazıcıoğlu, and Esra Ulusoy.** (2008). Antioxidant and Antimicrobial Activities of Selected Turkish Honeys, *Hacettepe Journal of Biology and Chemistry*, 36(2):163–72.
- Kolaylı, Sevgi, Zehra Can, Oktay Yildiz, Huseyin Sahin, and Sengul Alpaya Karaoglu.** (2016). A Comparative Study of the Antihyaluronidase, Antiurease, Antioxidant, Antimicrobial and Physicochemical Properties of Different Unifloral Degrees of Chestnut (*Castanea Sativa* Mill.) Honeys, *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 31:96–104..
- Koya-Miyata, Satomi.** (2004). Identification of a Collagen Production-Promoting Factor from an Extract of Royal Jelly and Its Possible Mechanism, *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 68(4): 767–73.
- Kropf, Urška, Mojca Korošec, Jasna Bertonec, Nives Ogrinc, Marijan Nečemer, Peter Kump, and Terezija Golob.** (2010). Determination of the Geographical Origin of Slovenian Black Locust, Lime and Chestnut Honey, *Food Chemistry*, 121(3):839–46.
- Kunčič, M. Kralj, D. Jaklič, A. Lapanje, and N. Gunde-Cimerman.** (2012). Antibacterial and Antimycotic Activities of Slovenian Honeys, *British Journal of Biomedical Science*, 69(4):154–58.
- Kunugi, Hiroshi, and Amira Mohammed Ali.** (2019). Royal Jelly and Its Components Promote Healthy Aging and Longevity: From Animal

Models to Humans, *International Journal of Molecular Sciences*, 20(19):1–26.

Kurdi, Lina, and Fatimah Alhusayni. (2019). Cytotoxicity Effect of 5-Fluorouracil and Bee Products on the HTC-116 Human Colon Cancer Cell Line in Vitro, *Life Science Journal*, 10(2): 19–26.

Kurth, T., S. Kretschmar, and A. Buttstedt. (2019). Royal Jelly in Focus, *Insectes Sociaux*, 66(1):81–89.

Küçük, Murat, Sevgi Kolaylı, Şengül Karaoğlu, Esra Ulusoy, Cemalettin Baltacı, and Ferda Candan. (2007). Biological Activities and Chemical Composition of Three Honeys of Different Types from Anatolia, *Food Chemistry*, 100(2):526–34.

Louveaux, J., Maurizio, A., Vorwohl, G. (1978). International commission for bee botany of IUBS, methods of melissopalynology, *Bee World*, 59:139–157.

Li, Xing’An, Chaoqun Huang, and Yunbo Xue. (2013). Contribution of Lipids in Honeybee (*Apis Mellifera*) Royal Jelly to Health, *Journal of Medicinal Food*, 16(2):96–102.

Lim, Su Wen, Hwei San Loh, Kang Nee Ting, Tracey Dawn Bradshaw, and Zeenathul Nazariah Allaudin. (2015). Reduction of MTT to Purple Formazan by Vitamin E Isomers in the Absence of Cells, *Tropical Life Sciences Research*, 26(1):111–20.

Maqsoudlou, Atefe. (2019). Peptide Identification in Alcalase Hydrolysed Pollen and Comparison of Its Bioactivity with Royal Jelly, *Food Research International*, 116(8): 905–15.

Maghsoudlou, Atefe, Alireza Sadeghi Mahoonak, Hossein Mohebodini, and Fidel Toldra. (2019). Royal Jelly: Chemistry, Storage and Bioactivities, *Journal of Apicultural Science*, 63(1):17–40.

Melliou, Eleni, and Ioanna Chinou. (2005). Chemistry and Bioactivity of Royal Jelly from Greece, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(23):8987–92.

Meteoglu, Irem. (2015). Chestnut Honey and Sherbet Enhance the Healing of Burn Wounds in Rat Model, *Clinical and Investigative Medicine*, 38(4): E267–73.

Miguel, M. G., M. D. Antunes, and M. L. Faleiro. (2017). Honey as a Complementary Medicine, *Integrative Medicine Insights*, 12:1–15.

Moghim, H., S. Taghipoor, N. Shahinfard, S. Kheiri, and R. Panahi. (2015). Antifungal Effects of Zataria Multiflora and Nigella Sativa Extracts

against *Candida Albicans*, *Journal of HerbMed Pharmacology*, 4:138–41.

