



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



DOKTORA TEZİ

**ÇEŞİTLİ BAL ARISI ÜRÜNLERİNİN NUTRASÖTİK ve
KOZMESÖTİK POTANSİYELİNİN DOĞAL KATKILARLA
ARTIRILMASI**

Gizem SÖNMEZ OSKAY

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Moleküler Biyoloji ve Genetik Programı

**DANIŞMAN
Prof. Dr. E.Ş. Nazlı ARDA**

Mayıs, 2023

İSTANBUL

Bu çalışma, 26.05.2023 tarihinde aşğıdaki jüri tarafından Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı, Moleküler Biyoloji ve Genetik Programında Doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Jürisi

Prof. Dr. E.Ş. Nazlı ARDA(Danışman)
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi

Prof. Dr. Ali KARAGÖZ
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi

Doç. Dr. Zelal ADIGÜZEL
Koç Üniversitesi
Tıp Fakültesi

Prof. Dr. Evren ÖNAY UÇAR
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi

Dr. Öğr. Üyesi Ali Timuçin ATAYOĞLU
Medipol Üniversitesi
Tıp Fakültesi

İntihal Programı Beyanı

20.04.2016 tarihli Resmi Gazete’de yayımlanan Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin 9/2 ve 22/2 maddeleri gereğince; Bu Lisansüstü teze, İstanbul Üniversitesi’nin abonesi olduğu intihal yazılım programı kullanılarak Fen Bilimleri Enstitüsü’nün belirlemiş olduğu ölçütlere uygun rapor alınmıştır.

Proje Destekleri

Bu tez, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yürütücü Sekreterliğinin 34040 numaralı projesi ile desteklenmiştir.

Bu tez, YÖK 100/2000 projesi ile Doktora Bursu Doğal ve Bitkisel ürünler/ Kozmetik ürünler kapsamında desteklenmiştir

Tezden Üretilmiş Yayınların Künye Bilgileri

--

ÖNSÖZ

Doktora eğitimimin her aşamasında bilgi ve tecrübesiyle beni yönlendiren, yardım ve desteğini esirgemeyen, birlikte çalışmaktan onur duyduğum değerli hocam Prof. Dr. E. Ş. Nazlı ARDA'ya saygı, sevgi ve teşekkürlerimi sunarım.

Doktora tez çalışmamın şekillenmesinde emeği geçen tez izleme komitesinin değerli üyeleri Prof. Dr. A. Süha YALÇIN, Prof. Dr. Ali KARAGÖZ ve Doç. Dr. Zelal ADIGÜZEL hocalarıma; savunma sırasında ve sonrasında yaptıkları yorumlarla tezimin geliştirilmesine eşsiz katkılar sağlayan jüri üyelerim Prof. Dr. Evren ÖNAY UÇAR ve Dr. Öğr. Üyesi Ali Timuçin ATAYOĞLU hocalarıma teşekkürü bir borç bilirim.

Doktora tez çalışmamın materyallerinin sağlanmasında emeği geçen Altıparmak Gıda San. ve Tic. A. Ş., Arpaş Arifoğlu Pazarlama Dağıtım ve Ticaret A.Ş., Dikbıyık Arı Ürünleri Ltd. Şti. ve Şile Arıcılık ve Arı Ürünleri Tarımsal Kalkınma Kooperatifi'ne, bu materyallerin ilgili analizlerinin gerçekleştirilmesinde yardımlarını esirgemeyen Altıparmak Gıda San. ve Tic. A.Ş. Ar-Ge ve Kalite Direktörü Dr. Emel DAMARLI'ya ve Kalite Kontrol Müdürü İlknur ÇOŞKUN'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmalarım süresince yardımlarını esirgemeyen Doç. Dr. Murat PEKMEZ hocama ve doktora öğrencilerinden MSc. Yunus AKSÜT ve MSc. Aslıhan ŞENGELİN'e, bu süreçte güzel dostluklar kurduğum tüm proteomik ekibine teşekkürlerimi sunarım.

Hayatın karşıma çıkardıkları bir yana bu sürecin her anında bana destek olan canım annem Şerefnur SÖNMEZ'e, sonsuz sabrıyla her durumda yanımda olan, maddi ve manevi desteğini esirgemeyen canım eşim Dr. Öğretim Üyesi Devrim OSKAY'a, koşulsuz sevgileriyle hayatımı güzelleştiren canım çocuklarım Riko ve Hektor'a ve son olarak dengemi kaybettiğim her anımda soluğu yanımda alan canım kardeşim Bertan SÖNMEZ'e teşekkürlerimi ve sevgilerimi sunarım.

Tezimi, Covid-19 salgını sırasında zamansız kaybettiğim çok sevdiğim canım babam Aygün SÖNMEZ'in anısına ithaf ediyorum.

Mayıs 2023

Gizem SÖNMEZ OSKAY

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

ÖNSÖZ	ivv
İÇİNDEKİLER.....	v
ŞEKİL LİSTESİ	vii
TABLO LİSTESİ.....	xii
SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ	xiii
ÖZET	xv
SUMMARY	xvi
1. GİRİŞ	1
2. GENEL KISIMLAR.....	4
2.1. NUTRASÖTİKLER, KOZMESÖTİKLER VE NUTRİKOZMETİKLER	4
2.2. BAL ARISI ÜRÜNLERİ	10
2.2.1. Bal.....	13
2.2.1.1. Kestane (<i>Casteanea sativa</i> Miller) Balı.....	17
2.2.2. Arı Polenİ.....	20
2.2.2.1. Kestane (<i>Casteanea sativa</i> Miller) Polenİ	22
2.2.3. Arı Sütü	23
2.2.4. Apilarnil.....	26
2.3. NUTRASÖTİK VE KOZMESÖTİK BİTKİSEL ÜRÜNLER	26
2.3.1. Fitokimyasallar	26
2.3.1.1. Kersetin.....	27
2.3.1.2. Kurkumin	29
2.3.1.3. Rosmarinik Asit.....	31
2.4. APİ-FİTOTERAPİ	33
2.5. BİYOLOJİK AKTİVİTELER.....	39
2.5.1. <i>İn Vitro</i> Sitotoksik Aktivite	39
2.5.2. <i>İn Vitro</i> Antioksidan Aktivite	42
2.5.3. <i>İn Vitro</i> Anti-Asetilkolinesteraz Aktivite	47
3. MALZEME VE YÖNTEM.....	50
3.1. KİMYASALLAR.....	50
3.2. EKİPMAN VE ENSTRÜMANLAR	50

3.3. DENEY MATERYALLERİNİN TEMİNİ VE HAZIRLANMASI	51
3.3.1. Bal Arısı Ürünlerinin Temini ve Ekstrelerinin Hazırlanması.....	51
3.3.2. Bal Arısı Ürünlerinin Doğal Katkılarla Kombine Edilmesi	53
3.4. SAF VE KOMBİNE ÜRÜNLERİN BİYOLOJİK AKTİVİTELERİNİN İN VİTRO TESTLERLE BELİRLENMESİ.....	54
3.4.1. İn Vitro Sitotoksik Aktivite Testi	54
3.4.1.1. Fare Fibroblast Hücrelerinin (NIH3T3) Büyütülmesi ve Pasajlanması	54
3.4.1.2. MTT Hücre Canlılığı Testi.....	54
3.4.2. İn Vitro Antioksidan Aktivite Testi.....	56
3.4.2.1. DPPH* Radikal Süpürücü Aktivite.....	56
3.4.2.2. Bakır (II) İyonu İndirgeyici Antioksidan Kapasite Tayini	57
3.4.2.3. Toplam Fenolik Madde Tayini (TPC)	58
3.4.2.4. Toplam Flavonoid Tayini (TFC)	60
3.4.3. İn Vitro Anti-Asetilkolinesteraz Aktivite Testi	61
3.4.4. İn Vitro Bal Arısı Modeli	62
3.5. İSTATİSTİK ANALİZLER.....	54
4. BULGULAR.....	66
4.1. SAF VE KOMBİNE ÜRÜNLERİN NIH3T3 FİBROBLAST HÜCRE CANLILIĞI ÜZERİNE ETKİLERİ	66
4.1.1. Bal Arısı Ürünlerinin Hücre Canlılığına Etkileri	66
4.1.1.1. Kestane Balının Hücre Canlılığına Etkisi	66
4.1.1.2. Kestane Polen Metanol Ekstresinin Hücre Canlılığına Etkisi	68
4.1.1.3. Arı Sütünün Hücre Canlılığına Etkisi.....	70
4.1.1.4. Apilarnil Metanol Ekstresinin Hücre Canlılığına Etkisi	72
4.1.2. Fitokimyasalların Hücre Canlılığına Etkileri	74
4.1.2.1. Kersetinin Hücre Canlılığına Etkisi	74
4.1.2.2. Kurkuminin Hücre Canlılığına Etkisi.....	76
4.1.2.3. Rosmarinik Asitin Hücre Canlılığına Etkisi	78
4.1.3. Kombine Ürünlerin Hücre Canlılığına Etkileri	81
4.1.3.1. Kestane Balı ve Kersetin Kombinasyonlarının Hücre Canlılığına Etkileri.....	81
4.1.3.2. Kestane Balı ve Kurkumin Kombinasyonlarının Hücre Canlılığına Etkileri.....	82
4.1.3.3. Kestane Balı ve Rosmarinik Asit Kombinasyonlarının Hücre Canlılığına Etkileri	84

4.1.3.4. Kestane Polen Metanol Ekstresi ve Kersetin Kombinasyonlarının Hücre Canlılığına Etkileri	85
4.1.3.5. Kestane Polen Metanol Ekstresi ve Kurkumin Kombinasyonlarının Hücre Canlılığına Etkileri	87
4.1.3.6. Kestane Polen Metanol Ekstresi ve Rosmarinik Asit Kombinasyonlarının Hücre Canlılığına Etkileri	89
4.1.3.7. Arı Sütü ve Kersetin Kombinasyonlarının Hücre Canlılığına Etkileri	90
4.1.3.8. Arı Sütü ve Kurkumin Kombinasyonlarının Hücre Canlılığına Etkileri	92
4.1.3.9. Arı Sütü ve Rosmarinik Asit Kombinasyonlarının Hücre Canlılığına Etkileri	93
4.1.3.10. Apilarnil ve Kersetin Kombinasyonlarının Hücre Canlılığına Etkileri	95
4.1.3.11. Apilarnil Ekstresi ve Kurkumin Kombinasyonlarının Hücre Canlılığına Etkileri	96
4.1.3.12. Apilarnil Metanol Ekstresi ve Rosmarinik Asit Kombinasyonlarının Hücre Canlılığına Etkileri	98
4.2. SAF VE KOMBİNE ÜRÜNLERİN BİYOLOJİK AKTİVİTELERİNİN İN VİTRO TESTLERLE BELİRLENMESİ	106
4.2.1 DPPH* Radikal Süpürücü Aktivite	99
4.2.2 Bakır (II) İyonu İndirgeyici Antioksidan Kapasite	100
4.2.3 Toplam Fenolik Madde Tayini (TPC) ..	102
4.2.4 Toplam Flavonoid Tayini (TFC)	104
4.3. İN VİTRO ANTİ-ASETİLKOLİNESTERAZ AKTİVİTE TESTİ	106
4.4. İN VİTRO BAL ARISI MODELİ	107
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	110
KAYNAKLAR	122
EKLER	151
EK-1 Kestane Balı (KB) İçerik Analizi	151
EK-2 Kestane Balı (KB) Polen Analizi	152
EK-3 Kestane Polen (KP) Polen Analizi	152
EK-4 Arı Sütü 10-HDA Analizi	152
ÖZGEÇMİŞ	153

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 2.1: Nutrasötikler ve biyolojik aktiviteleri (Biorender.com)	5
Şekil 2.2: Nutrikozmetik kavramı (Biorender.com)	6
Şekil 2.3: Bal arısı ürünleri ve biyolojik aktiviteleri (Biorender.com)	11
Şekil 2.4: Balın terapötik etkinliği (Biorender.com) (Nikhat ve Fazil, 2022)	17
Şekil 2.5: <i>Castanea sativa</i> Mill. bitkisinin çiçekleri, yaprakları, poleni (Sedláčková ve diğ., 2021b) ve meyvesi (Conedera ve diğ., 2016).....	18
Şekil 2.6: Kestane balının biyolojik aktiviteleri (Biorender.com)	19
Şekil 2.7: Arı polenin tuzaklardan toplanması (Khalifa ve diğ., 2021)	21
Şekil 2.8: Arı sütü elde edilmesi (Abālaru ve Carmen, 2014)	22
Şekil 2.9: Arı sütünün temel bileşenleri ve biyolojik aktivitelerinin şematik gösterimi (Ahmad ve diğ., 2020).....	23
Şekil 2.10: Erkek arı larvalarının görünümü (Anonim, 2023).....	24
Şekil 2.11: Liyofilize edilmiş Apilarnil (Erdem ve İnci, 2022)	25
Şekil 2.12: Kersetinin moleküler yapısı (PubChem CID: 5280343)	28
Şekil 2.13: Kersetin kaynakları ve aktiviteleri (Azeem ve diğ., 2022)	29
Şekil 2.14: <i>Curcuma longa</i> bitkisi ve kurkumin (Alagawany ve diğ., 2021)..	30
Şekil 2.15: Kurkuminin moleküler yapısı (PubChem CID: 969516) (Khudhayer Oglah ve Fakri Mustafa, 2020)	30
Şekil 2.16: Kurkuminin biyolojik aktiviteleri (Biorender.com).....	31
Şekil 2.17: Rosmarinik asitin moleküler yapısı (PubChem CID: 5281792) (Hitl ve diğ., 2021).....	32
Şekil 2.18: Rosmarinik asitin biyolojik aktiviteleri (Noor ve diğ., 2022).	33
Şekil 2.19: Api-fioterapötik etkiler (Biorender.com).....	34
Şekil 2.20: <i>In vitro</i> sitotoksik aktivite testleri (Liu ve diğ., 2018).....	39
Şekil 2.21: Antioksidanlar (Munteanu ve Apetrei, 2022).....	44

Şekil 2.22: Alzheimer Hastalığı'nın tedavisinde kullanılan FDA onaylı ilaçlar (Eissa ve diğ., 2023)	49
Şekil 3.1: Kestane balı	51
Şekil 3.2: Kestane balı su ekstresi	52
Şekil 3.3: Apilarnil ve kestane poleni metanol ekstresi	52
Şekil 3.4: Arı sütü DMSO ekstresi	53
Şekil 3.5: Kersetin, kurkumin ve rosmarinik asit DMSO ekstresi	49
Şekil 3.6: MTT analizinde oluşan renk değişimi pleyt görüntüsü	55
Şekil 3.7: DPPH molekülü renk değişimi	56
Şekil 3.8: Kuprik indirgeyici antioksidan kapasite (CUPRAC) analizinde yer alan reaksiyon şeması	57
Şekil 3.9: CUPRAC deneyi	58
Şekil 3.10: Folin-ciocalteu kimyasalı renk değişimi (Carmona-Hernandez ve diğ., 2021)	59
Şekil 3.11: Ellman yöntemine göre AChE aktivite analizi (Koyuncu ve diğ., 2019)	61
Şekil 3.12: A. Kolonilerin seçildiği arılık B. Arı kafesleri C. Arı besleme tüpleri	63
Şekil 3.13: Bir günlük yaştaki işçi arılar ve kafeslere aktarımı	63
Şekil 3.14: Besleme kafesleri	64
Şekil 3.15: <i>In vitro</i> bal arısı modelinin kurulması	64
Şekil 4.1: Kestane balının (KB) 24 saatte NIH3T3 hücrelerinin canlılığı üzerine etkisi	67
Şekil 4.2: Kestane balının (KB) 48 saatte NIH3T3 hücrelerinin canlılığı üzerine etkisi	67
Şekil 4.3: Kestane balının (KB) 72 saatte NIH3T3 hücrelerinin canlılığı üzerine etkisi	68
Şekil 4.4: Kestane poleni metanol ekstresinin (KPmet) 24 saatte NIH3T3 hücrelerinin canlılığı üzerine etkisi	69
Şekil 4.5: Kestane poleni metanol ekstresinin (KPmet) 48 saatte NIH3T3 hücrelerinin canlılığı üzerine etkisi	69
Şekil 4.6: Kestane poleni metanol ekstresinin (KPmet) 72 saatte NIH3T3 hücrelerinin canlılığı üzerine etkisi	70
Şekil 4.7: Arı sütünün (RJ) 24 saatte NIH3T3 hücrelerinin canlılığı üzerine etkisi	71

Şekil 4.8: Arı sütünün (RJ) 48 saatte NIH3T3 hücrelerinin canlılığı üzerine etkisi	71
Şekil 4.9: Arı sütünün (RJ) 72 saatte NIH3T3 hücrelerinin canlılığı üzerine etkisi	72
Şekil 4.10: Apilarnil metanol ekstresinin (APLmet) 24 saatte NIH3T3 hücrelerinin canlılığı üzerine etkisi.....	73
Şekil 4.11: Apilarnil metanol ekstresinin (APLmet) 48 saatte NIH3T3 hücrelerinin canlılığı üzerine etkisi.....	73
Şekil 4.12: Apilarnil metanol ekstresinin (APLmet) 72 saatte NIH3T3 hücrelerinin canlılığı üzerine etkisi.....	74
Şekil 4.13: Kersetinin (KER) 24 saatte NIH3T3 hücrelerinin canlılığı üzerine etkisi.....	75
Şekil 4.14: Kersetinin (KER) 48 saatte NIH3T3 hücrelerinin canlılığı üzerine etkisi.....	75
Şekil 4.15: Kersetinin (KER) 72 saatte NIH3T3 hücrelerinin canlılığı üzerine etkisi.....	64
Şekil 4.16: Kurkuminin (KUR) 24 saatte NIH3T3 hücrelerinin canlılığı üzerine etkisi	77
Şekil 4.17: Kurkuminin (KUR) 48 saatte NIH3T3 hücrelerinin canlılığı üzerine etkisi	77
Şekil 4.18: Kurkuminin (KUR) 72 saatte NIH3T3 hücrelerinin canlılığı üzerine etkisi	78
Şekil 4.19: Rosmarinik asitin (ROS) 24 saatte NIH3T3 hücrelerinin canlılığı üzerine etkisi	79
Şekil 4.20: Rosmarinik asitin (ROS) 48 saatte NIH3T3 hücrelerinin canlılığı üzerine etkisi	79
Şekil 4.21: Rosmarinik asitin (ROS) 72 saatte NIH3T3 hücrelerinin canlılığı üzerine etkisi	80
Şekil 4.22: Kombinasyonlar ve bileşenlerine ait dozların özet gösterimi.....	80
Şekil 4.23: Kestane balı ve kersetin (KB+KER) kombinasyonlarının 24 saatte NIH3T3 hücrelerinin canlılığı üzerine etkisi.	82
Şekil 4.24: Kestane balı ve kurkumin (KB+KUR) kombinasyonlarının 24 saatte NIH3T3 hücrelerinin canlılığı üzerine etkisi.....	83
Şekil 4.25: Kestane balı ve rosmarinik asit (KB+ROS) kombinasyonlarının 24 saatte NIH3T3 hücrelerinin canlılığı üzerine etkisi.....	84
Şekil 4.26: Kestane poleni metanol ekstresi ve kersetin (KPmet+KER) kombinasyonlarının 24 saatte NIH3T3 hücrelerinin canlılığı üzerine etkisi.....	87
Şekil 4.27: Kestane poleni metanol ekstresi ve kurkumin (KPmet+KUR) kombinasyonlarının 24 saatte NIH3T3 hücrelerinin canlılığı üzerine etkisi.....	89

Şekil 4.28: Arı sütü ve kersetin (RJ+KER) kombinasyonlarının 24 saatte NIH3T3 hücrelerinin canlılığı üzerine etkisi	91
Şekil 4.29: Arı sütü ve kurkumin (RJ+KUR) kombinasyonlarının 24 saatte NIH3T3 hücrelerinin canlılığı üzerine etkisi.	93
Şekil 4.30: Arı sütü ve rosmarinik asit (RJ+ROS) kombinasyonlarının 24 saatte NIH3T3 hücrelerinin canlılığı üzerine etkisi	94
Şekil 4.31: Apilarnil metanol ekstresi ve kersetin (APLmet+KER) kombinasyonlarının 24 saatte NIH3T3 hücrelerinin canlılığı üzerine etkisi	96
Şekil 4.32: Apilarnil metanol ekstresi ve kurkumin (APLmet+KUR) kombinasyonlarının 24 saatte NIH3T3 hücrelerinin canlılığı üzerine etkisi..	97
Şekil 4.33: Troloks standart eğrisi grafiği.....	101
Şekil 4.34: Gallik asit standart eğrisi grafiği.....	103
Şekil 4.35: Kateşin standart eğrisi grafiği	105
Şekil 4.36: Bal arılarının hayatta kalma olasılığı grafiği	108
Şekil 4.37: Farklı diyetlerle beslenen bal arılarının günlük yem tüketimi.....	108
Şekil 4.38: Farklı diyetlerle beslenen bal arılarının günlük su tüketimi	109

TABLO LİSTESİ

Sayfa No

Tablo 2.1: Nutrikozmetik etkili gıda bileşenleri (Melendez-Martinez, 2022)	7
Tablo 2.2: Avrupa, Japonya ve ABD nutrikozmetik pazarlarının özellikleri (Taeymans ve diğ., 2014)	8
Tablo 2.3: Piyasadaki ticari nutrikozmetik ürünler (Hernandez ve diğ., 2021)	9
Tablo 2.4: <i>İn vitro</i> sitotoksikite veya hücre canlılığı deneylerinin genel avantajları ve dezavantajları (Gavanji ve diğ., 2023)	39
Tablo 2.5: <i>İn vitro</i> sitotoksik aktivite analizleri avantajları ve dezavantajları (Gavanji ve diğ., 2023)	41
Tablo 2.6: En yaygın <i>in vitro</i> antioksidan aktivite yöntemleri (Siddeeg ve diğ., 2021)	46
Tablo 3.1: Bal arısı ürünlerinin temini	51
Tablo 4.1: Kestane balı ve kersetin (KB+KER) kombinasyonlarının 24, 48 ve 72 saatte NIH3T3 hücrelerinin canlılığı üzerine etkisi (en kısa sürede en yüksek proliferatif etki gösteren kombinasyon yeşil zeminde gösterilmiştir)	81
Tablo 4.2: Kestane balı ve kurkumin (KB+KUR) kombinasyonlarının 24, 48 ve 72 saatte NIH3T3 hücrelerinin canlılığı üzerine etkisi (en kısa sürede en yüksek proliferatif etki gösteren kombinasyon turuncu zeminde gösterilmiştir)	83
Tablo 4.3: Kestane balı ve rosmarinik asit (KB+ROS) kombinasyonlarının 24, 48 ve 72 saatte NIH3T3 hücrelerinin canlılığı üzerine etkisi (en kısa sürede en yüksek proliferatif etki gösteren kombinasyon sarı zeminde gösterilmiştir)	84
Tablo 4.4: Kestane poleni metanol ekstresi ve kersetin (KPmet+KER) kombinasyonlarının 24, 48 ve 72 saatte NIH3T3 hücrelerinin canlılığı üzerine etkisi (en kısa sürede en yüksek proliferatif etki gösteren kombinasyon yeşil zeminde gösterilmiştir)	86
Tablo 4.5: Kestane poleni metanol ekstresi ve kurkumin (KPmet+KUR) kombinasyonlarının 24, 48 ve 72 saatte NIH3T3 hücrelerinin canlılığı üzerine etkisi (en kısa sürede en yüksek proliferatif etki gösteren kombinasyon turuncu zeminde gösterilmiştir)	87
Tablo 4.6: Kestane poleni metanol ekstresi ve kurkumin (KPmet+KUR) kombinasyonlarının 24, 48 ve 72 saatte NIH3T3 hücrelerinin canlılığı üzerine etkisi (en kısa sürede en yüksek proliferatif etki gösteren kombinasyon sarı zeminde gösterilmiştir)	89

Tablo 4.7: Arı sütü ve kersetin (RJ+KER) kombinasyonlarının 24, 48 ve 72 saatte NIH3T3 hücrelerinin canlılığı üzerine etkisi (en kısa sürede en yüksek proliferatif etki gösteren kombinasyon yeşil zeminde gösterilmiştir).	90
Tablo 4.8: Arı sütü ve kurkumin (RJ+KUR) kombinasyonlarının 24, 48 ve 72 saatte NIH3T3 hücrelerinin canlılığı üzerine etkisi (en kısa sürede en yüksek proliferatif etki gösteren kombinasyon turuncu zeminde gösterilmiştir).	92
Tablo 4.9: Arı sütü ve rosmarinik asit (RJ+ROS) kombinasyonlarının 24, 48 ve 72 saatte NIH3T3 hücrelerinin canlılığı üzerine etkisi (en kısa sürede en yüksek proliferatif etki gösteren kombinasyon sarı zeminde gösterilmiştir).	93
Tablo 4.10: Apilarnil metanol ekstresi ve kersetin (APLmet+KER) kombinasyonlarının 24, 48 ve 72 saatte NIH3T3 hücrelerinin canlılığı üzerine etkisi (en kısa sürede en yüksek proliferatif etki gösteren kombinasyon yeşil zeminde gösterilmiştir).	95
Tablo 4.11: Apilarnil metanol ekstresi ve kurkumin (APLmet+KUR) kombinasyonlarının 24, 48 ve 72 saatte NIH3T3 hücrelerinin canlılığı üzerine etkisi (en kısa sürede en yüksek proliferatif etki gösteren kombinasyon turuncu zeminde gösterilmiştir).	96
Tablo 4.12: Apilarnil metanol ekstresi ve rosmarinik asit (APLmet+ROS) kombinasyonlarının 24, 48 ve 72 saatte NIH3T3 hücrelerinin canlılığı üzerine etkisi (en kısa sürede en yüksek proliferatif etki gösteren kombinasyon sarı zeminde gösterilmiştir).	98
Tablo 4.13: Saf ve kombine ürünlerin DPPH radikali süpürücü (IC ₅₀ mg/mL) değerleri	99
Tablo 4.14: Saf ve kombine ürünlerin CUPRAC değerleri	101
Tablo 4.15: Saf ve kombine ürünlerin toplam fenolik içeriği	103
Tablo 4.16: Saf ve kombine ürünlerin toplam flavonoid içeriği	104
Tablo 4.17: Saf ve kombine ürünlerin AChE aktivitesi	106

SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ

Simgeler	Açıklama
----------	----------

%	: Yüzde
α	: Alfa
β	: Beta
rpm	: Dakikadaki dönüş
nmol	: Nanomol
μ g	: Mikrogram
mM	: Milimolar
mL	: Mililitre
mg	: Miligram
μ M	: Mikromolar
M	: Molar
°C	: Derece
L	: Litre

Kısaltmalar	Açıklama
-------------	----------

10-HDA	: 10-hidroksidekanoik asit
AChE	: Asetilkolinesteraz
ACh	: Asetilkolin
AH	: Alzheimer Hastalığı
AOC	: Antioksidan kapasitesi
APLmet	: Apilarnil metanol ekstresi
ATCI	: Asetilkolin iyodid
BChE	: Butirilkolinesteraz
DPPH	: 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil
DTNB	: 5,5-dithiobis-(2-nitrobenzoik asit)
GAE	: Gallik asit eşdeğeri
GR	: Glutasyon redüktaz
GSH	: Redükte glutasyon
GSH-Px	: Glutasyon peroksidaz

GST	: Glutatyon-S-transferazlar
H₂O₂	: Hidrojen peroksit
HO·	: Hidroksil radikali
HMF	: Hidroksimetilfurfural
KB·	: Kestane balı
KER	: Kersetin
KPmet	: Kestane poleni metanol ekstresi
KUR	: Kurkumin
MRJPs	: Majör arı sütü proteinleri
RJ	: Arı sütü
ROS	: Rosmarinik asit
TCh	: Thiocholine
TNB	: 5-thio-2-nitrobenzoik asit
TPC	: Toplam fenolik içerik

ÖZET

ÇEŞİTLİ BAL ARISI ÜRÜNLERİNİN NUTRASÖTİK ve KOZMESÖTİK POTANSİYELİNİN DOĞAL KATKILARLA ARTIRILMASI

DOKTORA TEZİ

Gizem SÖNMEZ OSKAY

İstanbul Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Danışman : Prof. Dr. E.Ş. Nazlı ARDA

Küresel nüfus artışı, değişen beslenme kalıpları ve bilinçli tüketici tercihleri, doğal gıda ve kozmetik ürünlerine olan ilgiyi artırmıştır. Nutrasötik ve kozmesötik pazarı son yıllarda hızla büyümektedir. Buna bağlı olarak, nutrasötik ve kozmesötik doğal ürünlerle ilgili araştırma faaliyetlerinde de gözle görülür bir artış yaşanmaktadır.

Bal arısı ürünleri ve tıbbi bitkiler, ilkçağlardan beri birçok hastalığı önlemek ve/veya tedavi süreçlerini desteklemek için fonksiyonel gıda olarak kullanılmaktadır. Bu ürünler, zengin kimyasal içerikleri nedeniyle antibakteriyel, antiviral, antioksidan ve antitümör aktivite gibi yararlı etkilere sahiptir. Bu nedenle gıda, kozmetik ve ilaç endüstrileri için yeni ürünlerin geliştirilmesinde önemli kaynaklar olarak kabul edilirler. Gıda ve kozmetik sektöründe bitki ekstraktları veya fitokimyasallarla zenginleştirilmiş ticari bal arısı ürünleri bulunmasına rağmen etkinlik ve güvenlikleriyle ilgili çalışmalar oldukça sınırlıdır.

Bu çalışmanın amacı, çeşitli bal arısı ürünlerine bir fitokimyasal katarak yeni ve standart kombinasyonlar elde etmek, bunların biyoaktivitelerini incelemek, nutrasötik ve kozmesötik potansiyeli yüksek yeni ürünler geliştirmektir.

Çalışmanın ilk aşamasında bal arısı ürünlerinin (kestane balı, kestane poleni, arı sütü ve apilarnil) ve fitokimyasalların (kersetin, kurkumin ve rosmarinik asit) NIH3T3 fare embriyonik fibroblast hücreleri üzerindeki sitotoksik etkileri araştırıldı. Kombinasyonlar, bileşenlerin hücreler üzerinde toksik ya da proliferatif etki göstermeyen konsantrasyonları seçilerek hazırlandı ve her bir kombinasyonun sitotoksitesisi belirlendi. Kombinasyonların hücre proliferasyonunu %30-%79.9 oranında artırdığı ve proliferatif etkisi en yüksek olanın %0.25 (ağırlık/hacim) kestane balı ve 10 µM kurkumin içeren kombinasyon (KB+KUR10) olduğu saptandı.

İkinci aşamada, saf ve kombine ürünlerin *in vitro* antioksidan aktivitesi DPPH ve CUPRAC yöntemleriyle test edildi ve toplam fenolik ve flavonoid içerikleri belirlendi. En yüksek radikal (DPPH) süpürme aktivitesi, 10 µg /mL arı sütü ve 25 µM rosmarinik asitten oluşan kombinasyonda (RJ+ROS25) tespit edildi. 10 µg/mL kestane poleni metanol ekstresi ve 5 µM kurkuminden oluşan kombinasyon (KPmet+KUR5) ise en yüksek bakır (II) iyonu indirgeme aktivitesine sahipti. Bu kombinasyonlarda rosmarinik asit arı sütü ile sinerjistik etkileşime girerken, kurkumin kestane poleni ekstresi ile aditif etkileşim gösterdi.

Saf ve kombine ürünlerin nörolojik hastalıkların gelişiminde rol oynayan asetilkolinesterazı inhibe etme yeteneği (*in vitro* anti-AChE aktivitesi) Ellman yöntemiyle araştırıldı. Bileşenleri güçlü sinerjistik etkileşim gösteren sekiz farklı kombinasyondan iki tanesi (10 µg/mL arı sütü ve 10 µM kersetin içeren RJ+KER10 kombinasyonu ve 10 µg/mL kestane poleni metanol ekstresi ve 5 µM kurkumin içeren KPmet+KUR5 kombinasyonu) en yüksek anti-AChE aktivitesine sahipti. Bu tez, arı poleni ve apilarnilin yanı sıra tüm kombinasyonların anti-AChE aktivitesini rapor eden ilk çalışmadır.

Küresel ısınmanın etkileri, dünyadaki tüm yaşam formları için yıkıcı olabilir. Erken yaşlanma ve ısı stresi ile ilgili hastalıklar, yüksek sıcaklıklara uzun süre maruziyetle tetiklenebilir. Model organizmalar olarak bal arıları üzerine yapılan sınırlı sayıda araştırma, doğal ürünlerin yaşlanma sürecini yavaşlatma ve sağlıklı yaşam süresini uzatma potansiyeline odaklanmaktadır.

Çalışmanın son aşamasında, en yüksek proliferatif etki gösteren kombinasyonun (KB+KUR10) bal arılarının yaşam süresi üzerindeki etkileri ısı stresi koşullarında deneysel bal arısı modelinde araştırıldı. Bu kombinasyonla beslenen bal arılarının, besin tüketimlerinde herhangi bir değişiklik olmaksızın stres koşullarında ortalama yaşam sürelerinin uzadığı (12 günden 18 güne çıktığı) tespit edildi. Tek başına kestane balı yaşam süresini ancak 3 gün uzatırken, kurkuminin yaşam süresi üzerine bir etkisi yoktu.

Sonuç olarak, tezdeki bulgular bal arısı ürünlerinin nutrasötik ve kozmesötik potansiyelinin bazı fitokimyasalların belli dozlarıyla artırılabilceğini göstermektedir. RJ+ROS25 ve KPmet+KUR5 kozmesötik uygulamalar için, RJ+KER10, KPmet+KUR5 ve KB+KUR10 nutrasötik uygulamalar için aday kombinasyonlar olarak önerilebilir. Ancak ticari ürünlere dönüştürülebilmeleri için daha kapsamlı çalışmalar ve *in vivo* deneylerle etki mekanizmalarının aydınlatılması ve güvenliklerinin teyid edilmesi gerekir. Bu çalışmanın fonksiyonel ve yenilikçi bal arısı ürünlerinin geliştirilmesine öncülük etmesi ve katkı sağlaması beklenmektedir.

Mayıs 2023, 169 sayfa.

Anahtar kelimeler: bal, polen, arı sütü, apilarnil, nutrasötik, kozmesötik, yaşam süresi

SUMMARY

ENHANCEMENT of NUTRACEUTICAL and COSMECEUTICAL POTENTIAL of VARIOUS HONEY BEE PRODUCTS by NATURAL SUPPLEMENTS

Ph.D. THESIS

Gizem SÖNMEZ OSKAY

İstanbul University

Institute of Graduate Studies in Sciences

Department of Molecular Biology and Genetics

Supervisor : Prof. Dr. E.Ş. Nazlı ARDA

Global population growth, changing dietary patterns and conscious consumer preferences have increased the interest in natural food and cosmetic products. The nutraceutical and cosmeceutical market has been growing rapidly in recent years. Accordingly, there is a noticeable increase in research activities related to nutraceutical and cosmeceutical natural products.

Honey bee products and medicinal plants have been used as functional foods since ancient times to prevent many diseases and/or support treatment processes. These products have beneficial effects such as antibacterial, antiviral, antioxidant, and antitumor activity due to their rich chemical content. For this reason, they are considered important resources in the development of new products for the food, cosmetics, and pharmaceutical industries.

Although there are commercial honey bee products enriched with plant extracts or phytochemicals in the food and cosmetics sector, studies on their efficacy and safety are very limited.

The aim of this study is to obtain new and standard combinations by adding a phytochemical to various honey bee products, to examine their bioactivity, and to develop new products with high nutraceutical and cosmeceutical potential.

In the first stage of the study, the cytotoxic effects of honey bee products (chestnut honey, chestnut pollen, royal jelly and apilarnil) and phytochemicals (quercetin, curcumin and rosmarinic acid) on NIH3T3 mouse embryonic fibroblast cells were investigated. Combinations were prepared by choosing concentrations of the components that did not show toxic or proliferative effects on cells, and the cytotoxicity of each combination was determined. It was detected that the combinations increased cell proliferation by 30%-79.9% and the one with the highest proliferative effect was the combination containing 0.25% (w/v) chestnut honey and 10 μ M curcumin.

In the second stage, *in vitro* antioxidant activities of pure and combined products were tested by DPPH and CUPRAC methods, and total phenolic and flavonoid contents were determined. The highest radical (DPPH) scavenging activity was detected in the combination of 10 μ g/mL royal jelly and 25 μ M rosmarinic acid (RJ+ROS25). The combination of 10 μ g/mL chestnut pollen methanol extract and 5 μ M curcumin (KPmet+KUR5) possessed the highest copper (II) ion-reducing activity. In these combinations, rosmarinic acid interacted with royal jelly synergistically, while curcumin interacted with chestnut pollen extract additively.

The ability of pure and combined products to inhibit acetylcholinesterase, which plays a role in the development of neurological diseases (*in vitro* anti-AChE activity) was investigated by the Ellman method. Two of eight different combinations (RJ+KER10 containing 10 μ g/mL royal jelly and 10 μ M quercetin, and KPmet+KUR5 containing 10 μ g/mL chestnut pollen methanol extract and 5 μ M curcumin), whose components show strong synergistic interaction, have the highest anti-AChE activity. This thesis is the first study to report the anti-AChE activity of all combinations as well as bee pollen and apilarnil.

The effects of global warming can be devastating for all life forms on Earth. Premature aging and heat stress-related diseases can be triggered by prolonged exposure to high temperatures.

Limited research on honey bees as model organisms focuses on the potential of natural products to slow the aging process and prolong healthy lifespan.

In the final stage of the study, the effects of the combination with the highest proliferative effect (KB+KUR10) on the lifespan of honey bees were investigated in an experimental honey bee model under heat stress conditions. It was determined that the average life span of honey bees fed with this combination was prolonged (from 12 days to 18 days) under stress conditions without any change in their food consumption. While chestnut honey alone extended the lifespan by only 3 days, curcumin had no effect on the lifespan.

In conclusion, the findings in the thesis show that the nutraceutical and cosmeceutical potential of honey bee products can be increased with certain doses of some phytochemicals. RJ+ROS25 and KPmet+KUR5 can be recommended as candidate combinations for cosmeceutical applications, RJ+KER10, KPmet+KUR5 and KB+KUR10 for nutraceutical applications. However, their mechanism of action should be elucidated and their safety should be confirmed by more comprehensive studies and *in vivo* experiments before they can be converted into commercial products. It is expected that this study will lead and contribute to the development of functional and innovative honey bee products.

May 2023, 169 pages.

Keywords: Honey, pollen, royal jelly, apilarnil, nutraceutical, cosmeceutical, lifespan

1. GİRİŞ

Doğal ürünler, ilaç keşfinde uzun bir geçmişe sahiptir. İlaç ham maddelerinin %80'inden fazlasının doğal maddelerden veya türevlerinden oluştuğu bildirilmiştir (Selamoglu, 2018). Bitkilerde bulunan fitokimyasalların (fenolik asitler, flavonoidler, vitaminler, steroller, yağ asitleri vb.) çeşitliliği, bunları bir ilaç kaynağı olarak konumlandırmaktadır (Lahlou, 2013; Bernardini ve diğ., 2018). Dünya Sağlık Örgütü verilerine göre, dünyadaki toplam nüfusun %75'inden fazlasının temel sağlık ihtiyaçları için bitkisel ilaçlara ve/veya bitkisel ürünlere bağımlı olduğu tahmin edilmektedir (Sagnia ve diğ., 2014).

Son yıllarda insanlar, temel beslenme gereksinimlerini güvenli ve sağlıklı doğal gıdalardan karşılamanın yanı sıra hastalıklardan korunmak ve yaşam kalitelerini artırmak amacıyla biyoaktif doğal ürünlere (nutrasötiklere) yönelmektedir. Bu eğilime paralel olarak, hücre yenilenmesini hızlandırıcı, cildi besleyici, kan dolaşımını artırıcı, güneşin zararlı etkilerini engelleyici, derinin canlı epidermis tabakalarına kadar emilebilen bitkisel veya hayvansal kaynaklı doğal aktif kozmetiklere (kozmesötiklere) olan ilgi de dikkat çekicidir (Karabudak ve Yıldız, 2012). Nutrasötiklerin pazar büyüklüğü 2019'da 152 milyar ABD doları, 2018'de kozmetiklerin değeri ise 49.5 milyar ABD doları olarak bildirilmiştir (Rahul ve Sreedhar, 2022). Dış görünümü güzelleştirmek ve zindeliği artırmak için gıda olarak (oral yolla) tüketilen nutrikozmetiklerin pazardaki payının 2025'te 7.9 milyara ulaşacağı ve öngörülen dönemde ortalama %5.0'lik bir büyüme oranı kaydedeceği bildirilmiştir (Dini ve Laneri, 2019).

Bal arısı ürünleri, eski çağlardan beri yüksek besin değeri ve nutrasötik özelliklerinden dolayı sağlıklı beslenme ve hastalıklardan korunma amacıyla kullanılmaktadır. Bu ürünler "antioksidan, antimikrobiyal, antitümör, anti-enflamatuar, antiviral" gibi etkilere sahip proteinler, şekerler, yağ asitleri, prebiyotikler, probiyotikler, fitokimyasallar, biyoaktif peptitler, mineraller, vitaminler ve organik asitler gibi çeşitli bileşenler içerirler. İn vitro ve in vivo çalışmalarda, bal arısı ürünlerinin çeşitli hastalıkların patogeneğinde rol alan oksidatif stresin zararlı etkilerini engelleyecek veya ortadan kaldıracak doğal antioksidanlar bakımından zengin olduğu gösterilmiştir (Yucel ve diğ., 2017; Ramanathan ve diğ., 2018; Kocot ve diğ., 2018).

Türkiye bitki çeşitliliği açısından dünyanın en zengin ülkeleri arasında yer almaktadır. Ülkemiz, yaklaşık 450 türü bal bitkisi olarak bilinen 12.476 doğal bitki türüne ev sahipliği yapmaktadır (Ozkok ve diğ., 2018). Coğrafi konumu, bitki çeşitliliği ve mevsimsel farklılıklarıyla ülkemiz beş farklı yerli bal arısı (*Apis mellifera* L.) ırkına sahiptir (Kandemir ve diğ., 2006). Arıcılık tüm dünyada olduğu gibi Türkiye'de de son yıllarda önemli gelişmelerin kaydedildiği bir sektör haline gelmiştir. 2019 yılı itibariyle Türkiye'de 80.675 arıcılık işletmesine ait 8.128.360 kovan bulunmakta ve 109.330 ton bal üretildiği bildirilmektedir (Kaygisiz, 2023). Ülkemizde, bal ve balmumu dışındaki diğer arı ürünlerinin üretimi ile ilgili sağlıklı istatistiksel veriler bulunmamakla beraber, gelişmiş ülkelere göre üretimin oldukça geri kaldığı tahmin edilmektedir. Bu nedenle ülkemizde üretilen bal arısı ürünlerinin potansiyel faydalarının ortaya konması amacıyla yapılacak *in vitro* ve *in vivo* çalışmalara çok ihtiyaç duyulmaktadır.

Bal arıları ekonomik ve ekolojik öneme sahip sosyal bir böcek grubu olmasının yanı sıra öğrenme, hafıza ve iş bölümü gibi biyolojik özellikleri sayesinde model organizma olarak kullanılmaktadır (Giray ve Robinson, 1994; Zheng ve Hu, 2009). Son yıllarda hem bal arılarını hem de bal arısı ürünlerini etkileyen iklim değişikliği, habitat kaybı, zararlılar ve hastalıklar, pestisit kullanımı, arıcılık uygulamaları ve tarımsal uygulamalar gibi birçok olumsuz faktör bildirilmiştir (Hristov ve diğ., 2020). Özellikle son on yılda dünya ikliminde kaydedilen değişikliklere paralel olarak küresel ortalama sıcaklıkların yükseldiği bilinmektedir (Diffenbaugh vd., 2017). Küresel ısınma, dünyadaki yaşam için potansiyel olarak geniş kapsamlı sonuçları olan önemli bir sorun haline gelmiştir. Artan sıcaklığa maruziyet, ısı stresine bağlı hastalıkları ve erken yaşlanmayı tetikleyen kritik bir risk faktörüdür. İnsan sağlığı üzerinde olumsuz etkileri göz önüne alındığında, özellikle gelişmekte olan ülkeler ve dünyadaki hassas nüfusların (yaşlılar, çocuklar ve kronik hastalıkları olan kişiler gibi) daha fazla etkileneceği ön görülmektedir. İklim değişikliği ve küresel ısınmaya yol açan faaliyetlerin denetlenmesi ve önlenmesi yönündeki girişimler son yıllarda hız kazanmakla beraber henüz problemin çözümüne yönelik önemli bir ilerleme kaydedilememiştir. Bu nedenle ısı stresi sadece insanoğlunun değil, diğer canlıların da yaşamını tehdit etmeye devam etmektedir. Bu bağlamda ısı stresine bağlı hasarları önleyecek veya azaltacak koruyucu tedbirler konusunda kapsamlı araştırmalara ihtiyaç vardır.