Molan, P. C. (2006). The Evidence Supporting the Use of Honey as a Wound Dressing, *The International Journal of Lower Extremity Wounds*, 5(1):40–54.

Moniruzzaman, M., M. I. Khalil, S. A. Sulaiman, and S. H. Gan. (2012). Advances in the Analytical Methods for Determining the Antioxidant Properties of Honey: A Review, *African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines*, 9(1):36–42.

Moolenaar, Marieke, Robert Louwrens Poorter, Petrus Paulus Gerardus van der Toorn, Albert Willem Lenderink, Philip Poortmans, and Antonius Cornelis Gerardus Egberts. (2006). The Effect of Honey Compared to Conventional Treatment on Healing of Radiotherapy-Induced Skin Toxicity in Breast Cancer Patients, *Acta Oncologica*, 45(5):623–24.

Moselhy, W. A., A. M. Fawzy, and A. A. Kamel. (2013). An Evaluation of the Potent Antimicrobial Effects and Unsaponifiable Matter Analysis of the Royal Jelly, *Life Science Journal*, 10(2): 290–96.

Müller, L., Gnoyke, S., Popken, A. M., & Böhm, V. (2010). Antioxidant capacity and related parameters of different fruit formulations. *LWT - Food Science and Technology*, 43(6), 992–999.

Münstedt, Karsten, Matthias Bargello, and Annette Hauenschild. (2009). Royal Jelly Reduces the Serum Glucose Levels in Healthy Subjects, *Journal of medicinal food*, 12(5): 1170–72.

Nabas, Zaid, Malik S. Y. Haddadin, Jamal Haddadin, and Ibrahim K. Nazer. (2014). Chemical Composition of Royal Jelly and Effects of Synbiotic with Two Different Locally Isolated Probiotic Strains on Antioxidant Activities, *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*, 64(3):171–80.

Nagai, Takeshi, and Reiji Inoue. (2004). Preparation and the Functional Properties of Water Extract and Alkaline Extract of Royal Jelly, *Food Chemistry*, 84(2):181–86.

Narita, Yukio. (2006). Royal Jelly Stimulates Bone Formation: Physiologic and Nutrigenomic Studies with Mice and Cell Lines, *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 70(10): 2508–14.

Nasuti, Cinzia, Rosita Gabbianelli, Giancarlo Falcioni, and Franco Cantalamessa. (2006). Antioxidative and Gastroprotective Activities of Anti-Inflammatory Formulations Derived from Chestnut Honey in Rats, *Nutrition Research*, 26(3):130–37.