Bu tez çalışmasında; sahip oldukları biyoaktiviteler nedeniyle nutrasötik ve/veya kozmesötik potansiyeli olduğu öne sürülen bal arısı ürünlerinin içeriği, sağlığa yararlı etkileri kanıtlanmış fitokimyasallarla zenginleştirilmeye çalışılmıştır. Yüksek saflıkta üç fitokimyasal (kersetin, kurkumin ve rosmarinik asit), Türkiye'nin farklı bölgelerinden elde edilen ticari arı ürünlerine (kestane balı, kestane poleni, arı sütü ve apılarnil) belli oranlarda eklenerek çeşitli kombinasyonlar hazırlanmış, hem bu kombinasyonların hem de kombinasyonu oluşturan bileşenlerin hücre canlılığı üzerine etkileri, in vitro antioksidan ve anti-asetilkolinesteraz aktiviteleri incelenmiştir. Ek olarak proliferatif etkisi yüksek olan bir kombinasyonun bal arılarının yaşam süresine etkisi ısı stresi koşulları yaratılan deneysel bal arısı modelinde araştırılmıştır. Kullanılan tüm yöntemler Malzeme ve Yöntem bölümünde ayrıntılı şekilde açıklanmıştır. Aktivite sonuçları test edilen tüm ürünler karşılaştırılarak Bulgular bölümünde sunulmuş, çalışmanın literatürdeki yeri Tartışma ve Sonuç bölümünde ele alınmıştır.

Bu çalışma ile, nutrasötik ve kozmesötik potansiyeli bal arısı ürünlerinden daha yüksek apifitoterapötik karışımlar geliştirilebileceği doğrulanmış ve gelecek çalışmalarla daha ayrıntılı incelenerek ticari ürünlere dönüştürülebilecek özgün kombinasyonlar önerilmiştir.

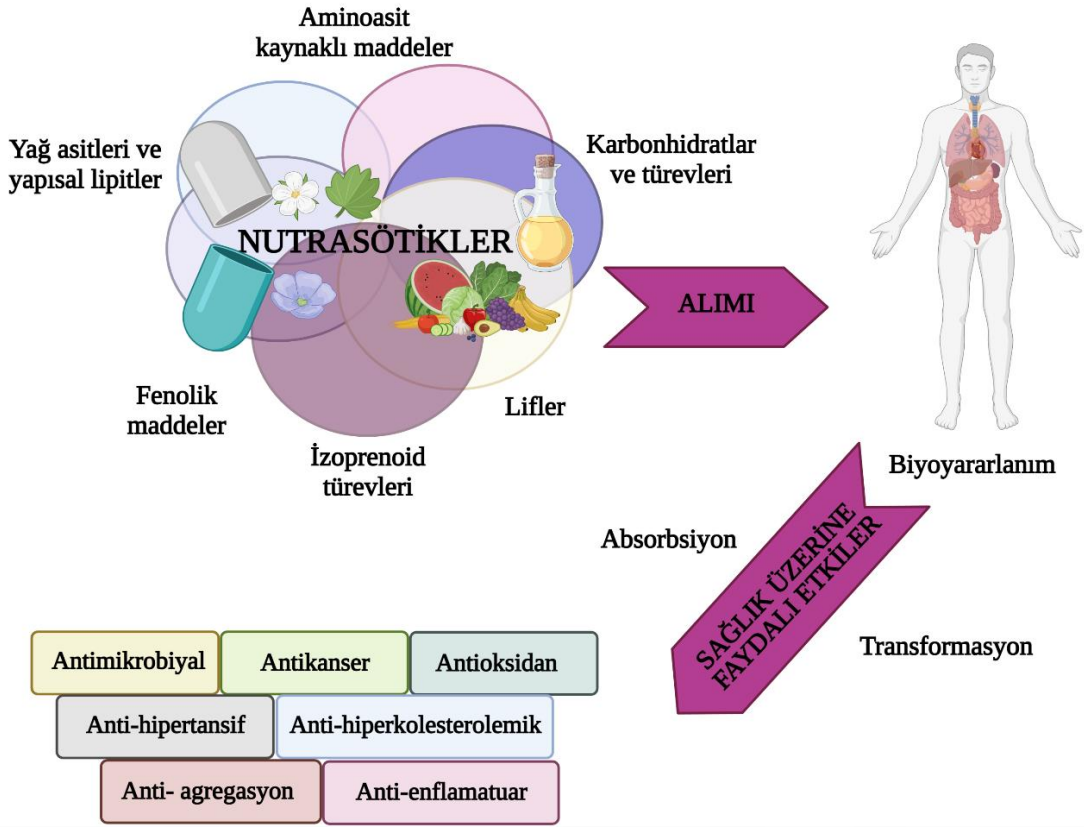
2. GENEL KISIMLAR

2.1. NUTRASÖTİKLER, KOZMESÖTİKLER VE NUTRİKOZMETİKLER

'Besin' ve 'farmasötik' kelimelerinin kombinasyonundan oluşan 'Nutrasötik' terimi, ilk defa 1989 yılında Dr. Stephen DeFelice tarafından ortaya atılmıştır. Mevcut tanıma göre, 'nutrasötik', bir hastalığın önlenmesi ve/veya tedavisi de dahil olmak üzere tıbbi veya sağlıkla ilgili faydalar sağlayan bir gıda (veya gıdanın bir kısmı) anlamına gelmektedir (DeFelice, 1995). Tanımlanan terminoloji yıllar içinde gelişmiştir ve 'nutrasötik'i genellikle tıbbi formlarda satılan, gıdalardan izole edilmiş veya saflaştırılmış bir ürün' olarak nitelendirmektedir (Tsiaka ve diğ., 2022). Günümüzde geniş 'nutrasötik' kavramı, insan sağlığını olumlu yönde etkilediği savunulan çok çeşitli farklı, doğal olarak oluşan ürünleri kapsar ve bu nedenle çeşitli fonksiyonel gıdalar, güçlendirilmiş gıdalar ve diyet takviyeleri burada yerlerini bulmuştur (Andrew ve Izzo, 2017).

Son yıllarda küresel nutrasötik endüstrisi hızla gelişmekte ve çeşitlenmektedir. Sağlık hizmetlerindeki pazar eğilimleri, tedavi ve hastalık yönetiminden ziyade önleyici sağlık hizmetleri stratejilerine yönelmektedir. Hem gelişmekte olan hem de gelişmiş ülkelerde sağlık müdahalelerinin yüksek maliyetiyle birleşen kronik hastalıkların artması nutrasötiklere olan talebi de artırmaktadır. Ayrıca, nüfusun yaşlanması, bulaşıcı olmayan hastalıklardaki artış, yüksek personel geliri, yaşam tarzındaki değişiklik, insanların düşünce kalıpları ve nutrasötiklerin ilaç olarak kullanımı küresel nutrasötik endüstrisindeki eğilimlerdir (Pathak ve diğ., 2018; Jayaweera, 2023). Bununla birlikte, tüketici tercihinde sentetik farmasötik preparasyonlardan doğal ve organik nutrasötik bileşenlere doğru bir kayma görülmektedir (Chopra ve diğ., 2022).

Nutrasötikler, temel olarak kimyasal yapıları veya etki mekanizmalarına dayalı olarak farklı sınıflarda sınıflandırılmaktadır. Nutrasötikler Şekil 2.1' de gösterildiği gibi antioksidan, anti-enflamatuar, antimikrobiyal ve antineoplastik etki gibi spesifik terapötik özelliklere sahip izoprenoid türevleri, fenolik bileşikler, yağ asitleri, lipid, amino asitler, lif ve karbonhidrat moleküllerini içermektedirler (Caponio ve diğ., 2022).

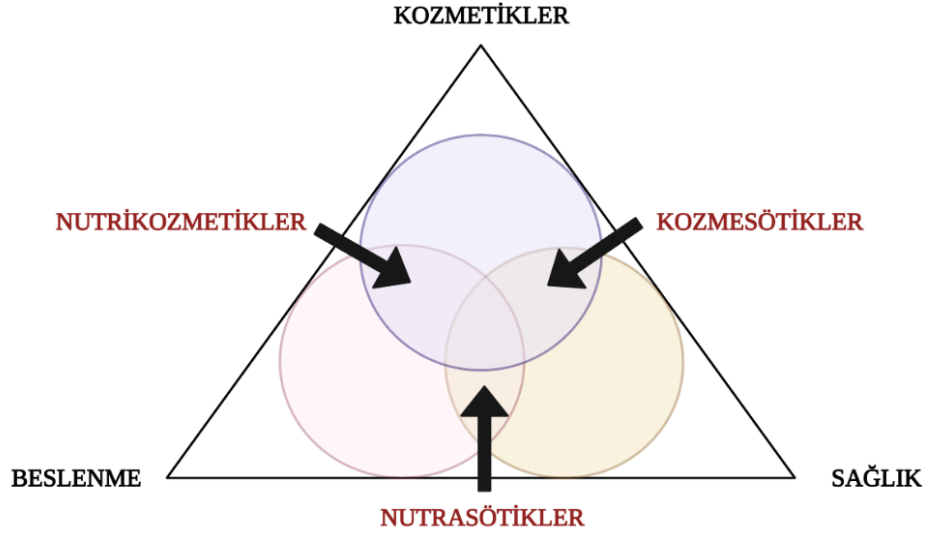


Şekil 2.1: Nutrasötikler ve biyolojik aktiviteleri (Biorender.com).

Kozmesötik terimi, ilk kez 1984 yılında Dr. Albert Kligman tarafından, cildin sağlığını ve görünümünü iyileştirmeyi amaçlayan kozmetik ve ilaçların arayüzündeki hibrit bir ürün kategorisini tanımlamak için ortaya atılmıştır. Federal Gıda, İlaç ve Kozmetik Yasası (FDandC), bir kozmetik için şu tanımlı kullanır: "insan vücuduna veya herhangi bir kısmına sürülmesi, dökülmesi, serpilmesi veya püskürtülmesi, sokulması veya başka bir şekilde uygulanması amaçlanan ürünler" temizleme, güzelleştirme, çekiciliği artırma veya görünüşü değiştirme" olarak tanımlanırken, hem Amerika Birleşik Devletleri'nde hem de Avrupa Birliği'nde bir ilaç "hastalığın teşhisi, hafifletilmesi, tedavisi veya önlenmesinde kullanılan veya vücudun yapısını veya herhangi bir işlevini etkilemesi amaçlanan bir madde" olarak tanımlanmaktadır" (Sotiropoulou ve diğ., 2021). "Kozmesötik" teriminin uygunluğu, basit kozmetik iyileştirmenin ötesinde etkiler sağlayan, ancak bir ilaç veya farmasötik olarak nitelendirilmesinin gerisinde kalan yeni bir kozmetik ürün türünü temsil etmektedir (Pandey ve diğ., 2019).

Güzellik endüstrisindeki en son trendi temsil eden en yeni konsept, "kozmesötikler" ve "nutrasötikler" in bir kombinasyonundan ortaya çıkan "nutrikozmetik" tir ve bunlar, özel

olarak formüle edilmiş ve güzellik amaçlı pazarlanan besinlerin oral takviyesine yöneliktir (Alves ve diğ., 2020).



Şekil 2.2: Nutrikozmetik kavramı (Biorender.com).

Nutrikozmetikler görünüşe fayda sağlamak için gıda veya oral takviyelerin tüketilmesi olarak tanımlanabilir ve “güzellik hapları”, “içten gelen güzellik” ve hatta “oral kozmetik” olarak da adlandırılır (Anunciato ve da Rocha, 2012). Nutrikozmetik terimi insan derisinin, tırnaklarının, saçının işlevini ve görünümünü iyileştiren sindirilebilir doğal sağlık ürünlerini tanımlar. Güzelleştirme ve/veya kişisel hijyen faydaları sunan koruyucu veya duyarlı etkilerle güzelliği dahili olarak artıran maddelerdir. Nutrikozmetikler, takviyeler veya sıvı ve katı formlarda gıda takviyesi ile ağızdan tüketilir. Çeşitli doğal gıdalar ve yan ürünleri nutrikozmetik ürünlerin geliştirilmesi için biyoaktif bileşiklerin kaynağı olarak kullanılabilir (Hernandez ve diğ., 2021). Nutrikozmetik, cildi beslemek için mikrobeyinler (mineraller, vitaminler), makrobeyinler (peptitler, esansiyel yağ asitleri) ve botanikler (bitkisel ve meyve özleri) gibi kozmetik ürünlerin ve gıda takviyelerinin kullanımını optimize etmeyi amaçlayan yeni bir kozmetik sektördür. Nutrikozmetiklerin avantajı, Tablo 2.1’de verilen gıda bileşenlerinin cilde ek olarak sağlığın iyileştirilmesine katkıda bulunabilmesidir (Meléndez-Martínez, 2022).

Tablo 2.1: Nutrikozmetik etkili gıda bileşenleri (Meléndez-Martínez, 2022).

BİLEŞİKLER	KAYNAK
Kolajenden türetilen peptidler	Deniz ve karasal hayvansal protein kaynakları
Glikozaminoglikanlar	Deniz balığı ve kemik matrisi
Polifenoller	Meyveler (elma, üzüm, çilek, narenciye vb.), sebzeler (domates, soğan, lahana, turp vb.), tahıllar, soya, çikolata, kahve ve çay
Çoklu doymamış yağ asitleri (PUFA'lar)	Yağlar, kabuklu yemişler ve tohumlar
	Soğuk su balığı
Karotenoidler	Meyveler (mango, kayısı, narenciye, papaya vb.), sebzeler (yeşil sebzeler, domates, havuç, kabak, biber vb.), somon balığı ve yumurta sarısı
Koenzim Q10	Yağlar (soya fasulyesi, mısır, zeytin ve kanola), fındık ve tohumlar
	Et, kümes hayvanları ve balık
A vitamini	Yeşil sebzeler, tatlı patates, havuç, kayısı, mango ve hurma yağı (provitamin A karotenoidleri)
	Karaciğer ve balık yağları, süt ve yumurta (önceden oluşturulmuş A vitamini)
C vitamini	Çiğ kırmızı ve yeşil biber, portakal, aserola, greyfurt, kivi, çilek, brokoli, Brüksel lahanası
E vitamini	Fındık, tohumlar, sebzeler (domates, ıspanak, kuşkonmaz, pazı ve brokoli), mısır, soya ve avokado
Cu	Kabuklu yemişler, tohumlar ve tahıllar
	Et ve deniz ürünleri
Se	Tahıllar
	Et, süt, deniz ürünleri
Zn	Tahıl, fındık, baklagiller
	Et, deniz ürünleri, yumurta

Sağlıklı bir cilde sahip olmak için dünya çapında artan talep, yeni cilt bakım ürünlerinin geliştirilmesine yol açmaktadır. Nutrikozmetikler bu talebi karşılamak için piyasadaki en iyi seçeneklerdir. Bu nedenle, bu ürünlerin geliştirilmesi için doğal kaynakların araştırılması ivme kazanmaktadır. 2030 yılına kadar, dünyanın 60 yaş üstü nüfusu 1.4 milyara ulaşacak, bu nedenle, tüketicilerin genç ve estetik görünüm, cilt yaşlanma ve kırıksık karşıtı taleplerinin önümüzdeki yıllarda artacağı varsayılmaktadır. Bu senaryoda, nutrikozmetik ürünler doğal ürünler oldukları, sağlığı iyileştirdikleri ve yan etkileri olmadığı düşünüldüğü için geniş bir pazar bulmalıdır (Dini, 2022). Avrupa, pazardaki en büyük yatırımcıdır ve bunu Asya-Pasifik ve Kuzey Amerika izlemektedir (Dini ve Laneri, 2019). Nutrikozmetik pazarının özellikleri Tablo 2.2 'de verilmiştir.

Tablo 2.2: Avrupa, Japonya ve Amerika Birleşik Devletleri'ndeki nutrikozmetik pazarlarının özellikleri (Taeymans ve diğ., 2014).

	Avrupa	Japonya	ABD
Başvuru formu	Tabletler	Sıvılar	Tabletler
Fiyat	Yüksek	Düşük	Orta
Dağıtım kanalı	Eczaneler	Kitlesel ana kanal	Özel anlaşma
Markalar	Avrupa'ya özgü	Japonya'ya özgü	ABD'ye özgü
Faydaları	Cilt, saç	Güzellik desteği, cilt	Cilt
Ürün iddiaları	Özel	Belirsiz	Belirsizden özele

Pazarda yer alan ticari nutrikozmetik ürünler Tablo 2.3'de verilmiştir. Innéov, aktif bileşenler olarak soya izoflavonları ve likopen içeren nutrikozmetiklerin geliştirilmesine odaklanan İspanya'da bir kuruluştur. Ürünleri cilt ve saç sağlığı için oral takviye olarak tüketilmektedir. Meksika'da Dekos, C, A ve E vitaminleri gibi cilt sağlığı için gerekli vitaminler açısından zengin nutrikozmetikler üretmeye ve satmaya adanmış yeni bir girişimdir. Ürünleri, üzümünden resveratrol, kollajen hidrolizatlar ve Omega-3 içermektedir. Avrupa'da çeşitli narenciye meyvelerinden nutrikozmetik üreten bazı markalar vardır, SunLover portakal, nar ve siyah havuç özleri içeren bir içecektir. Nutroxsun, cilde anti-enflamatuar aktivite ve antioksidan koruma sağlayan greyluft ve biberiye özü içeren bir tozdur. İtalyan şirketi Bionap, aktif içeriği ülkede yetişen üç çeşit kırmızı-portakaldan elde edilen bir özüt olan bir nutrikozmetik ürüne sahiptir. Bu özler antosiyaninler, hidroksisinnamik asitler, flavanonlar ve C vitamini açısından zengindir. Japonya'da 2019 yılında POLA Orbis kuruluşu tarafından piyasaya sürülen yeni bir ürün olan Orbis defencera®, nem kaybını önlemek için kullanılan ve FOSHU tarafından onaylanan, ağızdan alınan bir cilt bakım ürünüdür (Hernandez ve diğ., 2021).

Tablo 2.3: Piyasadaki ticari nutrikozmetik ürünler (Hernandez ve diğ., 2021).

ÜRÜN	AKTİF BİLEŞEN	UYGULAMA	MARKA
Innéov firmeza 45+	Lakto likopen, Soya izoflavonları,	Yaşlanma karşıtı	INNÉOV
Elixir	<i>Vitis vinifera</i> spp kaynaklı resveratrol	Antioksidan yaşlanma karşıtı	Dekos
Sun Lover Regenerator	Nar özü VIQUA®	Antioksidan yaşlanma karşıtı	Sun Lover
Orbis defencera®	Pirinç tohumundan ekstrakte edilen glukozil seramid	Cilt kuruluşunu önler	POLA Orbis
Nutroxsun	Narenciye ve biberiye özü	ROS temizleme	MONTELOEDER
Red Orange Complex®	Sicilya kırmızı portakal suyundan ekstrakt (<i>Citrus sinensis</i> L.)	Cilt foto-yaşlanmasına karşı korur	BIONAP
SODB®	Kavundan elde edilen süperoksit dismutaz	Yaşlanma karşıtı UV koruması	BIONOV
G3	<i>Momordica cochinchinensis</i> ekstrakte edilen karotenler	Cilt sağlığının iyileştirilmesi	NuSkin

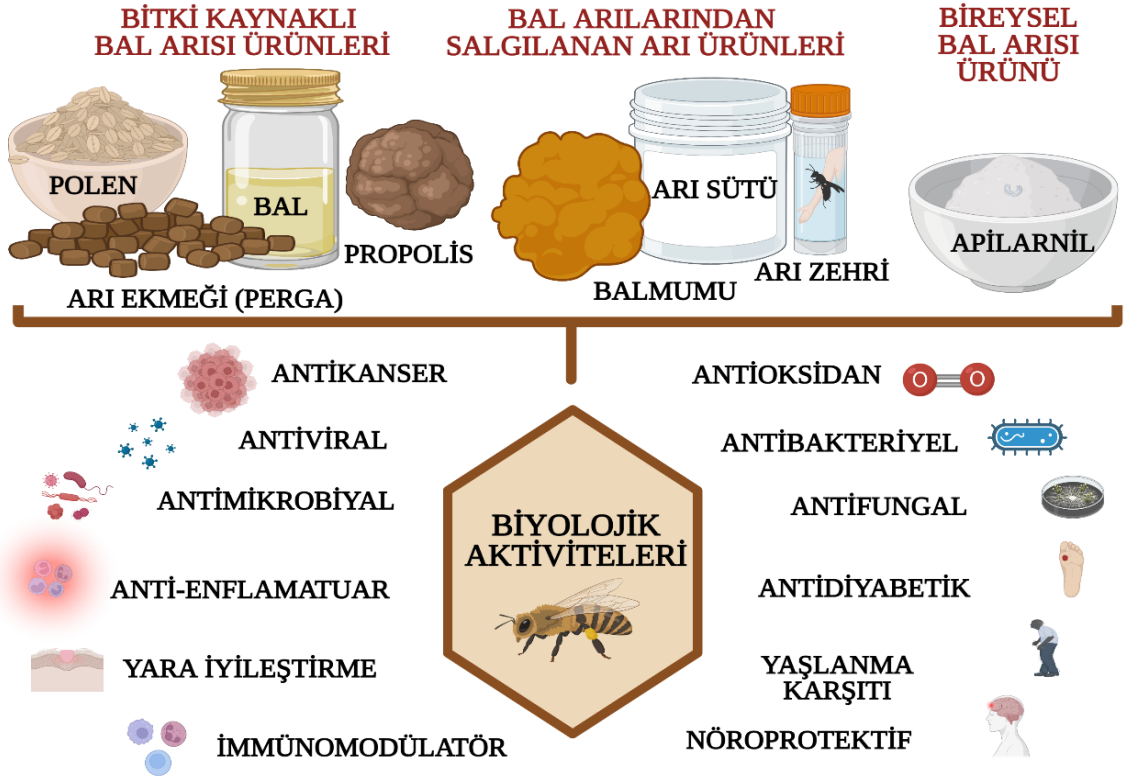
Sonuç olarak, nutrasötikler, kozmesötikler ve nutrikozmetikler sağlığın korunmasına, kronik hastalıkların gelişme riskinin azaltılmasına ve mevcut farmakolojik tedavilerin desteklenmesine veya tamamlanmasına yardımcı olmaktadır. Bu ürünlerin potansiyel sağlık yararlarına ve istikrarlı pazar büyümesine rağmen, bu alanda önemli zorluklar devam etmektedir. Ana zorluklardan biri, tıpkı ilaç sektöründeki ilaçlarda olduğu gibi, aktif moleküllerin organizmadaki etki mekanizmasının anlaşılması ve pazar öncesi onay sırasında etkilerinin özgüllüğünü kanıtlamaktır (Carpio ve diğ., 2021). Biyoaktif bileşiklerin etkinliğini ve güvenliğini değerlendirmek için *in vitro* ve *in vivo* analizleri yapılmalıdır. Ayrıca, belirli bir popülasyondaki etkinliklerini doğrulamak için de klinik deneyler gereklidir. Toksik etki olmaksızın optimum fayda sağlamak için biyoaktif bileşiklerin minimum günlük dozları açısından gelecekteki araştırmalar yapılmalıdır. Kullanılan maddelerinin fizikokimyasal özellikleri ile ilgili araştırmalara, ana biyoaktif bileşiğin emilimini ve biyoyararlanımını artırmak için ihtiyaç vardır (Hernandez ve diğ., 2021).

2.2. BAL ARISI ÜRÜNLERİ

Bal arıları, çok çeşitli tarımsal mahsuller için oldukça değerli tozlaşma hizmetleri sağlar ve dünya çapında mahsuller için en yaygın tek tozlayıcı tür olarak bilinmektedir (Calderone, 2012). Küresel olarak en önemli mahsullerin %90'ını tozlaştırırlar. Amerika Birleşik Devletleri (ABD) gibi bazı ülkelerde, tozlaştırma hizmeti, bal arılarını badem bahçelerini tozlamak için kullanan arıcılar için birincil gelir kaynağıdır (Goodrich, 2019). Bal arıları, bal ve diğer önemli bal arısı ürünlerini üreten “Altın böcekler”dir. Bal arıları, latince “arı” anlamına gelen *Apis* cinsine aittir. Dünyada ürünleri için yetiştirilen birkaç arı türü arasında en yaygın tür *Apis mellifera* L.’dir (Faqihi ve Taha, 2022). Bal arısının doğal dağılım aralığı Afrika, Avrupa ve Batı Asya’yı içerir, ancak bugün bu tür, çok sayıda göç ve giriş nedeniyle dünya çapında bulunmaktadır (Muñoz ve De la Rúa, 2021). Dünyada *A. mellifera*’nın yaklaşık 30 alt türü bulunmakla birlikte, 5 tanesi (*Apis mellifera caucasica*, *A. m. syriaca*, *A. m. anatoliaca*, *A. m. meda*, *A. m. carnica*), göç yolları üzerindeki özel coğrafi konumu ve iklimsel çeşitliliği nedeniyle Türkiye’de yayılış göstermektedir (Kekeçoğlu ve diğ., 2021).

Bal ve diğer kovan ürünlerinin tıbbi amaçlarla kullanımı 'Apiterapi' olarak adlandırılan alternatif tıbbın yeni bir dalında oldukça değerlidir (Hossain ve diğ., 2022). Dünyanın birçok ülkesinde uygulanmakta ve önde gelen ülkeler arasında Brezilya, ABD, Çin, Japonya, İsviçre, Hırvatistan, Bulgaristan ve Türkiye’nin yer aldığı bildirilmektedir (Weis ve diğ., 2022). Ülkemizde Apiterapi’den ilk defa, Sağlık Bakanlığı tarafından 27 Ekim 2014’de çıkan Geleneksel ve Tamamlayıcı Tıp Uygulamaları Yönetmeliği’nde; ‘arı ve arı ürünlerinin koruyucu ve bazı hastalıkların tedavisinde destek olarak kullanılması’ tanımıyla bahsedilmektedir (Atayoğlu, 2019). Bal, balmumu, polen, propolis, arı sütü, arı zehri, kraliçe, işçi ve erkek arı larvaları da Apiterapi’ de kullanılan arı ürünleridir (Basa ve diğ., 2016). Bu ürünlerden bal, polen, propolis ve perga arılar tarafından bitkilerden toplanarak elde edilirken; balmumu, arı sütü ve arı zehri bal arılarının kendisi tarafından kimyasal olarak sentezlenmektedir (Schmidt, 1997). Arılar tarafından yapılan her ürün, her bir arı ürününe spesifik özellikler kazandıran belirli bir bileşene ve biyolojik olarak aktif maddelere sahiptir. Bu nedenle bal arısı ürünlerinin iyileştirici özelliklerini de kimyasal bileşenleri belirler. Bal arısı ürünlerinin kimyasal içeriği bitkisel yapıya, coğrafi kökene, toplama zamanına ve çevre koşullarına bağlı olarak çeşitlilik göstermektedir (Kurek-Górecka ve diğ., 2020).

Bugüne kadar bal arısı ürünleri üzerine yapılan araştırmalar, bunların bileşimlerini, özelliklerini ve potansiyel terapötik etkilerini anlamaya odaklanmaktadır. Doğal bal arısı ürünleri ve biyolojik aktiviteleri Şekil 2.3’de verilmiştir. Çalışmalarda bal arısı ürünlerinin antioksidan, antibakteriyel, antifungal, antikanser, antiviral, antimikrobiyal, anti-enflamatuar, immünomodülatör, antidiyabetik, yara iyileştirme, yaşlanma karşıtı ve nöroprotektif etkilerinden bahsedilmektedir (Nordin ve diğ., 2018; Kolaylı ve diğ., 2020; Martinello ve diğ., 2021; Nainu ve diğ., 2021; Loukas ve Maria, 2023).



Şekil 2.3: Bal arısı ürünleri ve biyolojik aktiviteleri (Biorender.com)

Bal, arı poleni, propolis, arı sütü, balmumu ve arı zehiri gibi bal arısı ürünleri önemli farmasötik ve kozmetik bileşenlerdir. Yanık ve yaraları iyileştirmek için bal, propolis ve polen kullanılmaktadır. Arı sütünün kollajen üretimini artırarak cildi UVB'nin neden olduğu foto ve cilt yaşlanmasına karşı potansiyel olarak koruyabileceğini göstermektedir. Balın da cilt üzerinde yumuşatıcı, nemlendirici, yatıştırıcı, cildi genç tutan ve kırışık oluşumunu geciktirici, cilt pH'ının düzenlenmesi ve patojen enfeksiyonların önlenmesi gibi özellikleri bulunmaktadır. Arı zehri, yara iyileşme sürecinde kullanılan aktif peptitler ve aminler içermektedir. Atopik dermatit gibi cilt hastalıklarına karşı iyileştirici etki gösteren doğal bir

arı ürünüdür. Akne vulgarise karşı antimikrobiyal aktivitesi bulunmaktadır (Kurek-Górecka ve Olczyk, 2022; Tanuğur Samancı ve Kekeçoğlu, 2022). İşçi bal arıları, karın boşluğundan salgılanan arı zehrinin (BV) %80'den fazlası sudur. Tek bir arıdan 0.1 µg kuru zehir elde edilebilir. BV, arı kolonilerini savunmada önemli bir rol oynayan küçük peptitler ve enzimler dahil olmak üzere 18'den fazla farmakolojik olarak aktif bileşik içeren doğal bir toksindir (Abd El-Wahed ve diğ., 2019). Birçok güncel çalışma arı zehri ve bileşenlerinin antikanser aktivitesini bildirmiştir (Mansour ve diğ., 2021; Varol ve diğ., 2022; Obeidat ve diğ., 2023; Sevin ve diğ., 2023).

Propolis en popüler ve en çok kullanılan arı ürünlerinden biridir. Propolis, bal arıları tarafından bitkilerden toplanan ve salgılarıyla modifiye edilen reçinemsî bir maddedir. İklim özellikleri, fitocoğrafik koşullar, bal arısı türleri, çevre koşulları ve hasat mevsimi propolisin çeşitliliğini sağlayan başlıca parametrelerdir. Propolis'in kimyasal bileşimi çok karmaşıktır. Bugüne kadar propoliste 1000'den fazla bileşik tanımlanmıştır. Bu bileşikler, fenolik asitler, flavonoidler, terpenler, alkaloidler vb. gibi çeşitli kimyasal gruplara aittir (Belmehtdi ve diğ., 2022). Propolisin antioksidan, antikanser, antiviral, antimikrobiyal, antiparazitik, anti-enflamatuar, anti-anjiyojenik, antidiyabetik vb. çeşitli biyolojik aktivitelere sahip olduğu bildirilmiştir (Hossain ve diğ., 2022; Wiecezorek ve diğ., 2022; Ożarowski ve Karpiński, 2023). Son yıllarda propolis, kozmetik ve farmasötik ürünlerde bir bileşen olarak çok sayıda kullanım alanı bulmuştur. Propolis, akne önleyici kremlerde, vücut ve yüz kremlerinde, losyonlarda, merhemlerde ve esas olarak vücut, yüz veya ağız hijyeni için hijyenik ürünler olarak kullanılan diğer birçok üründe kullanılmaktadır (Segueni ve diğ., 2023).

Arı ekmeği (perga) sadece insanlar için değil arılar için de çok önemli olan eşsiz bir üründür. Arı ekmeği esas olarak polen, bal ve arıların tükürük bezlerinin salgılarını içermektedir. Arılar, petek hücrelerindeki bileşenleri paketler, ardından karışımı balmumu ve balla sabitler. Bu şekilde toplanan ve muhafaza edilen polenler, petek ortamında laktik fermantasyona tabi tutulur. Fermente arı polenine “arı ekmeği” denir. Arı ekmeği, polenden daha yüksek besin değeri, daha iyi sindirilebilirlik ve daha zengin kimyasal bileşim ile karakterize edilir (Kieliszek ve diğ., 2018). Arı ekmeğinin içerdiği metabolitler, proteinler, vitaminler (C, B, K, P ve E), karotenoidler ve antosiyaninler ve flavonoidler gibi polifenoller gibi temel kimyasal madde gruplarıdır (Khalifa ve diğ., 2020).

2.2.1. Bal

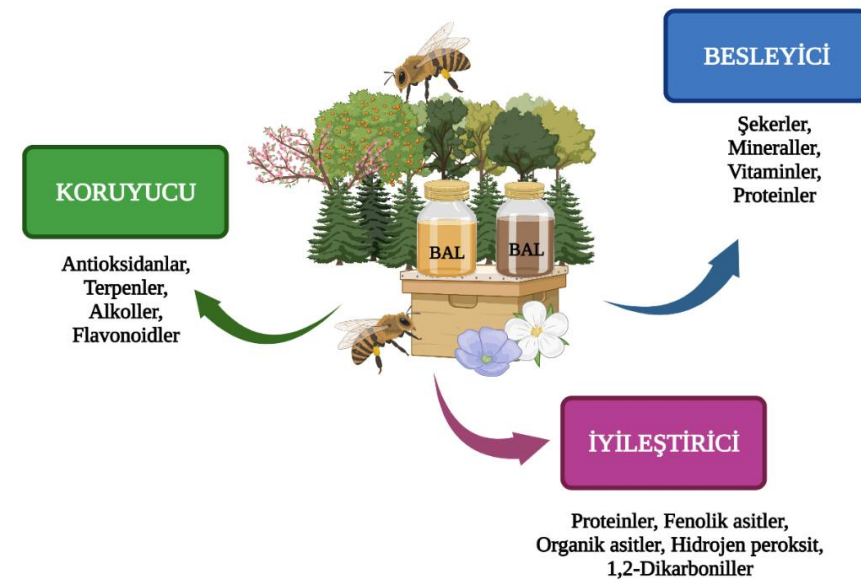
Doğal bal, 2000 yılı aşkın bir süredir tıbbi ve besinsel özellikleri ile tanınmaktadır (Crane, 1975; Afrin ve diğ., 2019). Geçmişten günümüze kadar önemli bir karbonhidrat kaynağı olarak kullanılmıştır (Bogdanov ve diğ., 2008). Birçok kültürde geleneksel tıbbın bir parçasını oluşturan balın, yaralarda kullanıldığı ilk olarak 4000 yıl önce eski Mısırlılar tarafından belgelenmiştir. Antik çağlardan beri Romalılar, Yunanlılar ve Çinliler tarafından da bu amaç için kullanılmaktadır. Bununla birlikte, antik Mısırlılar ve Yunanlıların çeşitli gastrointestinal hastalıkları tedavi etmek için bal kullandıkları da bildirilmiştir (Sato ve Miyata, 2000). Ayrıca Aristoteles, Hipokrat, Arap ve Ayurveda gibi tıp doktorlarının eski tıbbi metinlerinde balın tıbbi faydalarından bahsettikleri rapor edilmiştir (Ramsay ve diğ., 2019).

Avrupa Gıda Kodeksine göre Bal, ‘‘Bal arılarının bitkilerin nektarından veya bitkilerin canlı kısımlarının salgılarından veya bitkilerin canlı kısımları üzerinde yaşayan bitki emici böceklerin salgılarından toplayıp, kendi özel maddeleriyle birleştirerek dönüştürdükten sonra petek içinde depolayarak olgunlaştırdığı doğal, tatlı bir madde’’ olarak tanımlanmıştır (Machado ve diğ., 2020). Kaynağına göre, çiçek ve salgı balı olmak üzere sınıflandırılmaktadır (Silici, 2018). Balın çiçek içeriğine göre sınıflandırılmasında Melissopalınolojik karakterizasyon kullanılmaktadır. Melissopalınolojik analiz, polen tanelerinin sayılmasını ve balın ana polen tane yüzdesine göre sınıflandırılmasını içermektedir (Pauliuc ve diğ., 2020). Bu sınıflandırmada polenlerin, baskın polen (polen tanelerinin %45’inden fazlası), ikincil polen (%16-45) önemli minör polen (%3-15) ve minör polen (%3’ten az) olarak gruplandırıldığı bildirilmiştir (Louveau ve diğ., 1978). Belirli bir çiçek türünden nektarın çoğunu toplayan bal arılarından gelen ballar, monofloral bal olarak bilinmektedir. Bu ballar, nektardan türetilen ve karakteristik kokularından sorumlu uçucu bileşenlerin varlığını gösteren yüksek derecede ayırt edici aromalar gibi ayırt edici organoleptik özelliklere sahiptir. Bal arıları farklı çiçek türlerinden nektar topladığında multifloral bal elde edilmektedir. Monofloral bal için tüketici talebi, özel lezzet ve farmakolojik özellikleri nedeniyle son yıllarda ticari değerini artırmıştır. Piyasada bulunan en yaygın balın, coğrafi köken, botanik kaynak, renk, lezzet veya yoğunluk gibi farklı özelliklere sahip iki veya daha fazla balın homojen bir karışımından oluşan harmanlanmış bal olduğu bildirilmiştir (Machado ve diğ., 2020). Bal, çok sayıda faktöre bağlı olarak yüzde konsantrasyonları değişen, çeşitli besinlerin ve bileşenlerin çok karmaşık bir

kombinasyonudur. Bileşimdeki değişiklikler, coğrafi ve çevresel koşullardan, arının tercih ettiği çiçek kaynağından, balı üreten arı türünden ve kullanılan ekstraksiyon yönteminden kaynaklanmaktadır. Bu değişiklikler balın farklı renk, viskozite, tat ve özelliklerine yol açacaktır (Young ve Blundell, 2023). Nektar, bal arısının bal ürettiği hammaddedir ve bu nedenle balın üretildiği nektarın bileşimi, nihai ürünün bileşimini büyük ölçüde etkiler. Nektarın kendisi şeker içeriği bakımından büyük farklılıklar gösterir ve birçok bal arısı, mevcut su miktarına bağlı olarak daha yüksek şeker içeriğine sahip nektarı tercih eder. Bu nedenle balın büyük çoğunluğunu karbonhidratlar ve su oluşturur. Proteinler, amino asitler, enzimler, polifenoller ve mineraller gibi diğer maddeler çok daha düşük miktarlarda bulunur. Bal, yaklaşık 200 bileşiğin bir kombinasyonudur (Viuda-Martos ve diğ., 2008; Manzaneres ve diğ., 2014; Afrin ve diğ., 2019). Önemli bir makro ve mikro besin kaynağı olan bal aynı zamanda önemli de bir kalori kaynağıdır. 100 g'ının yaklaşık 300 kcal sağladığı ve günlük 20 g doz alındığında, önerilen günlük enerjinin yaklaşık %3'ünü karşıladığı bilinmektedir (Alvarez-Suarez ve diğ., 2013). Bununla birlikte, esas olarak glikoz (%31) ve fruktoz (%38) içeren aşırı doymuş bir karbonhidrat çözeltisidir. Glikoz ve fruktoz konsantrasyonu ve aralarındaki ilişki, monofloral ballardaki ana sınıflandırma parametrelerinden biri olarak belirtilmiştir. Kuru ağırlığının %95' ini oluşturan karbonhidratlar yaklaşık 26 mono- ve di- sakkarit içermektedir (Olas, 2020). Karbonhidratlar arasında maltoz, sükroz, turanoz, izomaltoz, sellobiyoz, izopanoz ve farklı miktarlarda diğerleri de bulunabilir. Balda bulunan disakkaritler ve trisakkaritler, farklı tip enzimlerle (invertaz ve α -glikosidaz gibi) monosakkaritlere hidrolize edilir. Bu şekerler, bal depolanması sırasında kimyasal değişikliklere maruz kalır: uzun veya yanlış bir koruma, pentozlardan (furfural) ve hekzoslardan (5-hidroksimetilfurfural (5-HMF)) kaynaklanan istenmeyen bileşiklerin oluşumuna yol açmaktadır. Genellikle bu ürünler balın kalitesini test etmek için kullanılırlar: bu da yüksek sıcaklıklara veya uzun bir saklama süresine maruz kalma olasılığını gösterir (Cianciosi ve diğ., 2018). Bal kodeksine göre, baldaki HMF'nin maksimum 40 mg/kg sınırında olması istenmektedir (Chin ve Sowndhararajan, 2020). Bal, enzimler ve serbest amino asitler formunda küçük miktarlarda protein içermektedir. Prolin (%50-80) amino asitler arasında baskındır. Esas olarak arıların tükürük salgılarından gelmektedir. Baldaki prolin, olgunlaşma derecesini değerlendirmek için bir parametre olarak kullanılır. Saf balda, kg bal başına 180 mg prolinin kabul edilen minimum değeri olduğu bildirilmiştir. Farklı ballarda prolin konsantrasyonu 254 ile 1992 mg/kg arasında

değişmektedir (Manzaneres ve diğ., 2014). Balı diğer tüm tatlandırıcı maddelerden ayıran özelliklerden biri de enzimlerin varlığıdır. Bu enzimler arı, polen ve nektardan, hatta balda bulunan mayalardan veya mikroorganizmalardan kaynaklanabilirler. Balda invertaz, diastaz ve glikoz oksidaz olmak üzere üç ana enzim bulunmaktadır. İinvertaz sükrozu basit bileşenlerini serbest bırakarak parçalar, balda kalır ve aktivitesini bir süre koruyarak, bal olgunlaştığında aktivitesini tamamlar. Diyastaz veya amilaz, nişastayı daha basit bileşiklere parçalar. Bu enzimin baldaki kökeni tartışmalıdır ve nektar, polen veya arıdan gelip gelmediği veya işlevlerinin ne olduğu, balda nişasta bulunmadığı için bilinmemektedir. Diyastaz aktivitesi bal kalitesinin önemli bir göstergesi olarak kullanılır: bu enzimin içeriği ne kadar yüksek olursa, balın kalitesi de o kadar yüksek olur. Son olarak glikoz oksidaz (GOx) enzimi glikozun, balın antimikrobiyal aktivitesinden sorumlu hidrojen peroksit (H_2O_2) ve glikonik aside dönüşümünü sağlar. Bal arısının faringel bezinde bulunduğundan enzimin olası kaynağı arıdır (Alvarez-Suarez ve diğ., 2013). Bununla birlikte 1,2-dikarbonil bileşikler ve arı defensin-1 gibi çeşitli bileşenler balın antimikrobiyal aktivitesine katkıda bulunur (Hulea ve diğ., 2022). Bal ayrıca bileşimi terpenler (timol, bisabolol, farnesol ve cineol) içeren uçucu yağlar içerir. Balın fenolik bileşenleri, bitkilerin sekonder metabolizmasının ürünleridir, bitkilerde çoğunlukla oksidatif hasar ve strese karşı korunmak için biyosentezlenir ve nektardan bala aktarılır. Balda flavonoidler ve fenolik asit iki büyük fenolik bileşik ailesi olarak tanımlanmıştır. Flavonoidler, balın ana fonksiyonel bileşenleridir. Baldaki flavonoidlerin konsantrasyonu yaklaşık 20 mg/kg'dır ve balın botanik kökenine bağlı olarak değişmektedir (Afrin ve diğ., 2019). Dünya çapında neredeyse tüm balların kafeik, ellagik, ferulik ve p-kumarik asitler dahil olmak üzere benzer tipte fenolik asitler; apigenin, krisin, galangin, hesperetin, kaempferol, pinokembrin ve kersetin gibi flavonoidler ve tokoferoller, askorbik asit, süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT) ve azaltılmış glutatyon (GSH) gibi antioksidanlar içerdiği bildirilmiştir (Rao ve diğ., 2016). Her türlü bal, düşük miktar olmasına rağmen organik asitlerin varlığı nedeniyle bir miktar asitliğe sahiptir. Bu asitler hem bal aromasına hem de antimikrobiyal aktivitesine katkıda bulunmasının yanı sıra gıda matrisinin stabilitesine de katkıda bulunur. En önemlisi glukonik asittir, ardından aspartik asit, sitrik, asetik, formik, fumarik, galakturonik, malonik, asetoglutarik, glukonik, glutamik, bütirik, glutarik, bütirik, şikimik, propiyonik, pirüvik glioksilik, 2-hidroksibütirik, α -hidroksiglutarik, izositrik, laktik, malik, metilmalonik, kinik, süksinik, tartarik, oksalik ve diğerleri gelmektedir (Cianciosi ve diğ., 2018). Baldaki vitamin içeriği düşüktür. Tiamin (B1), riboflavin (B2),

piridoksin (B6) ve niasin gibi vitaminler balda bildirilmiş olup, genel olarak miktarları azdır. Bal ayrıca kolin (0.3-25 mg/kg) ve asetilkolin (0.06-5 mg/kg) içerir. Kolin, kardiyovasküler ve beyin fonksiyonu için olduğu kadar hücresel membran kompozisyonu ve onarımı için de gereklidir, asetilkolin ise nörotransmit olarak işlev görür (Alvarez-Suarez ve diğ., 2013). Balın lipit peroksidasyonuna karşı radikal süpürme ve koruması, oksidatif stresin önemli bir rol oynadığı hastalıkları ve fizyolojik durumları azaltabilir ve önleyebilir (Cianciosi ve diğ., 2018). Balın antioksidan özelliğinin yanı sıra antimikrobiyal, anti-enflamatuar, antiviral, antifungal, antidiyabetik, yara iyileşmesi ve antikanser özelliklere sahip olduğu da bilinmektedir (Al-Waili ve diğ., 2011; Cornara ve diğ., 2017; Khan ve diğ., 2018a). Balın dermatoloji ve cilt bakımında kullanımına yönelik kapsamlı bir çalışma bulunmaktadır (Burlando ve Cornara, 2013). Balın terapötik etkinliği esas olarak, doğal olarak küçük miktarlarda bulunan flavonoidlerin veya fenolik asitlerin bilinen antioksidan aktivitelerinden kaynaklanmaktadır (Jibril ve diğ., 2019). Balın antioksidan kapasitesi (AOC), sahip olduğu biyoaktif bileşik varlığının bir göstergesi olarak düşünülmektedir. Balın AOC'si öncelikle fenolik bileşikler tarafından verilir, ancak enzimler, amino asitler ve karotenoidler de bu yeteneğe katkıda bulunur. Balın renginin, özellikle karotenoidler olmak üzere çeşitli bitki pigmentlerinin içeriğiyle ilişkili olduğu bilinmektedir. Ayrıca renk ve antioksidan kapasite arasında korelasyon olduğu, koyu renkli balların en yüksek antioksidan seviyelerine sahip olduğu bildirilmiştir (Olas, 2020). Balın terapötik etkinliği Şekil 2.4'de verilmiştir.