- Nogueira, Daniele Rubert, Montserrat Mitjans, M. Rosa Infante, and M. Pilar Vinardell.** (2011). Comparative Sensitivity of Tumor and Non-Tumor Cell Lines as a Reliable Approach for in Vitro Cytotoxicity Screening of Lysine-Based Surfactants with Potential Pharmaceutical Applications, *International Journal of Pharmaceutics*, 420(1):51–58.
- Oddo, Livia, Roberto Piro, Christian Flamini, Joel Lheritier, Harald Russmann, Werner Ohe, Panagiota Gotsiou, Sophia Karabournioti, Panagiotis Kefalas, Maria Passaloglou-Katrali, Andreas Thrasyvoulou, Gian Marcazzan, Maria Piana, Maria Piazza, Antonio Bentabol, and Stefan Bogdanov.** (2004). Main European Unifloral Honeys: Descriptive Sheets, *European Food Research And Technology*, 244(12):118-126.
- Oduwale, Olabisi, Martin M. Meremikwu, Angela Oyo-Ita, and Ekong E. Udoh.** (2014). Cochrane in Context: Honey for Acute Cough in Children, *Evidence-Based Child Health : A Cochrane Review Journal*, 9(2):444–45.
- Okamoto, Iwao.** (2003). Major Royal Jelly Protein 3 Modulates Immune Responses in Vitro and in Vivo, *Life Sciences*, 73(16): 2029–45.
- Okumura, Nobuaki.** (2018). Royal Jelly Delays Motor Functional Impairment During Aging in Genetically Heterogeneous Male Mice, *Nutrients*, 10(9).
- Oliveira, Ana.** (2018). Chestnut Honey and Bacteriophage Application to Control *Pseudomonas Aeruginosa* and *Escherichia Coli* Biofilms: Evaluation in an Ex Vivo Wound Model, *Frontiers in Microbiology*, 9(6): 1–13.
- Özkök, Ashi, Esin Akbay, Ashi Elif Tanuğur Samancı, Nazlı Mayda, and Mehmet Ali Onur.** (2021). Evaluation of Bioactive Compounds and Proliferation Properties of Different Royal Jelly Samples, *Progress in Nutrition*, 23(1):1–8.
- Özkök, Duran, and Sibel Silici.** (2017). Antioxidant Activities of Honeybee Products and Their Mixtures, *Food Science and Biotechnology*, 26(1).
- Park, Hee Geun, Bo Yeon Kim, Min Ji Park, Yijie Deng, Yong Soo Choi, Kwang Sik Lee, and Byung Rae Jin.** (2019). Antibacterial Activity of Major Royal Jelly Proteins of the Honeybee (*Apis Mellifera*) Royal Jelly, *Journal of Asia-Pacific Entomology*, 22(3):737–41.
- Park, Min Ji, Bo Yeon Kim, Yijie Deng, Hee Geun Park, Yong Soo Choi, Kwang Sik Lee, and Byung Rae Jin.** (2020). Antioxidant Capacity of Major Royal Jelly Proteins of Honeybee (*Apis Mellifera*) Royal Jelly, *Journal of Asia-Pacific Entomology*, 23(2):445–48.
- Pasupuleti, Visweswara Rao, Lakshmi Sammugam, Nagesvari Ramesh, and Siew Hua Gan.** (2017). Honey, Propolis, and Royal Jelly: A Comprehensive

Review of Their Biological Actions and Health Benefits, *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 26(5):657-664.

Pavel, Crenguța I., Liviu Al. Mărghițaș, Otilia Bobiș, Daniel S. Dezmirean, Agripina Șapcaliu, Ion Radoi, and Mariana N. Mădaș. (2011). Biological Activities of Royal Jelly – Review, *Scientific Papers Animal Science and Biotechnologies*, 44(2):108–18.

Peixoto, Leonardo Gomes, Luciana Karen Calábria, Liudy Garcia, Fausto Emílio Capparelli, Luiz Ricardo Goulart, Marcelo Valle de Sousa, and Foued Salmen Espindola. (2009). Identification of Major Royal Jelly Proteins in the Brain of the Honeybee *Apis Mellifera*, *Journal of Insect Physiology*, 55(8):671–77.

Peng, Chi Chung, Hui Tzu Sun, I. Ping Lin, Ping Chung Kuo, and Jen Chieh Li. (2017). The Functional Property of Royal Jelly 10-Hydroxy-2-Decenoic Acid as a Melanogenesis Inhibitor, *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 17(1):4–11.

Phillips, David H., and Volker M. Arlt. (2009). Genotoxicity: Damage to DNA and Its Consequences, *Molecular, Clinical and Environmental Toxicology*, 99:87–110.

Piana, Maria Lucia, P. BELLIGOLI, Livia Persano Oddo, and S. PIPERNO. (2006). Pollen Analysis of Royal Jelly: Contribution to Analytical Methods and Characterization, *Apiacta*, 41:28–42.

Pina, Athanasia, Olga Begou, Dimitris Kanelis, Helen Gika, Stavros Kalogiannis, Chrysoula Tananaki, Georgios Theodoridis, and Anastasia Zotou. (2018). Targeted Profiling of Hydrophilic Constituents of Royal Jelly by Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry, *Journal of Chromatography, A* 1531:53–63.

Pirk, Christian W. W. (2018). Honeybee Evolution: Royal Jelly Proteins Help Queen Larvae to Stay on Top, *Current Biology*, 28(8):R350–51.

Pourmoradian, Samira. (2014). Effects of Royal Jelly Supplementation on Glycemic Control and Oxidative Stress Factors in Type 2 Diabetic Female: A Randomized Clinical Trial, *Chinese Journal of Integrative Medicine*, 20(5): 347–52.