Şekil 2.4: Balın terapötik etkinliği (Biorender.com) (Nikhat ve Fazil, 2022).

Diyet polifenollerinin biyoyararlanımını etkileyebilecek çevresel faktörler, gıda prosesi, matris tipi, diğer bileşiklerle (proteinler veya diğer polifenoller) etkileşim, fenolik bileşiklerin kimyasal yapısı ve bağırsak faktörleri (mikrofloranın kompozisyonu) gibi çeşitli faktörler vardır. Bu bileşiklerin biyoyararlanımının arkasındaki mekanizmaları anlamaya çalışmak için hem *in vitro* hem de *in vivo* çalışmalar yapılmıştır (Cianciosi ve diğ., 2018). Sadece bir çalışma balın insanlarda biyoyararlanımını değerlendirmiştir (Battino ve diğ., 2020). Bu çalışmada 1.5 mg/kg karabuğday balı tüketen 40 sağlıklı gönüllünün plazmasında, toplam antioksidan kapasite ve toplam fenolik içerik, bal takviyesinden 2 saat sonra artmış ve 6 saat boyunca yüksek kalmıştır, bu da bu fenolik bileşiklerin biyoyararlanımının oldukça yüksek olduğunu göstermektedir (Schramm ve diğ., 2003). Tıbbi ve besinsel değerine rağmen bal, mikrobiyal ve mikrobiyal olmayan kontaminasyona eğilimlidir. Ayrıca, çevre kaynaklı pestisit, herbisit ve ağır metal izleri ve arıcılar tarafından uygulanan antibiyotikler vardır (Al-Waili ve diğ., 2012). Bu nedenle, bal üretiminin güvenliğini sağlamak için, bazı standart protokollere ve mevzuata uymak gerektiğine dikkat çekilmektedir.

2.2.1.1. Kestane (*Castanea sativa* Miller) Balı

Tatlı kestane olarak bilinen *Castanea sativa* Mill., *Fagaceae* familyasına ait bir bitkidir. *C. sativa*, *Castanea* cinsinin Avrupa ve Türkiye'de yetişen tek yerli türüdür (Ekşi ve diğ., 2020). Bu bitki, Orta ve Güney Avrupa'da ve Akdeniz havzasında (Ör. Kuzey Afrika) bol miktarda bulunmaktadır (Kolaylı ve diğ., 2016a).

Kestane ağacı, doğada çeşitli tarım ve orman ürünleri ile ilişkili olarak, olağanüstü biyoçeşitlilik ve farklı ekosistemlere uyum sağlama kapasitesi sunar. Ayrıca meyvesi, odun ve tanen üretimi, polen ve dolaylı olarak bal üretimi ile ilişkili besleyici ve ekonomik değeri nedeniyle önemli bir kaynaktır (Santos ve diğ., 2022). Kestane balının, kestane bitkisinin sadece erkek çiçeklerinden, 100 ağaç başına 27.2 kg bal üretmek için salgılanan nektardan üretildiği bildirilmiştir (Sedláčková ve diğ., 2021a).

Kestane bitkisi Türkiye'de Doğu Karadeniz, Marmara, Ege ve Akdeniz Bölgelerine kadar yayılım göstermektedir (Ekşi ve diğ., 2020; Kolaylı ve diğ., 2016a). Kestane bitkisinin çiçekleri (Şekil 2.5) bal arıları için, yaz başında en iyi nektar ve polen kaynaklarından biridir (Yang ve diğ., 2012). Türkiye'nin toplam kestane balı üretiminin yıllık 70.000 ton civarında

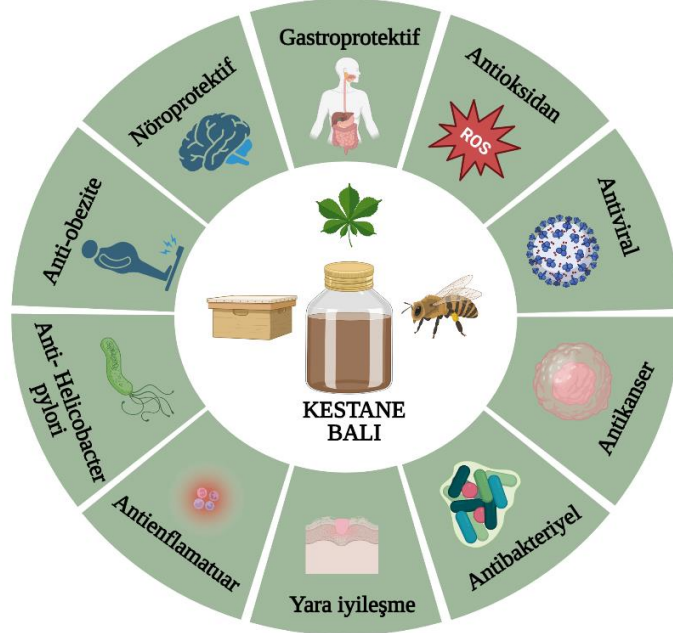
olduğu ve 2006 yılı için sadece Zonguldak bölgesinde kestane balı üretiminin yaklaşık 600 ton olduğu tahmin edilmektedir (Sarıkaya ve diğ., 2009).



Şekil 2.5: *Castanea sativa* Mill. bitkisinin çiçekleri, yaprakları, poleni (Sedláčková ve diğ., 2021b) ve meyvesi (Conedera ve diğ., 2016).

Koyu renkli balların güçlü terapötik özelliklere sahip olduğu iyi bilinmektedir. Kestane balı, koyu renkli, karakteristik, kalıcı, acı ve yoğun bir tada sahip olmasıyla diğer bal türlerinden ayrılmaktadır. Kestane balı, yavaş kristalleşme oranına sahip olduğu için uzun süre sıvı formda kalabilen bir baldır (Yang ve diğ., 2012). Kestane balı vitamin, mineral ve antioksidanlar içerdiğinden bağışıklık sistemini güçlendirmede olumlu rol oynar. Üstelik hem antibakteriyel hem de antiviral özelliklere sahiptir (Yılmaz ve diğ., 2022).

Yapılan çalışmalarda, kestane balının antioksidan (Taş-Küçükaydın ve diğ., 2023), antiviral (Yılmaz ve diğ., 2022), antikanser (Beretta ve diğ., 2021), antibakteriyel ve anti-helicobacter pylori (Cviljević ve diğ., 2020), anti-enflamatuar (Stavropoulou ve diğ., 2022), anti-obezite (Terzo ve diğ., 2022) aktivitelerine ve nöroprotektif (Terzo ve diğ., 2023), gastroprotektif (Nasuti ve diğ., 2006), yanık ve yara iyileşme (Meteoglu ve diğ., 2015; Sevin ve Yarsan, 2022) özelliklerine sahip olduğu Şekil 2.6'da gösterilmiştir.



Şekil 2.6: Kestane balının biyolojik aktiviteleri (Biorender.com).

Türkiye'de en çok kestane, ormangülü, geveni ve kekik olmak üzere çeşitli tek çiçekli ballar üretilmektedir. Türk ballarının fiziko-kimyasal özelliklerini, antioksidan kapasitelerini ve fenolik profillerini inceleyen bir çalışmada meşe, kestane ve funda gibi koyu renkli balların açık renkli ballara göre daha yüksek terapötik potansiyele sahip olduğu bildirilmiştir (Can ve diğ., 2015). Üç farklı bal türünün biyolojik aktivitelerinin ve kimyasal bileşimlerinin araştırıldığı başka bir çalışmada ise kestane balının en yüksek fenolik içeriğe, süperoksit radikali yakalama aktivitesine ve indirgeme gücüne sahip olduğu bildirilmiştir (Kucuk ve diğ., 2007). Kestane balının antioksidan kapasitesi, lavanta, ıhlamur, ayçiçeği ve çok çiçekli çiçek balı dahil olmak üzere diğer bazı bal çeşitlerinininkini geride bırakmaktadır (Keskin ve diğ., 2023). Ayrıca kestane balı, bir triptofan metaboliti olan kynureninik asit (KYNA) konsantrasyonunu diğer gıda kaynaklarına kıyasla en az iki kat daha yüksek konsantrasyonda sergiler. KYNA, antioksidan, anti-enflamatuar, antikanser, anti-obezite, antidiyabetik ve nöroprotektif etkiler dahil olmak üzere çeşitli biyolojik aktiviteler sergiler (Turska ve diğ., 2022). Kestane balının bu aktiviteleri, monofloral balı besin takviyesi olarak çekici kılmaktadır.

2.2.2. Arı Polenİ

Bal arıları ve larvaları için değerli bir besin kaynağı olan polen, çiçekli bitkilerin erkek üreme hücreleridir (Dulger vd., 2020). Arı poleni, çiçek nektarı, çiçek poleni ve enzimlerin yanı sıra bal arılarından elde edilen tükürük salgılarının bir kombinasyonudur. Arıcılar, işlenmemiş arı polenini toplamak için kovanlarının girişinde polen tuzakları kullanırlar (Şekil 2.7), bu da ticari kullanımlar için arı poleni toplamayı kolaylaştırmaktadır. Arı poleni esas olarak kovan içinde gelişimin erken aşamasındaki larvalar ve genç işçi arılar için gıda olarak kullanılmaktadır (Campos ve diğ., 2008). Polen taneleri, bitkilerin botanik ve coğrafi kökenlerine bağlı olarak farklı renk, boyut, ağırlık ve şekillere sahiptir. İki tür arı poleni vardır; polen tanelerinin en az %45'i bir bitki türünden olan ve tek tip organoleptik ve biyokimyasal özellikler gösteren “monofloral polen” diğeri ise çeşitli bitki kaynaklarından gelen polen tanelerinden oluşan “polifloral polen” dir (Alimoglu ve diğ., 2021). Arı polenin fonksiyonel özellikleri ve fizikokimyasal bileşimi, polenin bitki orijini, bitkinin besin durumu, coğrafi koşullar, toprak yapısı, toplama, depolama ve işleme gibi faktörlere bağlı olarak değişir (Aylanc ve diğ., 2023).



Şekil 2.7: Arı polenin tuzaklardan toplanması (Khalifa ve diğ., 2021)

Arı poleni yüzyıllardır farklı kültürler tarafından kullanılmaktadır ve yüksek besin içeriği nedeniyle süper gıda olarak bilinmektedir. Arı ürünleri arasında, en eksiksiz doğal gıdalardan birini temsil eder ve besin maddeleri ve biyoaktif bileşikler açısından zengin olması nedeniyle insan beslenmesi için harika bir enerji kaynağıdır (Li ve diğ., 2018; Baky ve diğ., 2023). Arı

polenin fonksiyonel özellikleri, esas olarak proteinler, karbonhidratlar, ham lifler, amino asitler, vitaminler, mineraller ve yağ asitleri gibi çeşitli bileşiklerin yanı sıra poliaminler ve flavonoidlere atfedilir (Qiao ve diğ., 2023). Besleyici ve terapötik özelliklerin, gallik, kafeik ve sinamik asit gibi fenolik bileşiklere ve ayrıca anti-oksidatif özelliklerle ilişkili flavonoidlere dayandığı bildirilmiştir (Komosinska-Vassev ve diğ., 2015; Oliveira ve Ribeiro, 2020).

Yapılan çalışmalarda arı polenin antioksidan, antimikrobiyal, antifungal, immün sistemi uyarıcı, hepatoprotektif, kemoprotektif ve yara iyileştirme gibi birçok etki gösterdiği rapor edilmiştir (Abdelnour ve diğ., 2019). Ayrıca kardiyovasküler sistemi iyileştirmek, bağırsak fonksiyonlarını düzenlemek ve cilt sağlığını geliştirmek gibi çeşitli sağlık yararları sağladığı bildirilmiştir (Baky ve diğ., 2023).

Antik çağlarda arı polenin kozmetikte özellikle cilt beyazlatmada kullanıldığı bildirilmiştir (Xi ve diğ., 2018). Kozmetikte, arı poleni cilt yaşlanmasına, cilt kuruluğuna, ultraviyole B radyasyonuna, oksidatif hasara, enflamasyona ve melanogeneze karşı koruyucu mekanizmaları etkili bir şekilde geliştirebileceği rapor edilmiştir (Kowalczyk ve diğ., 2023).

2.2.2.1. Kestane (*Casteanea sativa* Miller) Arı Poleni

Kestane arı poleni potansiyel nutrasötik ve farmasötik etkilere sahip önemli bir doğal arı ürünüdür. Kestane arı polenin içeriği ve antioksidan özellikleri esas olarak coğrafi orijine bağlıdır. Potansiyel besin kaynaklarından biri olan kestane arı poleni şeker, karbonhidratlar, amino asitler, proteinler, lipitler, vitaminler, hormonlar, enzimler ve flavonoidler içerir. Yüksek seviyelerde ω -6 ve ω -3 yağ asitleri bulunur (Conte ve diğ., 2017). Başlıca fenolik bileşikler (luteolin, rosmarinik asit, pinosembrin ve krisin) ve beş farklı karotenoid (lutein, zeaksantin, β -kriptoksantin, α -karoten ve β -karoten) kantitatif olarak belirlenmiştir (Karkar ve diğ., 2021). Yapılan sınırlı sayıda çalışmalarda kestane polenin hepatoprotektif (Yıldız ve diğ., 2013), monoamin oksidaz (MOA) inhibitörü (Yıldız ve diğ., 2014), DNA hasarını inhibe edici (Şahin ve Karkar, 2019) ve antioksidan (Sánchez-Martín ve diğ., 2022) özelliklere sahip olduğu bildirilmiştir.

2.2.3. Arı Sütü

Arı sütü, 6-12 yaştaki işçi arıların (*Apis mellifera* L.) hipofaringel (yutak üstü) ve mandibular (çene) bezleri tarafından salgılanan, rengi sarımsı-beyaz, tadı ve kokusu keskin, asidik bir maddedir (Oo, 2018).

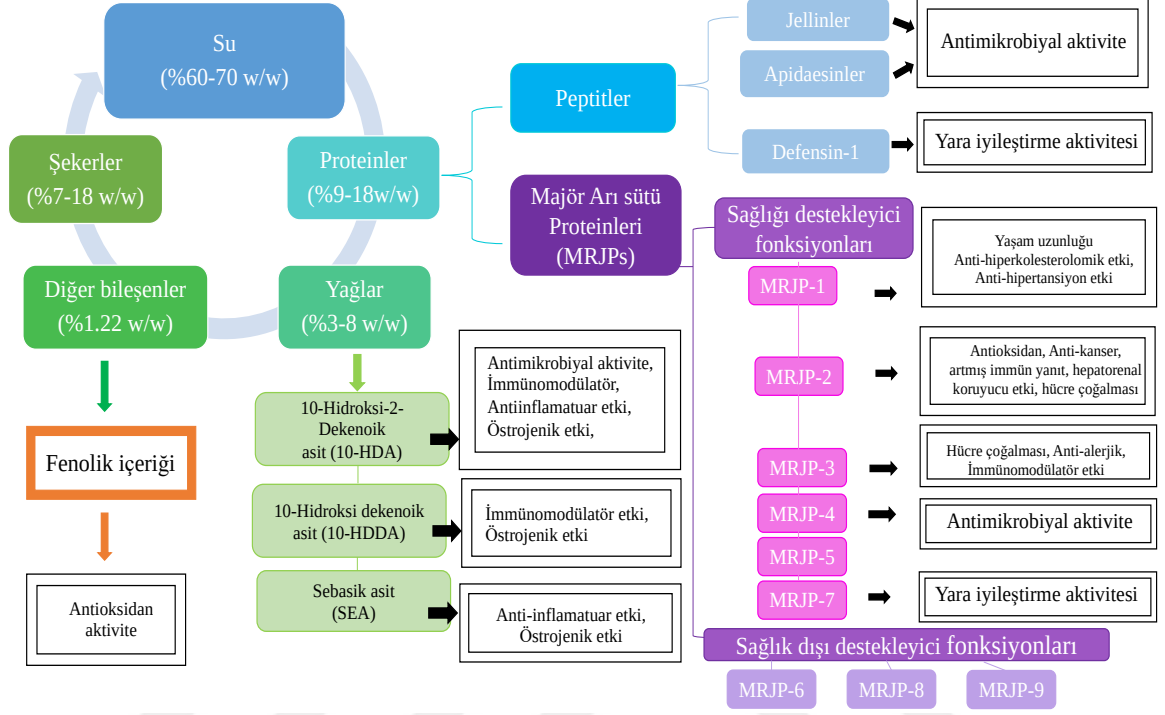
Tarlacı işçi arılar tarafından kovana getirilen nektar ve polen kuluçka alanında arı ekmeği olarak depolanır. Bakıcı işçi arılar, bal ve arı ekmeği yediğinde hipofaringeal salgı bezleri gelişir ve arı sütü salgırlar (Ahmad ve diğ., 2020). Bal arılarının kast farklılaşmasında etkili olan arı sütü, larvaların büyük, verimli ve uzun ömürlü kraliçelere dönüşmesinde rol oynar (Hu ve diğ., 2019). Kovandaki işçi arıların yaşam uzunluğu ortalama 45 gün iken, kraliçe arının beş yıla kadar yaşayabildiği bildirilmiştir (Maghsoudlou ve diğ., 2019; Fratini ve diğ., 2016). Arı sütünün ana arı gözlerinden toplanması ve elde edilmesi Şekil 2.8’de gösterilmiştir.



Şekil 2.8: Arı sütü elde edilmesi (Abälaru ve Carmen, 2014).

RJ, piyasa değeri bal, polen ve propolis dahil olmak üzere diğer arı ürünlerinden daha yüksek olduğu için dünya çapında arıcıların önemli bir gelir kaynağı haline gelmiştir. Çin, yılda 4000 ton RJ hasadı yapan en büyük RJ üreticilerinden ve ihracatçılarından biridir. Küresel talebin neredeyse tamamını (RJ üretiminin >%90'ına) karşılamaktadır. En çok ABD, Avrupa ve Japonya'ya ihraç edildiği bilinmektedir (Cao ve diğ., 2016). Arı sütü miktarı ve kalitesi, bal arısı ırkları, koloni tipi (ana arısız veya ana arılı oluşu), larvaların transfer yaşı, transfer edilen ana arı hücrelerinin sayısı, aşılama teknikleri, aşılama çubuğu seviyesi ve kraliçe arı hücrelerinin konumu, hasat aralığı, kolonilerin besleme kaynağı ve mevsimler gibi çeşitli faktörlere bağlıdır (Khan ve diğ., 2021). Arı sütü, dünyanın farklı bölgelerinde uzun zamandır geleneksel tıpta, sağlıklı gıdalarda ve kozmetik ürünlerde kullanılan değerli bir doğal üründür (Khazai ve diğ., 2018; Ahmad ve diğ., 2020). Kozmetikte cilt beyazlatma ve yaşlanma karşıtı etkileri nedeniyle popüler hale gelen arı sütü klinik olarak, yara iyileşmesi ve atopik dermatit

gibi bazı enflamatuar cilt hastalıklarının tedavisinde avantajlar sağlamaktadır (Oo, 2018). Arı sütünün bileşenleri ve biyolojik aktiviteleri Şekil 2.9’da verilmiştir.



Şekil 2.9: Arı sütünün temel bileşenleri ve biyolojik aktivitelerinin şematik gösterimi (Ahmad ve diğ., 2020).

Biyolojik aktiviteleri temel olarak 10-HDA, MRJP’ler ve fenolik bileşiklere bağlıdır. Arı sütünün antioksidan, antitümör, antibakteriyel, anti-enflamatuar ve yara iyileştirici aktiviteleri olduğu bildirilmiştir (Imai ve diğ., 2012; Park ve diğ., 2012; Wang, 2017; Şahin ve Şanlıer, 2018). Arı sütünün özellikle ana bileşeni olan 10-hidroksi 2-dekenoik asit (10-HDA)’ın, kollajen üretimini artırarak cildin erken yaşlanmasını önlediğinden bahsedilmektedir (Oo, 2018). Hayvan modellerinde yürütülmüş başka bir çalışmada arı sütünün kolajen üretimini artırarak östrojen eksikliği ile indüklenen cilt yaşlanmasını geciktirdiği/önlediği bildirilmiştir (Park ve diğ., 2012).

Arı sütü ve içeriğinin *Caenorhabditis elegans* nematodunun yaşam uzunluğu üzerine etkisinin araştırıldığı bir çalışmada, 10, 25 ve 100 mg/mL konsantrasyonlarında uygulanan arı sütünün ortalama yaşam uzunluğunu sırasıyla %8-9, %18-19 ve %17-19 olarak artırdığı bulunmuştur (Honda ve diğ., 2011). Başka bir çalışmada arı sütünde bulunan 10-HDA’nın, yaşlanmayı ve yaşa bağlı hastalıkların başlamasını geciktirmek için memeli TOR (mTOR) inhibisyonunu

hedefleyen nutrasötik bir ajan olarak kullanılmasının mümkün olabileceği bildirilmiştir (Honda ve diğ., 2015).

2.2.4. Apilarnil

Biyolojik olarak aktif bir arı ürünü olan apilarnil (erkek arı larvası) özellikle Romanya, Çin gibi ülkelerde yaygın olarak kullanılmaktadır. Apilarnil, Romanya'da ilk kez 1980 yılında, tıbbi ilaçların kimyasal sentezi en yüksek gelişmedeyken Nicolae V. Iliesiu tarafından üretilmiştir. Apilarnil'in adı, Romen bilim adamı tarafından ‘’ latince arı (Apis) API, larvalardan LAR ve kendi baş harfleri NIL (Nicolae Iliesiu)’’ kısaltmaları kullanılarak onaylanmıştır (Bărnăușu ve diğ., 2013). Apilarnil, erkek arıların hücrelerinin kapanmasından önce (pupa evresi) (Şekil 2.10), larva döneminin 7. günü hasat edilerek, titrasyon, homojenizasyon, filtrasyon ve liyofilizasyon aşamalarının sonunda elde edilmektedir (Açıkgöz ve Yücel, 2016).



Şekil 2.10: Erkek arı larvalarının görünümü (Anonim, 2023).

Apilarnil viskoz yapıda olup, sarımsı bir renge ve karakteristik bir kokuya sahiptir ve içeriği yaklaşık olarak %25-35 kuru madde, %9-12 protein, %6-10 karbonhidrat, %5-8 lipid ve %2 külden oluşmaktadır (Bărnăușu ve diğ., 2013). Liyofilize apilarnil örneği Şekil 2.11'de gösterilmiştir.



Şekil 2.11: Liyofilize edilmiş Apilarnil (Erdem ve İnci, 2022).

Erkek arı larvalarının ana bileşenleri amino asitlerdir. Apilarnil, alanin, serin, lizin, metiyonin, histidin, arginin, glutamik asit, valin, izolösin, lösin, fenilalanin ve tirozin gibi önemli amino asitleri içerdiğinden “tam gıda” olarak bildirilmiştir (Erdem ve İnci, 2022). Apilarnil, erkek tipi hormonlar bakımından zengin içeriği sayesinde güçlendirici etkiye sahiptir (Iliescu, 1993). Erkek arı larva homojenatının yüksek düzeyde hormon (testosteron: 0.31 nmol/100 g, progesteron: 51.32 nmol/100 g, prolaktin: 410 nmol/100 g ve östradiol: 677.6 nmol/100 g) içerdiği (Bogdanov, 2011) ve erkeklerde doğal bir anabolizma uyarıcı olduğu bildirilmiştir (Stangaciu, 1999).

Erkek sıçanlarda apilarnilin androjen benzeri etkisini belirlemek ve etkili bileşiklerini tanımlamak amacıyla yapılan bir çalışmada, iki yağ asidi esteri, metil palmitat (MP) ve metil oleat (MO) apilarnilin aktif bileşikler olarak tanımlanmıştır. Tek başına MP'nin androjenik etki gösterdiği; MO'nun ise, androjene duyarlı dokuların ağırlığını artırdığı bulunmuştur. Apilarnilin erkek infertilitesinin tedavisinde androjenik aktiviteyi destekleyen doğal bir ajan olarak kullanılabileceği bildirilmiştir (Yucel ve diğ., 2011; Seres ve diğ., 2014). Erkek arı larvasının sıçanlarda östrojen hormonu benzeri etkisini araştırmak ve etkili aktif bileşikler tanımlamak amacıyla yapılan bir çalışmada, bu etkiye sahip bulunan aktif bileşenin E-dec-2-enedioik asit olduğu bildirilmiştir (Seres ve diğ., 2013).

Apilarnilin çiftlik hayvanları, kanatlı hayvanlar, domuz ve balıklarda üreme etkinliğini artırdığı köpeklerde ise endokrin ve metabolik durumları düzelttiği rapor edilmiştir (Bolatovna ve diğ., 2015; Karagözoğlu ve Şahin, 2022).

Son yıllarda apilarnilin antiviral, immünomodülatör, karaciğer koruyucu, nöroprotektif ve anabolik uyarıcı gibi birçok biyolojik aktiviteye sahip olduğu gösterilmiştir (Koşum ve diğ., 2022). Güncel çalışmalarda, apilarnilin erkek sıçanlarda LPS toksisitesine karşı koruyucu rolü olduğu (Doğanyigit ve diğ., 2019), antioksidan ve nöroprotektif bir ajan olduğu (Hamameci ve diğ., 2020), LPS kaynaklı sepsiste nefroprotektif etkisi olduğu (Inandiklioglu ve diğ., 2021), LPS ile indüklenen endotoksemik kalbi koruduğu (Okan ve diğ., 2022) bildirilmiştir.

Günümüzde zengin içeriği ve bağışıklığı güçlendirici etkisi nedeniyle Çin'de geleneksel ilaç olarak kullanılmasına rağmen, dünyanın birçok ülkesinde hala kullanımı çok düşüktür. Doğu Avrupa ve Asya halk tıbbında binlerce yıldır testosteron hormon düzeylerini artırmak için kullanılmaktadır (Koşum ve diğ., 2022). Apilarnilin gıda, yem, kozmetik ve ilaç gibi

sektörlerde önemli ekonomik önemine ve geniş pazar beklentilerine rağmen, bu ürünün geliştirilmesine ilişkin çalışmaların sayısı çok sınırlı kalmıştır (Sonmez ve diğ., 2023).

2.3. NUTRASÖTİK VE KOZMESÖTİK BİTKİSEL ÜRÜNLER

Bitkisel nutrasötikler, bitkilerden ve/veya bunların türevlerinden, örneğin yağlar, kökler, tohumlar, yemişler veya çiçekler gibi elde edilen gıdalardır. Güncel bir araştırma, bitkisel biyoaktif bileşiklerin kaynağı olarak çeşitli bitkisel nutrasötiklere dikkat çekmektedir (Bommakanti ve diğ., 2023). Kapsamlı bir araştırma kozmesötik içeriklerin üretiminde kullanılan bitkilerin çoğunun *Asteraceae*, *Lamiaceae*, *Fabaceae*, *Poaceae*, *Malvaceae* ve *Rosaceae* familyalarına ait olduğunu bildirmiştir (Dorni ve diğ., 2017). Bitkilerin biyoaktif bileşikleri olan fitokimyasallar geniş biyolojik aktiviteleri nedeniyle nutrasötik ve kozmesötik potansiyele sahiptir (Kawatra ve diğ., 2023).

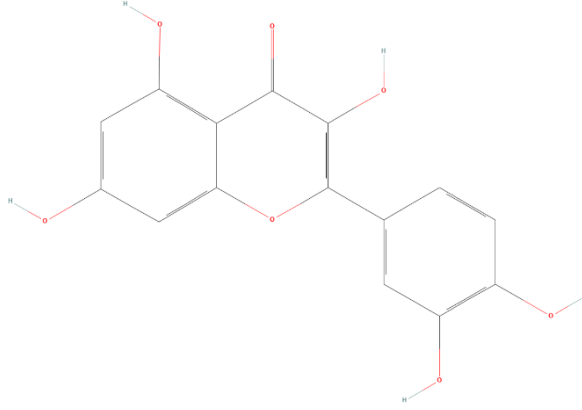
2.3.1. Fitokimyasallar

Bitkiler, bitki büyümesinde ve fizyolojisinde primer bir rol oynamayan, ancak bitkinin yaşamını sürdürmesi, çoğalması ve çok önemli hayati fonksiyonları bulunan çeşitli sekonder metabolitlere sahiptirler (Holopainen ve diğ., 2018). Birincil bileşenler klorofiller, proteinler, amino asitler ve yaygın şekerleri içerirken, terpenoidler, alkaloidler ve fenolik bileşikler ikincil bileşenlerdir. Kimyasal yapı ve özelliklerine göre fitokimyasal bileşikler tanenler, saponinler, kumarinler, fenolik bileşikler, tokoferoller, terpenler, karotenler, izotiyosiyanatlar, sülfidler, sülforafanlar, terpenoidler ve alkaloidlerdir (Topaloğlu, 2015). Fitokimyasallar çeşitli renklerde; bu nedenle, fitokimyasallarla zenginleştirilmiş gıdaları tüketmek sağlıklı olmanın anahtarıdır. Yediğimiz meyve ve sebzelerin mavi ve mor rengi, esas olarak iyi bir antioksidan olan antosiyaninlerden kaynaklanmaktadır. Klorofilin varlığı yeşil rengi verir. İzotiyosiyanatlar ve indoller genellikle yeşil renktedir ve antikanser özellikleri açısından zengindir. Yeşil sebzeler mükemmel K vitamini, folik asit, potasyum vb. kaynaklarıdır (Roy ve diğ., 2019). Fitokimyasallar antioksidan aktivite, antimikrobiyal etkiler, hormon metabolizması modülasyonu, bağışıklık sistemi stimülasyonu ve yaşlanma karşıtı etkisi gibi koruyucu veya hastalık önleyici özelliklere sahip kimyasallardır. Sağlık etkileri emilim, dağılım, metabolizma ve atılıma bağlıdır. Absorpsiyon doza, sindirildikleri matrise ve fitokimyasalları bağlayabilen veya çözebilen bileşiklerin varlığına bağlıdır, bu da onların

biyoaktivitesini veya ürün stabilitesini etkilemektedir (Dini, 2022). Fitokimyasallar genellikle biyolojik olarak aktiftirler, birçoğunun çeşitli insan hastalıklarına karşı koruyucu/tedavi edici özelliklere sahip olduğu iyi bilinmektedir (Xiao ve diğ., 2019). Antioksidan özelliğe sahip olanlar, oksidatif stres kaynaklı DNA ve protein hasarlarını baskılamada anahtar rol oynarlar. Bununla birlikte oksidatif stres aracılı birçok sinyalleme yollarını modüle ederek hücreleri korurlar. Bazı epidemiyolojik çalışmalarda, fitokimyasal yönden zengin diyet alımı ile meme, kolon, akciğer, pankreas ve prostat kanserleri insidansı arasında ters bir orantı olduğu bildirilmiştir (Chikara ve diğ., 2018). Bilişsel bozukluğun önlenmesi ve/veya azaltılması için potansiyel bir fonksiyonel gıda katkısı olduğu bildirilmiştir (Bakoyiannis ve diğ., 2019). Fitokimyasalların nutrizyonetik formülasyonlarda antioksidan, antimikrobiyal, yaşlanma karşıtı ve iltihap önleyici maddeler olarak kullanılabileceği gösterilmiştir (Dini ve Mancusi, 2023). Ayrıca epidermise ve dermise nüfuz ederler ve cildi ultraviyole (UV) oksidasyonunun ve erken cilt yaşlanmasının zararlı etkisinden korurlar (Alharbi ve diğ., 2021).

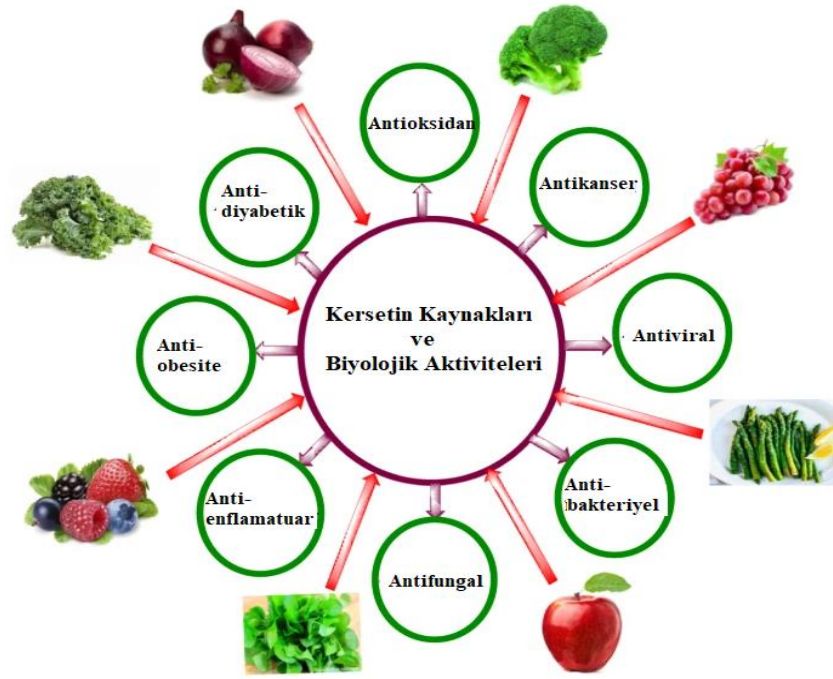
2.3.1.1. Kersetin

Kersetin (3,3',4',5,7-pentahidroksi-2-fenilkromen-4-on), flavonoid ailesine ait bir bileşiktir. Sebzeler arasında en yüksek kersetin seviyeleri soğanda (*Allium cepa* L.), kuşkonmazda (*Asparagus officinalis* L.) ve kırmızı yapraklı marulda (*Lactuca sativa* L.) yer alırken, brokoli, yeşil biber, bezelye ve domateste daha düşük seviyelerde bulunmaktadır. Elma, kiraz, dut, böğürtlen, üzüm gibi meyveler en yüksek kersetin içeriğine sahip meyveler olarak bildirilmektedir (Nishimuro ve diğ., 2015). Kersetin molekülü bir ketokarbonil grubuna sahiptir. İlk karbondaki oksijen atomu baziktir ve güçlü asitlerle tuzlar üretebilir. Moleküler yapısı, A halkası, o-dihidroksi grubu B, C halkası C2, C3 çift bağı ve 4-karbonil arasındaki bir dihidroksi grubu olmak üzere dört aktif grup içerir (Şekil 2.12). (Yang ve diğ., 2020).



Şekil 2.12: Kersetinin moleküler yapısı (PubChem CID: 5280343).

Kersetin, güçlü antioksidan aktivitesi nedeniyle yaygın olarak kullanılan biyoaktif bir bileşiktir (Xu ve diğ., 2019). Çalışmalar, kersetinin antioksidan, antimikrobiyal, anti-enflamatuar, antidiyabetik, antikanser, antiobezite gibi Şekil 2.13’de gösterilen birçok aktiviteye sahip olduğunu göstermiştir (Tang ve diğ., 2020; Sato ve Mukai, 2020). Kersetin, birçok bitkide büyük miktarlarda bulunduğu için kozmetik formülasyonlarda da yaygın olarak kullanılmaktadır. Fare B16 melanomu gibi çeşitli hücre hatlarında güçlü bir tirozinaz inhibitörü, bir melanogenez inhibitörü ve bir antioksidan ajanı olduğu bildirilmiştir (Choi ve diğ., 2021). Başka bir çalışmada kersetin içeren ürünün cilde uygulandıktan sonra yüzdeki gözenek sayısını azalttığı, pigmentasyonu ve kırıxıklığı düzelittiği gösterilmiştir (Lee ve diğ., 2013). Kersetin antioksidan, anti-enflamatuar, kollajen birikimi, anjiyogenez ve fibroblast proliferasyonu özellikleri nedeniyle yara iyileşmesi için umut verici bir potansiyele sahiptir. C57BL/6 fare modelleri üzerinde *in vivo* ve insan derisi hücre kültürleri (HaCaT hücreleri) üzerinde *in vitro* deneyler gerçekleştirilmiştir. Dermal olarak uygulanan kersetinin UVB ile indüklenen NF-kB/COX-2 sinyal yolunu inhibe ederek cilt iltihabını ve ödemi inhibe ettiği bildirilmiştir. Ayrıca, kersetin yüklü nanoparçacıkların, HaCaT hücrelerini UVB ışığına maruz kaldıktan sonra ölmekten koruduğu gösterilmiştir (Lawson, 2023).



Şekil 2.13: Kersetin kaynakları ve biyolojik aktiviteleri (Azeem ve diğ., 2022).

Geniş biyolojik aktiviteleri nedeniyle kersetin, toz ve kapsül formunda bir besin takviyesi olarak kullanılmaktadır. Çin, Japonya, İspanya ve ABD gibi birçok ülkede ortalama kersetin tüketimi sırasıyla 18, 16.2, 18.48 ve 9.75 mg/gün olarak bildirilmiştir (Azeem ve diğ., 2022). Kersetin kısa bir yarı ömre ve kanda hızlı bir klirensa sahiptir ve metabolitleri alımdan 30 dakika sonra plazmada ortaya çıkmaktadır. Önemli bir kısmı 24 saatte atılmaktadır (Batiha ve diğ., 2020). Kersetinin, ilaçların yan etkilerini ve toksisitesini azaltmak ve etkilerini potansiyel olarak artırmak veya onlarla sinerjistik olarak etkileşime girmek için ilaçlarla kombinasyon halinde kullanılabileceği bildirilmiştir (Di Petrillo ve diğ., 2022).

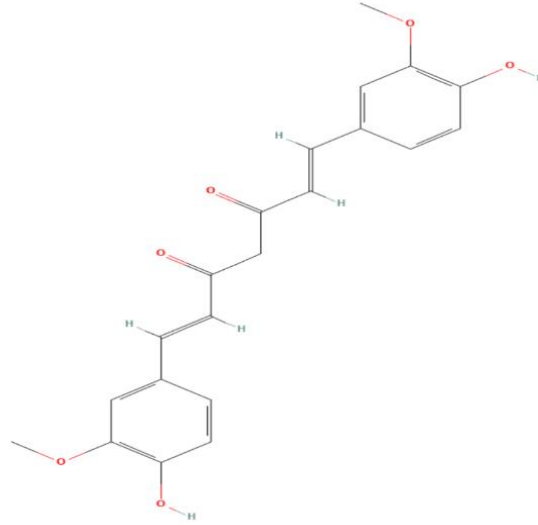
2.3.1.2. Kurkumin

Zerdeçal ilk olarak 1815 yılında Vogel ve Pelletier tarafından *Curcuma longa*'nın rizomlarından (Şekil 2.14) izole edilmiştir (Prasad ve diğ., 2014). Zerdeçal (*C. longa*), Hindistan kökenli ve şu anda Güneydoğu Asya, Çin ve Latin Amerika da dahil olmak üzere dünyanın diğer birçok yerinde yetiştirilen zencefil ailesi (*Zingiberaceae*) bitkilerinden biridir (Amalraj ve diğ., 2017).



Şekil 2.14: *Curcuma longa* bitkisi ve kurkumin (Alagawany ve diğ., 2021).

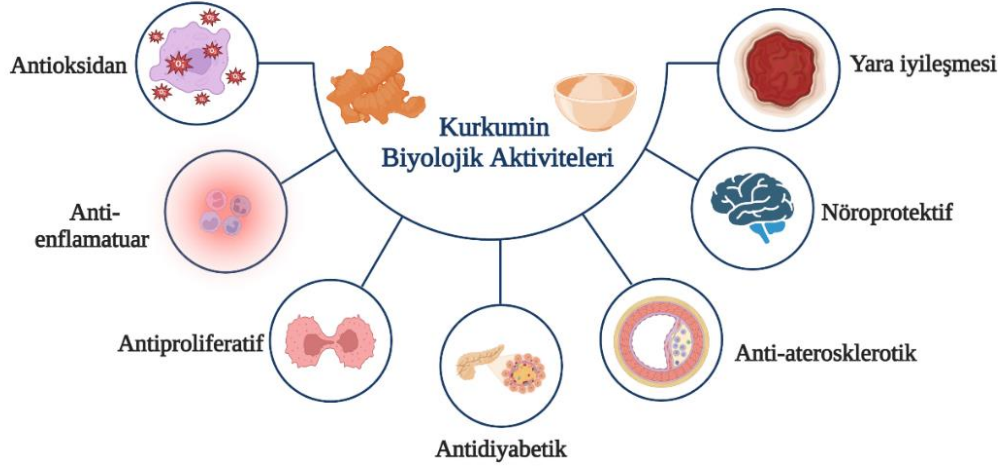
Zerdeçal, tadı ve rengi nedeniyle Hindistan ve diğer Asya ülkelerinde körilerin hazırlanmasında yaygın olarak kullanılan bir baharattır. Hindistan en büyük üretici ve önde gelen zerdeçal ihracatçısıdır. Raporlara göre, küresel zerdeçal pazarının ~ 1,7 milyon metrik ton olduğu tahmin ediliyor ve 2027 yılına kadar önemli ölçüde artması bekleniyor (Kotha ve Luthria, 2019). Kurkuminoidler (CCMs) olarak bilinen; kurkumin (%75), demetoksikurkumin (%10-20) ve bisdemetoksikurkumin (%5), zerdeçalda tanımlanan biyoaktif polifenolik bileşiklerdir (Gopi ve diğ., 2017). Kurkuminin moleküler yapısı Şekil 2.15’de gösterilmiştir.



Şekil 2.15: Kurkuminin moleküler yapısı (PubChem CID: 969516) (Khudhayer Oglah ve Fakri Mustafa, 2020).

Kurkumin, dünya çapında baharat, çay, renklendirici, koruyucu, sos, içecek, antiseptik, kozmetik ve anti-enflamatuar ajan olarak birçok farklı biçimde tanınmakta ve kullanılmaktadır (Hewlings ve Kalman, 2017). Çalışmalarda, kurkuminin antioksidan, anti-enflamatuar, antiproliferatif, antimetastatik, anti-anjiyojenik, antidiyabetik, hepatoprotektif, anti-aterosklerotik, antitrombotik, yara iyileşmesi, antikanser, anti-artritik, nöroprotektif,

analjezik, immünomodülatör ve pulmonoprotektif aktiviteleri   ekil 2.16'da gösterilmiştir (Zieli  ska ve diğ., 2020).

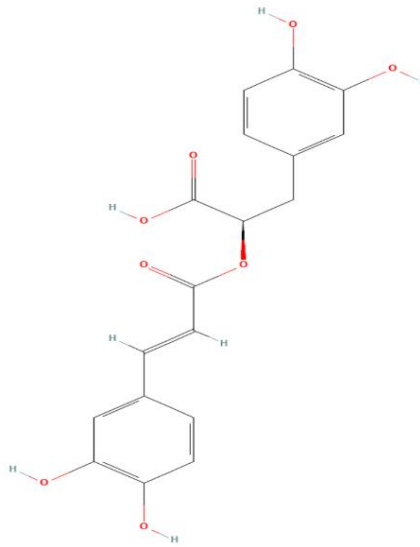


Şekil 2.16: Kurkuminin biyolojik aktiviteleri (Biorender.com).

Güçlü antioksidan, anti-enflamatuar, antidiyabetik, antihipertansif, antikanser ve nöroprotektif özellikler gibi biyolojik ve farmakolojik aktiviteleri nedeniyle gıda, nutrasötik, kozmetik ve farmasötik alanlardaki uygulamaları artıran bir ilgi konusudur (Leiva-Vega ve di  ., 2020). Dünya Sağlık   rg  t   (WHO), bir gıda katkı maddesi olarak kabul edilebilir günlük kurkuminoid alımını 0-3 mg/kg aralığında belirtmiştir. Kurkuminoidler ve zerdeçal   r  nleri ABD'de Gıda ve İlaç İdaresi (FDA) tarafından güvenli olarak nitelendirilmiştir. Hint diyetinde ortalama zerdeçal alımı, 60 kg'lık bir birey için yaklaşık 2-2.5 g'dır ve bu, günlük yaklaşık 60-100 mg kurkumin alımına karşılık gelmektedir (Amalraj ve di  ., 2017; Mahmood ve di  ., 2015). Başka bir çalışma yüksek tek oral doz kurkuminoidlerin (günde 12 g'a kadar)   ok iyi tolere edildiğini desteklemiştir (Lao ve di  ., 2006). Zerdeçal bazlı bir nutrikozmetik formülasyonun (krem + gıda takviyesi), tek başına Zerdeçal bazlı bir kozmetik kremden, daha iyi nemlendirme, yaşlanma karşıtı ve kırışıklık önleyici etki gösterdiği bildirilmiştir (Di Lorenzo ve di  ., 2022).