Premratanachai, Pongsathon, and Chanpen Chanchao. (2014). Review of the Anticancer Activities of Bee Products, *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 4(5): 337–44.

Pyrzanowska, Justyna. (2014). Long-Term Administration of Greek Royal Jelly Improves Spatial Memory and Influences the Concentration of Brain Neurotransmitters in Naturally Aged Wistar Male Rats, *Journal of Ethnopharmacology*, 155(1): 343–51.

- Radovic, B. S., M. Careri, A. Mangia, M. Musci, M. Gerboles, and E. Anklam.** (2001). Contribution of Dynamic Headspace GC–MS Analysis of Aroma Compounds to Authenticity Testing of Honey, *Food Chemistry*, 72(4):511–20.
- Rafiqi, Umara Nissar, Irum Gul, Monica Saifi, Nazima Nasrullah, Javed Ahmad, Prasanta Dash, and Malik Zainul Abidin.** (2019). Cloning, Identification, and in Silico Analysis of Terpene Synthases Involved in the Competing Pathway of Artemisinin Biosynthesis Pathway in *Artemisia Annua* L., *Pharmacognosy Magazine*, 15(62):S38–46.
- Ramadan, Mohamed Fawzy, and Ahmed Al-Ghamdi.** (2012). Bioactive Compounds and Health-Promoting Properties of Royal Jelly: A Review, *Journal of Functional Foods*, 4(1):39–52.
- Ramanathan, Ajitha Nath Koomankode Ganapathi, Ananthakrishnan Jayakumaran Nair, and Vetha Sundaram Sugunan.** (2018). A Review on Royal Jelly Proteins and Peptides, *Journal of Functional Foods*, 44(3):255–64.
- Rao, Pasupuleti Visweswara, Kumara Thevan Krishnan, Naguib Salleh, and Siew Hua Gan.** (2016). Biological and Therapeutic Effects of Honey Produced by Honey Bees and Stingless Bees: A Comparative Review, *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 26(5):657–64.
- Repetto, Guillermo, Ana del Peso, and Jorge L. Zurita.** (2008). Neutral Red Uptake Assay for the Estimation of Cell Viability/Cytotoxicity, *Nature Protocols*, 3(7):1125–31.
- Rodríguez-Flores, Shantal, Olga Escuredo, and Maria Carmen Seijo.** (2016). Characterisation and Antioxidant Capacity of Sweet Chestnut Honey Produced in North-West Spain, *Journal of Apicultural Science*, 60(1):19–30.
- Saral, Özlem.** (2018). Determination of Antioxidant Activities of the Chestnut and Flower Honeys Collected from Eastern Black Sea Region in Turkey, *Journal of Apitherapy and Nature*, 1(1):28–32.
- SARIKAYA, A.O., ULUSOY, E., ÖZTÜRK, N., TUNÇEL, M. and KOLAYLI, S.** (2009). ANTIOXIDANT ACTIVITY AND PHENOLIC ACID CONSTITUENTS OF CHESTNUT (*CASTANIA SATIVA* MILL.) HONEY AND PROPOLIS, *Journal of Food Biochemistry*, 33:
- Schmitzova, J., J. Klaudiny, S. .. Albert, W. Schroder, W. Schreckengost, J. Hanes, J. Judovaa, and J. Simuth.** (1998). A Family of Major Royal Jelly Proteins of the Honeybee *Apis Mellifera* L., *Cellular and Molecular Life Sciences*, 54(4):1020–30.