2.3.1.3. Rosmarinik Asit

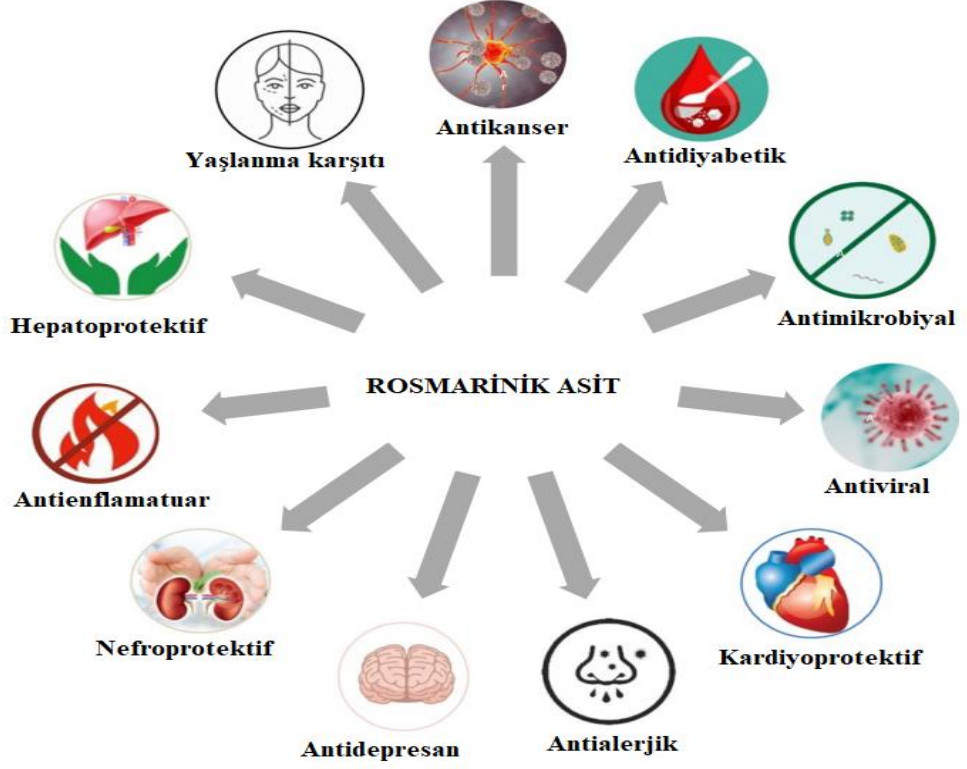
Rosmarinik asit (RA) *Rosmarinus officinalis* L., *Melissa officinalis*, *Salvia officinalis*, *Ocimum basilicum* L. gibi *Lamiaceae* (Labiatae) bitki türlerinde yaygın olarak bulunan doğal polifenolik bir bileşiktir. Rosmarinik asit, ilk kez 1958 yılında biberiye bitkisinden (*Rosmarinus officinalis* L.) izole edilmiştir (Nadeem ve diğ., 2019) ve kafeik asit (3,4-dihidroksisünamik asit) ile 3,4-dihidroksifenillaktik asit (DHPL) esteridir (Petersen, 2013). Rosmarinik asitin moleküler yapısı Şekil 2.17’de gösterilmiştir.



Şekil 2.17: Rosmarinik asitin moleküler yapısı (PubChem CID: 5281792) (Hitl ve diğ., 2021).

Rosmarinik asitin gıda, kozmetik ve koku endüstrilerinde uzun zamandan beri kullanıldığı bilinmektedir (Lv ve ark., 2018). Bugüne kadar çeşitli çalışmalarda rosmarinik asitin antioksidan, antikanser, antiviral, anti-enflamatuar, antimikrobiyal, antidiyabetik, antialerjik, antidepresan aktiviteleri ile hepatoprotektif, nefroprotektif, kardiyoprotektif ve yaşlanma karşıtı etkileri olduğu rapor edilmiş ve aktiviteleri Şekil 2.18’de gösterilmiştir (Gok ve diğ., 2015; Bahri ve diğ., 2017; Dahchour, 2022; Noor ve diğ., 2022). Çalışmalarda, rosmarinik asitin lipid peroksidasyonunda etkili bir antagonist olduğu, doymamış lipidler için daha büyük bir afinite ile lipid zarlarına kendiliğinden girebildiği ve bunun yanı sıra atopik dermatit tedavisinde ve fotokorumada kullanıldığı gösterilmiştir (Pérez-Fons ve diğ., 2010; Fadel ve diğ., 2011). Topikal uygulaması göz önüne alındığında cilt dokusuna nüfuz edebilen bir bileşik olan RA’nın UVB radyasyonuna maruz kalan keratinositlerin sağkalımını artırdığı,

hücre içi reaktif oksijen türlerinin (ROS) oluşumunu inhibe ederek DNA hasarında eş zamanlı bir azalma olduğu bildirilmiştir (Pérez-Sánchez ve diğ., 2016).



Şekil 2.18: Rosmarinik asitin biyolojik aktiviteleri (Noor ve diğ., 2022).

Metabolizma çalışmalarına göre rosmarinik asit hızla emilir, metillenir ve idrarla atılır (Amoah ve diğ., 2016). Rosmarinik asidin toksisitesi üzerine yapılan araştırmalar, farelerde yaklaşık 561 mg/kg LD₅₀ ile çok düşük toksisiteye sahip olduğunu göstermiştir. İnsan çalışmalarında günde 500 mg'a kadar olan dozlarda tam kan sayımlarında, karaciğer ve böbrek fonksiyon testlerinde herhangi bir anormallik gözlenmediği bildirilmiştir (Kuruuzum-Uz ve Gundogdu, 2022).

2.4. APİ-FİTOTERAPİ

20. yüzyılın son on yıllarıyla birlikte çok sayıda bilim insanı şifalı bitkilerin ve arı kovani ürünlerinin etkilerini vurgulamış, aynı zamanda araştırmalarına dayanarak bu terapilerin (Fitoterapi, Apiterapi, Api-fitoterapi, Biyoterapi) kullanılması lehine bilimsel kanıtlar sunmuştur. Fitoterapi ve Apiterapi, olumsuz veya zararlı yan etkileri olmayan ve alışkanlık içermeyen doğal tedavilerdir (Petruta, 2010). Api-fitoterapi, şifalı bitkileri ve özellikle bal olmak üzere balmumu, propolis, polen, arı sütü ve arı zehri gibi diğer arı ürünlerini birleştiren bir geleneksel tıp şeklidir (Fouedjou ve diğ., 2022). Api-fitoterapi detoksifikasyon, etkilenen fonksiyonların onarımı, homeostazın yeniden sağlanması ve organizmanın çevre ile ilişkisinin yeniden düzenlenmesiyle sağlıklı durumunu güvence altına almaktadır (Căuia ve diğ., 2007).

Dünyada ve ülkemizde bal arısı ürünlerinin bitki ekstraktları ve/veya fitokimyasallarla birlikte (Şekil 2.19) kullanımına yönelik yapılan çalışmalar oldukça sınırlıdır. Mevcut çalışmalar, önerilen kombinasyonlarda yer alan bileşenlerin sinerjik etki gösterdiğine dikkat çekmektedir (Moussa ve diğ., 2012; Francis ve Williams, 2014; Wee ve diğ., 2015).



Şekil 2.19: Api-fioterapötik etkiler (Biorender.com).

Kronik marginal parodontopatilerin tedavisinde Api-fitoterapötik preperatlardan propolis ve karaotu (*Symphytum off.*) özlerinin antimikrobiyal etkilerinin yanı sıra antimikotik, anti-enflamatuar ve antiskar etkilere sahip olduğu bildirilmiştir (Gafar ve diğ., 1989).

Propolis yumuşak özü, toz polen, C, E, A ve D3 vitamini, organik selenyum, çinko, monokalsiyum fosfat, kalsiyum glukonat ve yardımcı maddeler içeren Api-fitoterapötik bir ürünün (APITER) kedi ve köpeklerde görülen kemik hastalıklarında (raşitizm) etkilerini inceleyen klinik bir çalışmada, APITER ile test edilen yöntemlerin klasik beslenme yöntemleri kadar etkili olduğunu göstermiştir (Agripina ve diğ., 2007).

Yeni doğan buzağılarda ishale neden olan *Escherichia coli*'ye karşı propolis ve bitkisel materyale dayalı Api-fitoterapinin etkinliğini belirlemek amacıyla yapılan çalışmada, ürünün buzağılardaki ishali kontrol edebildiğini ve 6 uygulamadan sonra %100 etkili olduğunu ortaya koymuştur (Rădoi ve diğ., 2007).

Propolis alkol özütü ve aloe vera jeli bazlı dermatolojik ve cerrahi veteriner ürünü proaktivatör elde edilmiş ve çalışmada kullanılmıştır. Ürün, hayvanlara dermatolojik (yaralar, kimyasal ve fiziksel yanıklar), parazitolojik (ektoparazitler ve uyuz) ve veteriner cerrahisi (dikişli yaralara uygulanan koruyucu bir tabaka) olarak uygulanmıştır. Proaktivatör'ün dermatolojik bozukluklar, antiparazitik özellikler ve postoperatif yara iyileşmesi üzerindeki etkisinin klasik tedaviler ve ilaçlarla benzer olduğu ortaya konmuştur (Siceanu ve diğ., 2008).

Köpeklerde arı ürünleri (arı poleni ve propolis), bir bitki özü (yaygın kırlangıçotu tentürü (*Chelidonium majus*), mikro elementler ve vitaminlerden oluşan Api-fitoterapötik bir ürün Hepro-vit'in karaciğer hastalıklarında terapötik etkilerinin araştırıldığı çalışmada, Hepro-vit ile beslenme tedavisinin en az standart tedavi yöntemleri kadar etkili olduğu bildirilmiştir (Savu ve diğ., 2011).

Zencefil nişastası ile kombine balların *Candida albicans*'a karşı gösterdiği antifungal aktivitenin araştırıldığı bir çalışmada; narenciye, hünnap, portakal ve çiçek balları tek başlarına ve %1-8 (v/v) zencefil nişastası katkısıyla kombine edilerek test edilmiştir. Katkısız balların test edilen suşa karşı minimum inhibitör konsantrasyonları (MIC değerleri) %38-42 (v/v) olarak bulunmuştur. Zencefil nişastası ile kombine bal örnekleri test suşuna uygulandığında ise %4'ün üzerinde MIC değerlerine ulaşılabilceği bildirilmiştir (Moussa ve diğ., 2012).

Zerdeçal nişastası ile kombine doğal balların da antibiyotik potansiyeli taşıdıkları vurgulanmıştır (Moussa ve diğ., 2013a, Moussa ve diğ., 2013b). Zerdeçal nişastası içermeyen bal çeşitlerinin patojen bir mantar olan *Rhodotorula mucilaginosa*'ya karşı MIC değerleri

%28-36 (v/v) arasında değişirken, zerdeçal nişastası içeren balların MIC değerleri daha düşük bulunmuştur. Zerdeçal nişastası içeren ballar, bakteriyel infeksiyon etkenleri *E. coli* ve *P. aeruginosa* zerinde de doğal ballara nazaran daha yüksek bir antibakteriyel aktivite sergilemiştir.

Gelam balı, zencefil ve bunların kombinasyonunun antioksidan ve antidiyabetik etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada, bal ve zencefil kombinasyonu hipoglisemik etki göstermemiştir. Buna karşın bal+zencefil karışımı, STZ ile indüklenmiş diyabetik sıçanlarda kontrol sıçanlarına kıyasla GSH düzeyini ve GSH/GSSG oranını önemli ölçüde ($P<0.05$) artırırken, MDA düzeyi SOD ve CAT aktivitelerini önemli ölçüde ($P < 0.05$) azaltmıştır (Sani ve diğ., 2014).

Etiyopya balı ve zencefil özü karışımlarının (%50 v/v) zencefil özü (%50 v/v) veya tek başına baldan (%50 v/v) daha üstün antimikrobiyal aktiviteye sahip olduğunu bildirmiştir (Ewnetu ve diğ., 2014).

Gelam balı, zencefil ekstresiyle kombine şekilde uygulandığında, bu etkiyi HT29 kolon kanseri hücrelerinin büyümesini durdurmada veya geciktirmede apoptozun indüklenmesi ve PI3K/ Akt/mTOR ile Wnt β -katenin yolaklarında yer alan genlerin modülasyonu yoluyla göstermektedir. Bu nedenle hem Gelam balında hem de zencefil ekstresinde bulunan aktif bileşikler bu kombinasyonunun gelecekte kolon kanseri için alternatif veya tamamlayıcı bir tedavi olarak hizmet edebileceğini düşündürmektedir (Wee ve diğ., 2015).

Fonksiyonel gıdaların geliştirilmesi için yürütülen bir çalışmada kurkumin, Manuka balı ve peynir altı suyu protein izolatının antimikrobiyal aktiviteleri ve sinerjik etkileri, çeşitli Gram-pozitif ve Gram negatif bakteriyel suşlara karşı test edilmiştir. Çalışmanın sonucunda, sinerjik antimikrobiyal aktiviteye sahip çeşitli kombinasyonların, gıda formülasyonları ve farmakolojik uygulamalarda kullanılabileceği bildirilmiştir (Balan ve diğ., 2015).

Bağırsak mikrobiyotası, okratoksin A ve bal+kersetin gibi fonksiyonel gıdalar arasındaki etkileşimler ve bu etkileşimlerin kan, karaciğer ve böbrek hücrelerinde okratoksin kaynaklı DNA hasarı üzerindeki etkilerini değerlendirmek amacıyla yapılan bir çalışmada; bal+kersetin uygulamasının, probiyotik bakterilerin (*Bifidobacteria* ve *Lactobacilli*) sayısını artırarak, DNA hasarını azaltığı belirlenmiştir (Orřolić ve dię., 2017).

Tarçın kabuğu, bal ve bunların kombinasyonlarından hazırlanan etanol ekstratlarının akne bakterilerine karşı antibakteriyel aktivitesinin araştırıldığı bir çalışmada, tarçın kabuğu ve bal kombinasyonunun potansiyel bir aktiviteye sahip olduğu ve böylece topikal anti-akne preparatları olarak geliştirilebileceği öne sürülmüştür (Julianti ve diğ., 2017).

Takzaree ve diğ. (2019) *Mentha pulegium* esansiyel yağı ve balın topikal kullanımının kutanöz ülserlerin iyileşmesinde sinerjistik etkisinin araştırıldığı çalışmada, 75 adet sağlıklı wistar erkek rat kullanılmış ve deney gruplarında yaraların yüzeyi günde bir kez nane, bal ve bunların karışımı ve fenitoin merhem ile kapatılmıştır. Bal veya nane veya bunların kombinasyonu ile tedavi edilen sıçanlarda, negatif ve pozitif kontrol gruplarına göre daha yüksek yara iyileşme yüzdesi ve daha az yara yüzeyi bulunduğu bildirilmiştir. Sonuçlar, *Mentha pulegium* esansiyel yağı ve balın topikal kullanımının sıçan deri ülserlerini iyileştirmede sinerjistik etki gösterdiğini kanıtlamıştır.

Phuna ve diğ. (2020) çalışmalarında kurkumin, piperin ve tualang balının (TH) tekli, kombinasyonlu ve kombine nanoemülsiyonlardaki antifungal aktivitelerini değerlendirmiştir. Üç doğal bileşiğin kombine nanoemülsiyonlarının, çok çeşitli *Candida* spp.'ye karşı antifungal aktivite (%80'den fazla) gösterdiği bulunmuştur.

Akasya balı, mersin yaprağı ve nar kabuğundan hazırlanan polifenolik ekstratların oral patojenler, *Streptococcus mutans* ve *Rothia dentocariosa* karşı *in vitro* sinerjistik etki gösterdiği bildirilmiştir (Sateriale ve diğ., 2020).

Karami ve diğ. (2020) yanık ünitesinden geri kazanılan çoklu ilaca dirençli *Pseudomonas aeruginosa* izolatlarına karşı tarçın özü ve balın sinerjistik etkisinin araştırıldığı çalışmada, *P. aeruginosa*'nın MDR izolatlarına karşı Siprofloksasin ve Gentamisin ile kombinasyon halinde tarçın ve balın sulu ve alkollü ekstratlarının sinerjistik etki gösterdiği bildirilmiştir.

Mohammadzamani ve diğ. (2020) sinnamaldehit, karvakrol ve balın yanık yarası enfeksiyonlarından izole edilen çoklu ilaca dirençli *Pseudomonas aeruginosa*'da *exoS* ve *ampC* genlerinin ekspresyonu üzerindeki inhibitör etkilerinin araştırıldığı çalışmada, bu üçlü kombinasyonun kontrol olarak kullanılan İmipenem'den daha yüksek antibakteriyel etki gösterdiği bildirilmiştir.

Zencefil, zerdeçal, çörek otu, enginar yaprağı, Azerbaycan devedikeni balı ve BB (arı ekmeği) karışımından hazırlanan Herbal adlı macunun, alkole bağlı olan ve olmayan karaciğer obezitesi, hepatit ve toksik karaciğer hasarı durumlarında etkileri incelenmiştir. Macun, akut süreçte 1 tatlı kaşığı, kronik hastalıklarda günde 2 kez yemeklerden önce 1 tatlı kaşığı olarak kullanılmıştır. Üçüncü düzey yağlı karaciğer distrofisi olan 48 kadın ve 54 erkek, ikinci düzeye düşmüştür (fibrozis oluşmamıştır). HCV (hepatit C virüsü) olan 114 hastadan 24 hasta, karaciğer sirozu olanların kanında ALT (alanin aminotransferaz) ve AST (aspartat aminotransferaz) iki kez azalmıştır. Kan tahlillerinde virüsü kaybolan 90 hastadan 81'inde karaciğer eksojen faktörü ve kandaki GGT normale dönmüştür (Rahimov ve Ahmedova, 2021a).

Başka bir çalışmada, sağ bacak açık kırığı, ameliyatlı, cilt ve yumuşak bölge defektleri olan bir hastada bal, propolis ve kekik uçucu yağı Api-fitoterapötik kombinasyonunun uygulanmasının yaranın aşamalı olarak kapanmasını teşvik ettiği bildirilmiştir (Zbucha, 2021).

Diğer bir çalışmada üst solunum yolu enfeksiyonu ve kronik bronşit tedavisinde immünostimülatör Api-fitoterapi ürünü olarak bronxbal macunun (bitkiler, propolis ve meyan kökü karışımı) virüs ve bakterilerin neden olduğu koronavirüs pnömonisi ve kronik bronşit veya Covid-19 gibi sürekli rehabilitasyon gerektiren sorunları çözmek için kullanılabileceği bildirilmiştir (Rahimov ve Ahmedova, 2021b).

Assagaf ve diğ. (2022) *Eucalyptus globulus* esansiyel yağı ve balının anti-enflamatuar, antioksidan, dermatoprotektif ve antimikrobiyal özellikler üzerindeki tekil ve kombine etkilerinin araştırıldığı çalışmada, uçucu yağ ve bal kombinasyonunun en iyi antioksidan aktivite gösterdiği bildirilmiştir.

Mekkaoui ve diğ. (2022) tavşanlarda kimyasal ve termal yara modellerinde seçilen esansiyel yağlarla bal karışımının iyileştirici etkisi araştırılmıştır. Çalışmada, 3 uçucu yağ (*Origanum vulgare*, *Rosmarinus officinalis* ve *Thymus vulgaris*) ile *Thymus vulgaris* balının pansuman karışımları tedavi gruplarında günlük olarak hazırlanmış ve uygulanmıştır. Yanıklar için en iyi iyileştirici etkinin bal ve *Thymus vulgaris* karışımında görüldüğü bildirilmiştir.

You ve diğ. (2022) çalışmalarında arı sütünün etken maddesi 10-HDA'nın aspirinle kombinasyonunun glial hücrelerin aşırı aktivasyonunu sinerjistik olarak inhibe ettiğini ve

proinflatuar mediatörlerin seviyelerini düşürdüğünü, ayrıca Morris su labirenti testinde, ne 10-HDA'nın ne de aspirinin LPS'nin neden olduğu hafıza bozukluğunu etkili bir şekilde iyileştirmediğini, ancak kombine tedavinin sinerjistik etkiler gösterdiğini bildirmiştir.

Wasilah ve Handini (2023) çalışmalarında çörek otu yağı (*Nigella sativa*) ve bal kombinasyonunun sisplatine maruz kalmış sıçanların duodenumu üzerinde koruyucu sinerjistik etki gösterdiğini bildirmiştir.

Allen ve diğ. (2023) bal-sarımsak ve bal-zencefil karışımlarının antibakteriyel aktivitesini, sıklıkla akut yara enfeksiyonlarında yer alan klinik olarak önemli iki bakteriye (*Pseudomonas aeruginosa* ve *Klebsiella pneumoniae*) karşı karşılaştırdığı çalışmalarında, sarımsağın her iki bakteriye karşı %100 konsantrasyonda en yüksek antibakteriyel aktiviteyi gösterdiğini, bal-sarımsak karışımı *Klebsiella pneumoniae*'ye karşı en etkili olurken; bal-zencefil karışımının *Pseudomonas aeruginosa*'ya karşı en etkili olduğu bulunmuştur.

2.5. BİYOLOJİK AKTİVİTELER

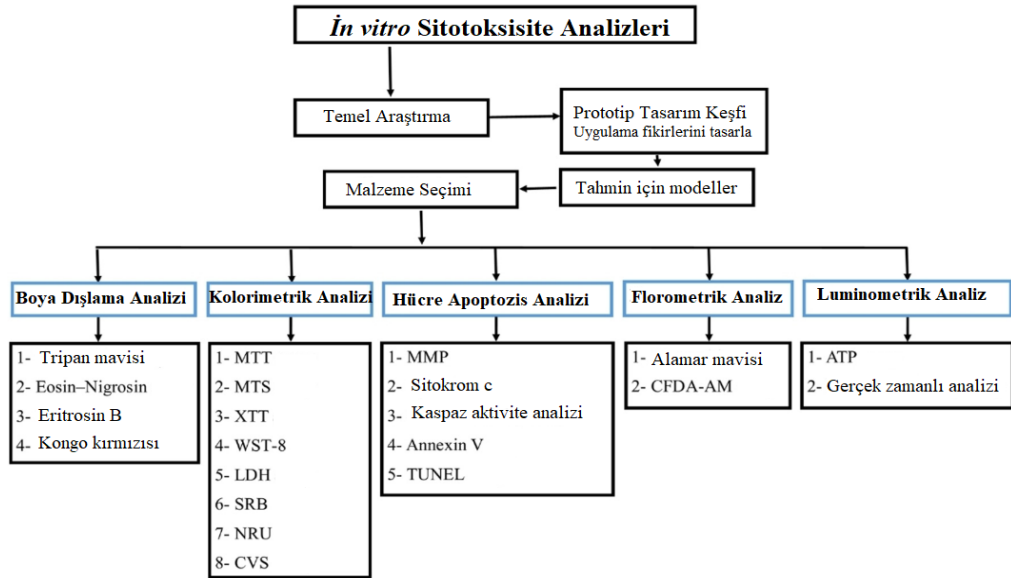
2.5.1. *In Vitro* Sitotoksik Aktivite

Sitotoksisite, *in vitro* çalışmalarda biyolojik değerlendirme için en önemli göstergelerden biridir. Hücrelerin yaşayabilirlik seviyeleri ve/veya çoğalma oranları, hücre sağlığının iyi göstergeleridir. Fiziksel ve kimyasal ajanlar hücre sağlığını ve metabolizmasını etkilemektedir. Bu ajanlar, hücre zarlarının yıkımı, protein sentezinin önlenmesi, reseptörlere geri dönüşümsüz bağlanma ve enzimatik reaksiyonlar gibi farklı mekanizmalar yoluyla hücrelerde toksisiteye neden olmaktadır. Bu mekanizmaların neden olduğu hücre ölümlerini belirlemek için ucuz, güvenilir ve tekrarlanabilir kısa süreli sitotoksisite ve hücre canlılığı analizlerine ihtiyaç duyulmaktadır. Kültürlenmiş hücrelerle yapılan *in vitro* hücre canlılığı ve sitotoksisite deneyleri, kimyasalların sitotoksisite testleri ve ilaç taraması için yaygın olarak kullanılmaktadır. Halihazırda bu analizler, ilaç geliştirme sırasında hem bileşik toksisitesini hem de tümör hücresi büyümesi inhibisyonunu değerlendirmek için onkolojik araştırmalarda da kullanılmaktadır (Aslantürk, 2018). *In vitro* sitotoksisite veya hücre canlılığı deneyleri, Tablo 2.4'de özetlenen birçok avantaj ve dezavantaj sağlamaktadır.