- Schröterová, Ladislava.** (2009). Antiproliferative Effects of Selenium Compounds in Colon Cancer Cells: Comparison of Different Cytotoxicity Assays, *Toxicology in Vitro*, 23(7): 1406–11.
- Šedivá, Mária, Maroš Laho, Lenka Kohútová, Andrea Mojžišová, Juraj Majtán, and Jaroslav Klaudiny.** (2018). 10-HDA, A Major Fatty Acid of Royal Jelly, Exhibits PH Dependent Growth-Inhibitory Activity Against Different Strains of Paenibacillus Larvae, *Molecules*, 23(12).
- Seyhan, Mehmet Fatih.** (2017). Anatolian Honey Is Not Only Sweet but Can Also Protect from Breast Cancer: Elixir for Women from Artemis to Present, *IUBMB Life*, 69(9): 677–88.
- Shi, Jing liang, Chun hua Liao, Zi long Wang, and Xiao bo Wu.** (2018). Effect of Royal Jelly on Longevity and Memory-Related Traits of Apis Mellifera Workers, *Journal of Asia-Pacific Entomology*, 21(4):1430–33.
- Shidfar, Farzad.** (2015). Does Supplementation with Royal Jelly Improve Oxidative Stress and Insulin Resistance in Type 2 Diabetic Patients?, *Iranian journal of public health*, 44(6): 797–803.
- Shrivastava, Ravi.** (2011). Clinical Evidence to Demonstrate That Simultaneous Growth of Epithelial and Fibroblast Cells Is Essential for Deep Wound Healing, *Diabetes Research and Clinical Practice* 92(1):92–99.
- Silici, Sibel, Oguz Ekmekcioglu, Murat Kanbur, and Kemal Deniz.** (2010). The Protective Effect of Royal Jelly against Cisplatin-Induced Renal Oxidative Stress in Rats, *World Journal of Urology* 29(1): 127–32.
- Speit, Günter, and Andreas Hartmann.** (2006). The Comet Assay: A Sensitive Genotoxicity Test for the Detection of DNA Damage and Repair, *Methods in Molecular Biology*, 314:275–86.
- Suemaru, K.** (2008). Topical Application of Royal Jelly Has a Healing Effect for 5-Fluorouracil-Induced Experimental Oral Mucositis in Hamsters, *Methods and findings in experimental and clinical pharmacology*, 30(2): 103–6.
- Sugiyama, Tsuyoshi, Keita Takahashi, and Hiroshi Mori.** (2012). Royal Jelly Acid, 10-Hydroxy-Trans-2-Decenoic Acid, as a Modulator of the Innate Immune Responses, *Endocrine, Metabolic & Immune Disorders-Drug Targets*, 12(4):368–76.
- Takahashi, Yuji.** (2012). Molecular Alterations during Female Reproductive Aging: Can Aged Oocytes Remind Youth?, *Embryology-Updates and Highlights on Classic Topics*.
- Taniguchi, Yoshifumi.** (2003). Oral Administration of Royal Jelly Inhibits the Development of Atopic Dermatitis-like Skin Lesions in NC/Nga Mice, *International Immunopharmacology*, 3(9): 1313–24.

- Terada, Yuko, Masataka Narukawa, and Tatsuo Watanabe.** (2011). Specific Hydroxy Fatty Acids in Royal Jelly Activate TRPA1, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(6):2627–35.
- Tilahun, Alebachew, Bakalo Basa, Wendimagegnehu Belay, and Ayichew Teshale.** (2016). Review on Medicinal Value of Honeybee Products: Apitherapy, *Advances in Biological Research*, 10(4):236–47.
- Türkmen, Zafer, Kültigin Cavusolu, Kürsat Cavusoglu, Kursad Yapar, and Emine Yalcin.** (2009). Protective Role of Royal Jelly (Honeybee) on Genotoxicity and Lipid Peroxidation, Induced by Petroleum Wastewater, in *Allium Cepa* L. Root Tips, *Environmental Technology* 30(11):1205–14.
- Uthaibutra, Vitchayaporn, Chainarong Sinpoo, Panuwan Chantawannakul, and Yingmanee Tragoolpua.** (2020). Inhibition of Pathogenic Bacteria and Antioxidant Activity of Royal Jelly, *RSU International Research Conference* (May): 470–77.
- Vajrabhaya, La ongthong, and Suwanna Korsuwannawong.** (2018). Cytotoxicity Evaluation of a Thai Herb Using Tetrazolium (MTT) and Sulforhodamine B (SRB) Assays, *Journal of Analytical Science and Technology*, 9(1).
- Vandamme, L., A. Heyneman, H. Hoeksema, J. Verbelen, and S. Monstrey.** (2013). Honey in Modern Wound Care: A Systematic Review, *Burns: Journal of the International Society for Burn Injuries* 39(8):1514–25.
- Viuda-Martos, M., Y. Ruiz-Navajas, J. Fernández-López, and J. A. Pérez-Álvarez.** (2008). Functional Properties of Honey, Propolis, and Royal Jelly, *Journal of Food Science*, 73(9):117–24.
- Vucevic, Dragana, Eleni Melliou, Sasa Vasilijic, Sonja Gasic, Petar Ivanovski, Ioanna Chinou, and Miodrag Colic.** (2007). Fatty Acids Isolated from Royal Jelly Modulate Dendritic Cell-Mediated Immune Response in Vitro, *International Immunopharmacology*, 7(9):1211–20.
- Wang, Xiaoxia.** (2015). Royal Jelly-Mediated Prolongevity and Stress Resistance in *Caenorhabditis Elegans* Is Possibly Modulated by the Interplays of DAF-16, SIR-2.1, HCF-1, and 14-3-3 Proteins, *The Journals of Gerontology: Series A*, 70(7): 827–38.
- Watanabe, K., H. Shinmoto, M. Kobori, T. Tsushida, K. Shinohara, J. Kanaeda, and M. Yonekura.** (1998). Stimulation of Cell Growth in the U-937 Human Myeloid Cell Line by Honey Royal Jelly Protein, *Cytotechnology*, 26(1):23–27.
- Winckler, J.** (1974). Vital staining of lysosomes and other cell organelles of the rat with neutral red (author's transl), *Progress in histochemistry and cytochemistry*, 6(3):1–91.

- Yang, Chen-Lung, Shu-Ping Lin, Ya-hui Chan, and Chwen Sheu.** (2010). Mediated Effect of Environmental Management on Manufacturing Competitiveness: An Empirical Study, *International Journal of Production Economics*, 123(1): 210–20.
- Yang, J., Huang, Y., Xu, H., Gu, D., Xu, F., Tang, J., Fang, C., & Yang, Y.** (2020). Optimization of fungi co-fermentation for improving anthraquinone contents and antioxidant activity using artificial neural networks, *Food Chemistry*, 313.
- Yildiz, Oktay.** (2013). Hepatoprotective Potential of Chestnut Bee Pollen on Carbon Tetrachloride-Induced Hepatic Damages in Rats, *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine*, 13.
- Zahran, Asmaa M.** (2016). Effects of Royal Jelly Supplementation on Regulatory T Cells in Children with SLE, *Food & Nutrition Research*, 1(5): 1–10.
- Žegura, Bojana, and Metka Filipič.** (2004). Application of In Vitro Comet Assay for Genotoxicity Testing, *Optimization in Drug Discovery*, 301–13.

ÖZGEÇMİŞ

Ad-Soyad :Elife KILDALI

ÖĞRENİM DURUMU:

- **Lisans** : 2019, Adana Alparslan Türkeş Bilim ve Teknoloji Üniversitesi, Biyomühendislik
- **Yüksek Lisans** : 2021, Bursa Teknik Üniversitesi, Biyomühendislik Anabilim Dalı

MESLEKİ DENEYİM VE ÖDÜLLER:

- **Araştırma Görevlisi** - Bursa Teknik Üniversitesi, Mühendislik ve Doğa Bilimleri Fakültesi, Biyomühendislik Bölümü

DİĞER ESERLER, SUNUMLAR VE PATENTLER:

- Parın, F.N., Yıldırım, K., Taner, G., Kıldalı, E. 2021. Development and Characterization of Vitamin B9-Electrosprayed Non-woven Surfaces for Wound Healing Applications. Eskişehir Technical University Journal of Science and Technology A - Applied Sciences and Engineering, 22: 70-84
- PARIN FATMA NUR, YILDIRIM KENAN, TANER GÖKÇE, KILDALI ELİFE (2021). Developing and Characterization of Non-woven Surfaces for Wound Healing Applications. 8th INTERNATIONAL FIBER AND POLYMER RESEARCH SYMPOSIUM (Tam Metin Bildiri/Sözlü Sunum)(Yayın No:7191824)

- TORUN AHMET REFAH,YİĞİT AHMET BATUHAN,KILIÇ YASİR,KILDALI ELİFE,SÖNMEZ AYKUT (2019). LİSANS VE YÜKSEK LİSANS MÜHENDİSLİK MATEMATİĞİNİN HAFTALIK PAKETLER HALİNDE ÖĞRETİLMESİ. International Symposium on Active Learning (ISAL) (Özet Bildiri/Sözlü Sunum)(Yayın No:6015772)