Tablo 2.4: *İn vitro* sitotoksosite veya hücre canlılığı deneylerinin genel avantajları ve dezavantajları (Gavanji ve diğ., 2023).

AVANTAJLAR	DEZAVANTAJLAR
<i>İn vitro</i> testlerin maliyeti, hayvan veya kullanım testlerinden çok daha düşüktür	Hayvan testlerinin yerini alacak kadar değerli teknik bilgi sağlamazlar
Çeşitli bileşiklerin toksisite deneyleri sırasında deney hayvanı kullanılmaz	Metabolik yanıtları veya reaksiyonları açıklayamama
<i>İn vivo</i> sistemlere göre en düşük biyolojik varyasyon nedeniyle yüksek yanıt hassasiyeti	Çeşitli davranışsal tepkiler izlenemez
Farklı bilimsel soruları yanıtlamak için çok yönlü ve iyi kontrollü olabilir	Enflamatuvar ve farklı doku koruyucu stratejilerin olmaması
Biyo-güvenlik ve daha az etik sorun	İlacın farmakokinetik etkilerini değerlendirememek
Hızlı Soruşturma ve tarama	Yanlış pozitif veya yanlış negatif test sonuçları
Büyük ölçekli tarama için standardize edilebilecek çok uygun analizler	-
Hücre tabanlı testlerin kullanılması ve tekrarlanabilirlik	-

Sitotoksosite testlerinin sürekli gelişmesiyle birlikte, morfolojik değişikliklerle hücre hasarının tespiti, hücre hasarının belirlenmesi, hücre büyümesinin ve metabolik özelliklerin ölçülmesi gibi yöntemler ortaya çıkmış ve kalitatif değerlendirmeden kantitatif değerlendirmeye doğru kademeli olarak geliştirilmiştir (Liu ve diğ., 2018).



Şekil 2.20: *İn vitro* sitotoksik aktivite testleri (Liu ve diğ., 2018).

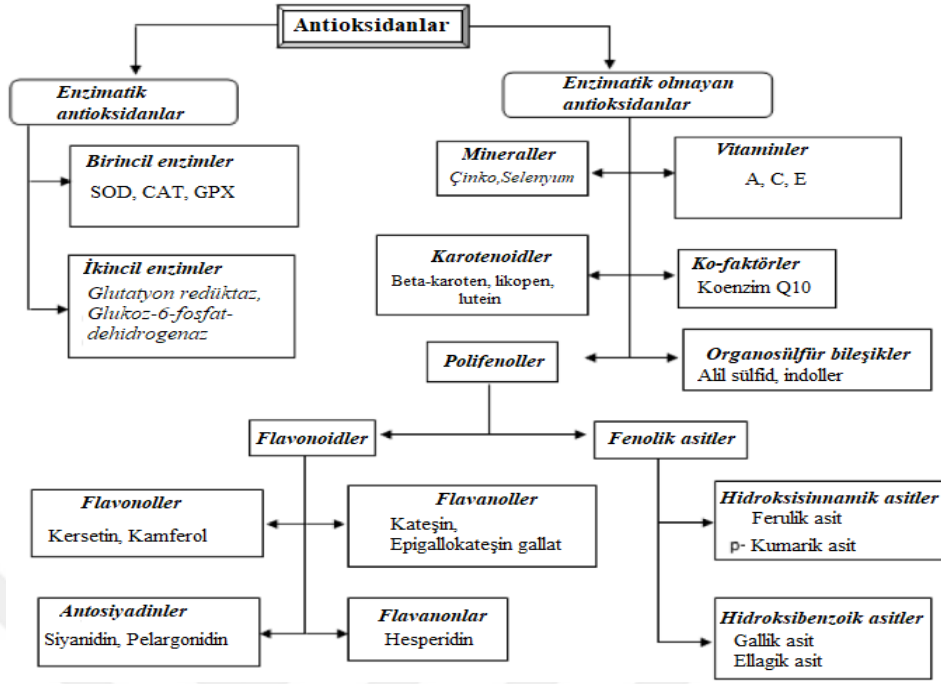
Hücre canlılığını veya sitotoksositeyi ölçmek için kullanılan analizler, boya dışlama testi, kolorimetrik, hücre apoptozis, florometrik ve luminometrik analizleri içerir ve her analizin kendi avantajları ve dezavantajları vardır. Günümüzde kullanılan yöntemler Şekil 2.20’de, avantaj ve dezavantajları ise Tablo 2.5’de verilmiştir.

Tablo 2.5: *In vitro* sitotoksik aktivite analizleri avantaj ve dezavantajları.

Yöntemler	Avantajlar	Dezavantajlar
Tripan Mavisi	Ucuz ve basit, Membran bütünlüğünün güvenilir göstergeleri, Hücrelere hızlı maruziyet	Hücre sayımı sırasında hatalar oluşabilir, Zaman alıcı, Yetenek ve fonksiyonlarını yitiren canlı hücreler ile sağlıklı hücreler arasında ayırım yapmak imkansızdır, Hücreler üzerinde toksik etki
Eritrosin B, Kongo kırmızısı	Uygulanabilirlik, Biyogüvenlik	İşlemi çok fazla zaman ve çaba gerektirir, Yeniden kullanılabilir hücre sayma odasının kirlenmesi, Farklı hemasitometre dolum oranları
MTT	Güvenli ve kullanımı kolay, Yüksek tekrar üretilebilirlik, Sitotoksosite değerlendirmesi için en iyi standart testlerden biri, HTS (yüksek verimli tarama)	Formazan kristal dönüşümü, hücre metabolik aktiviteye ve mitokondriyal etkileşime bağlıdır, Suda çözünmez, Kristalleri çözmek için izopropanol veya DMSO gibi organik solventler gereklidir, Hücre kültüründeki iğne şeklindeki MTT formazan kristalleri nedeniyle hücre kültürü ortamının çıkarılması zordur.
MTS	Hızlı tarama, Hassas ve ekonomik, Yüksek hassasiyet, Güvenilir, Suda çözünür formazan	MTS reaktifleri absorbsans seviyesini etkiler, Zaman, inkübasyon ve hücre tipi gibi çeşitli faktörler absorbsans ölçümünü etkileyebilir.
XTT	Kullanımı kolay, Biyogüvenlik, Yüksek hassasiyet ve doğruluk, Çok hızlı	Enzimatik düzenleme, hücre döngüsünün varyasyonları ve diğer hücre metabolik ve çevresel faktörler de dahil olmak üzere canlı hücrelerdeki indirgeme kapasitesi, absorbsans ölçümünü etkiler.
WST-1	Güvenli ve kullanımı kolay Yüksek tekrarlanabilirlik Üretilen boya suda çözünür ve solvente ihtiyaç duymaz.	Ek süre, standart inkübasyondan daha uzun süre ölçümü etkileyecektir.
WST-8	Düşük sitotoksosite, Formazan boyası suda çözünür, Kullanımı kolay	Hücre içi metabolik aktivitedeki değişiklikler redüksiyona etki eder, Canlı hücreler üzerindeki dolaylı etkiler ölçümleri etkileyebilir.
LDH	Hızlı ve basit tarama, Daha alakalı, Büyüme inhibisyonu ve hücre ölümü ayırt edilebilir.	Doğal LDH aktivitesine sahip oldukları için bileşiklerin ve serumun kullanımına ilişkin sınırlamalar vardır.
Nötr Kırmızı Alımı (NRU)	Lizozomal hasar için yaygın olarak kullanılan belirteç, Hızlı tarama	Tahlil kirleticilerden etkilenir ve test bileşiklerinin etkileşimi raporlanır.
Kristal menekşe boyama (CVS)	Ani, Çok yönlü	Bileşiklerin hücre metabolik aktivite üzerindeki etkisini değerlendirmek uygun değildir.
Mitokondriyal membran potansiyeli	Hızlı Soruşturma ve tarama, Çok sayıda potansiyometrik boya mevcuttur, Hücre metabolik durumuna ilişkin önemli bilgiler sağlayan özel etkileşim	Yetişkin ve birincil canlı hücrelerin izolasyonu imkansızdır, Çeşitli reaktifler ve substratlar gereklidir, Klinik uygulama eksikliği.
Sitokrom c	Apoptozun içsel yolunun erken evresindeki değişiklikleri tanımlamaya yardımcı olur.	Sitoplazmaya salındığında kararsızdır, Protein-protein etkileşimi meydana gelebilir ve floresan protein etiketi değişiklik yapabilir.
Kaspaz aktivitesi	Güvenilir, basit ve hızlı tarama, Çok sayıda antikör mevcuttur, Apoptotik süreçlerin ayrı ayrı kaspaz sinyallerini analiz etmek mümkündür, Verimli ve ekonomik	Düşük özgüllük, Kaspaz aktivasyonu her zaman apoptoz olarak tanımlanmaz, Substrat çıkışması tahlilin özgüllüğünü etkiler.
TUNEL	Hızlı ve basit, Erken apoptozu ve nekrotik ayrımı yapar Yüksek hassasiyet,	Doğru sonuçlar elde etmek için gerekli büyük numuneler, Pahalı ve zaman alan teknik, Düşük apoptotik hücre sayıları.
Alamar mavisi	Radyoaktif olmayan, hızlı değerlendirme için basit test, Zehirsiz	Hemasitometre gibi hücre sayımı hakkında bilgi vermez.
CFDA-AM	Aynı hücre hatlarında paralel teste uygun	Floresan bileşikler testi etkileyebilir.

2.5.2. *In Vitro* Antioksidan Aktivite

Oksidatif stres, çeşitli fizyolojik fonksiyonları etkileyebilecek oksidatif hasar üretir. Serbest radikaller ve reaktif oksijen türleri (ROS), hücrel sistemlerde ana oksidan ajanlardır ve yaşlanma ve birçok hastalığın başlangıcında rol oynarlar. ROS ve serbest radikaller, vücutta meydana gelen farklı hücrel biyokimyasal reaksiyonlarda örneğin oksijenin aerobik üretimi için mitokondride, yağ asitlerinin metabolizmasında, ilaçların metabolizmasında ve bağışıklık sisteminin aktivitesi sırasında fizyolojik olarak üretilir. Diğer taraftan serbest radikaller ayrıca kirlilik, yanlış yaşam tarzı, UV ışınları, iyonize radyasyon ve yoğun fiziksel aktiviteden kaynaklanan psikofiziksel stres gibi eksojen faktörlerle de üretilebilir. Antioksidanlar, serbest radikallere elektron verebilen, hücrelere ve nükleik asitler, proteinler ve lipitler gibi büyük biyomoleküllere zarar verme yeteneklerini nötralize eden, azaltan veya ortadan kaldıran moleküllerdir. Antioksidanlar, endojen (süperoksit dismutaz (SOD), alfa lipoik asit (ALA), katalaz, koenzim Q10 (CoQ10), glutatyon peroksidaz (GPX)) veya diyet yoluyla alınan eksojen kaynaklı olabilir (Cianciosi ve diğ., 2018). Antioksidanlar çözünürlüklerine bağlı olarak, sudaki çözünürlükleri ve lipidlerdeki çözünürlükleri ile sınıflandırılır. Suda çözünen antioksidanlar (örneğin C vitamini), sitozol veya sitoplazmatik matris gibi hücrel sıvılarda bulunur. Lipidlerde (örneğin E vitamini, karotenoidler ve lipoik asit) çözünen antioksidanlar ağırlıklı olarak hücre zarlarında bulunur. Antioksidanların sınıflandırılması, her sınıftaki bileşiklerin en temsili örnekleriyle birlikte Şekil 2.21’ de sunulmuştur (Munteanu ve Apetrei, 2022).



Şekil 2.21: Antioksidanlar (Munteanu ve Apetrei, 2022).

Antioksidan moleküller, hidrojen atomu transferi (HAT) ve tek elektron transferi (SET) olmak üzere iki ana mekanizma yoluyla radikalleri etkisiz hale getirmektedir. HAT'a dayalı yöntemler, 2.1 de verilen denkleme göre, bir antioksidanın hidrojen bağıışı ($AH = H$) yoluyla serbest radikalleri nötralize etmeye yönelik klasik kapasitesini ölçmektedir. HAT tabanlı testlerin örnekleri, oksijen radikal absorpsiyon kapasitesi (ORAC), toplam peroksil radikal yakalama antioksidan parametresi (TRAP) ve toplam oksiradikal temizleme kapasitesi (TOSC) deneyleridir (Munteanu ve Apetrei, 2022).



Elektron transferi (ET) testleri olarak da adlandırılan tek elektron transferine dayalı testler (SET), bir antioksidanın metalik iyonları, karbonil gruplarını ve serbest radikalleri azaltmak için bir elektron transfer etme yeteneğini ölçmektedir. ET yöntemlerinde bağıl reaktivite, reaktif fonksiyonel grubun deprotonasyon ve iyonlaşma potansiyeline bağlıdır, bu nedenle ET reaksiyonları pH'a bağlıdır. Genel olarak, iyonlaşma potansiyeli değerleri artan pH ile azalır, bu deprotonasyon ile artan elektron verme kapasitesini yansıtmaktadır. Asidik koşullarda, antioksidan bileşikler üzerindeki protonasyon nedeniyle indirgeme kapasitesi kısıtlanabilirken, bazik koşullarda fenolik bileşiklerin proton ayrışması numunenin indirgeme kapasitesini artıracaktır (Karadag ve diğ., 2009). SET'e dayalı yöntemler, potansiyel bir

antioksidanın bir elektronu transfer etme, böylece $AH \bullet^{+}$ ya (denklem 2.2) yol açma ve ayrıca herhangi bir bileşiği azaltma, ardından denklem (2.3)'de gösterildiği gibi, çok kararlı $A \bullet$ radikalini oluşturmak için çözeltide deprotonasyon yapma kapasitesini saptamaktadır. SET'i kullanan çoğu yöntemde, antioksidan aktivitesi veya kapasitesi, spektrofotometrik olarak bir flüoresan veya renkli probu (oksitleyici madde/oksidan/substrat) (yani yaygın peroksil radikalleri yerine) indirgeme yetenekleriyle belirlenmektedir. Probu kendisi bir oksidandır ve antioksidandan bir elektron çekerek probun renk değişikliklerine neden olur. Renk değişiminin derecesi antioksidan konsantrasyonu ile orantılıdır. Renk değişimi durduğunda reaksiyon bitiş noktasına ulaşmış olur. Absorbans değişimi (ΔA), doğrusal bir eğri vermek için antioksidan konsantrasyonuna karşı çizilir. Eğrinin eğimi, antioksidanın Trolox eşdeğeri veya Gallik asit eşdeğeri olarak ifade edilen indirgeme kapasitesini gösterir. Korelasyonun yapılabilmesi için antioksidan kapasitenin indirgeme kapasitesine eşit olduğu kabul edilir (Karadağ ve diğ., 2009). Folin-Ciocalteu testi (FC), antioksidan gücün ferrik indirgenmesi (FRAP) ve bakır antioksidan kapasitesini azaltma testleri (CUPRAC) dahil olmak üzere spektroskopik SET testleri, bir antioksidanın bir oksidanı indirgeme kapasitesini ölçer (Munteanu ve Apetrei, 2022).



HAT/SET mekanizmalarının birlikte rol oynadığı karma mod testleri genellikle kararlı bir kromoforun (2,2'-azinobis-3-etilbenzotiazolin-6-sülfonik asit) (ABTS) ve 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) gibi ortadan kaldırılmasına dayanmaktadır. HAT, ET ve proton-bağlı elektron transferi (PCET) mekanizmaları, reaksiyon koşullarına (pH ve solvent gibi) bağlı olarak çeşitli oranlarda farklı roller oynamaktadır (Munteanu ve Apetrei, 2021).

Antioksidan potansiyelini ölçmeye yönelik herhangi bir yöntem için temel özellikler arasında bir oksidan üretici, oksidasyon başlatıcı (örn. sıcaklık ve metal katalizörler), bir substrat ve uygun bir bitiş noktası ölçüsü yer alır. Bununla birlikte, farklı yöntemler, aynı antioksidan için, oksidanın kaynağı, sıcaklık, ışık (fotosensitizasyon), kısmi oksijen basıncı ve deneysel koşullar dahil olmak üzere çeşitli faktörlerdeki varyasyona atfedilebilecek değişken sonuçlara yol açabilmektedir (Siddeeg ve diğ., 2021). Literatürde birçok yöntem geliştirilmiş ve

denenmiştir, bu yöntemlerin avantajları ve sınırlamaları halen tartışılmaktadır. En yaygın kullanılan *in vitro* antioksidan aktivite yöntemleri Tablo 2.6'da verilmiştir.

Tablo 2.6: En yaygın *in vitro* antioksidan aktivite yöntemleri (Siddeeg ve diğ., 2021).

Yöntem	Etki Şekli (Mekanizma)	Yöntem ve Son Ürün Belirleme
Alkali ile süperoksit radikal oluşumunun temizlenmesi	Hidrojen atomu transferi	Spektrometre/kolorimetri
Ferrik indirgeme gücü	Elektron transferi	Spektrometre/kolorimetri
DPPH radikal süpürme aktivitesi	Elektron transferi	Spektrometre/kolorimetri
Folin-Ciocalteu'ya göre toplam fenoller	Elektron transferi	Spektrometre/kolorimetri
Bakır (II) indirgeme kapasitesi	Elektron transferi	Spektrometre/kolorimetri
Hidrojen peroksitin temizlenmesi	Hidrojen atomu transferi	Spektrometre/kolorimetri
Trolox eşdeğeri antioksidan kapasitesi	Elektron transferi	Trolox standart eğrisi (mM cinsinden Trolox eşdeğerleri)
ABTS temizleme etkinliği	Hidrojen atomu transferi	Spektrometre/kolorimetri
β -karoten süpürme aktivitesi	Elektron transferi	Spektrometre/kolorimetri
Hidroksil temizleme	Hidrojen atomu transferi	Spektrometre/floresinin floresans kaybı
Oksijen radikal absorban kapasitesi	Hidrojen atomu transferi	Spektrometre/floresinin floresans kaybı
Nitrik oksidin temizlenmesi	Hidrojen atomu transferi	Spektrometri/ kolorimetri
Antioksidan kapasiteyi azaltan bakır iyonu	Elektron transferi	Spektrometre/kolorimetri
Tiyobarbitürik asidin temizlenmesi	Hidrojen atomu transferi	Malondialdehit
Ferrik tiyosiyanatın temizlenmesi	Elektron transferi	Spektrometre/kolorimetri
Fosfomolibdenin temizlenmesi	Elektron transferi	α -tokoferolün UV spektrofotometre eşdeğerleri
Toplam radikal tutucu antioksidan	Hidrojen atomu transferi	Spektrometre/kemilüminesans söndürme
Lipid peroksidasyon inhibisyon kapasitesi	Hidrojen atomu transferi	Malondialdehit
Engellenmiş oksijen alımı	Hidrojen atomu transferi	Polarografik prob, floresan veya basınç göstergesi
Gaz kromatografisi	Sıvı durağan faz ile gaz hareketli faz arasındaki yeniden dağılım	Alev iyonizasyonu veya termal iletkenlik tespiti
Yüksek performanslı sıvı kromatografisi	Farklı polaritelere sahip bir katı durağan faz ile bir sıvı hareketli faz	UV-VIS tespiti, floresans, kütle spektrometrisi veya elektrokimyasal tespit

Tek bir bileşiğin antioksidan aktivitesi, özellikle lipidlerin doğası, antioksidanların konsantrasyonu, sıcaklık, oksijen basıncı, diğer antioksidanların varlığı, su ve başta proteinler olmak üzere birçok faktöre bağlıdır (Polumbryk ve diğ., 2013).

İkili ve/veya daha fazla karışımların sinerjistik, antagonisitik ve aditif (katkı) antioksidan etkilerinin kapsamlı bir şekilde anlatıldığı çalışmada Olszowy-Tomczyk, (2020) sinerjistik etkiler; daha güçlü antioksidanın (daha düşük bir indirgeme potansiyeline sahip) daha zayıf antioksidan (daha yüksek bir indirgeme potansiyeline sahip) tarafından yenilenmesi, antioksidanlar arasında, ana bileşiklerinkinden daha yüksek antioksidan aktivite gösteren

kararlı moleküller arası komplekslerin oluşumu, dimerlerin ve addüktörlerin veya bileşiklerinin karışımından daha büyük bir antioksidan güce sahip yeni fenolik ürünlerin oluşumu, antioksidanların çözünürlüğündeki farklılıklar, antioksidanların faz dağılımlarındaki farklılıklar (arayüze yakın ve arayüzde) ve incelenen bileşikler arasındaki öngörülemeyen etkileşimler vb. şeklinde açıklanmaktadır.

Antagonistik etki ise, iki veya daha fazla ajanın kombinasyon halinde, bireysel etkilerinin toplamından daha az olan genel bir etkiye sahip olduğu bir kavramdır. Bazen antioksidanların karışımlarındaki etkisi dramatik sonuçlara neden olabilir ve antioksidan değeri önemli ölçüde azaltabilmektedir (Wang ve Zhu, 2017).

Aditif etki genellikle oksidasyon (radikal nötralizasyon) sırasında antioksidanlar (sinerjizm veya antagonizma) arasındaki etkileşimlerin bulunmadığını göstermektedir. Bu etki, tek bir antioksidan birbirinden bağımsız olarak hareket ettiğinde ortaya çıkar. Bir antioksidan, kompleks karışımda meydana gelen başka bir antioksidanın etkisini bozmaz. Bu şekilde, karışımın antioksidan aktivitesi, bireysel bileşenlerinin antioksidan aktivitesinin toplamı şeklindedir (Sazhina, 2017).

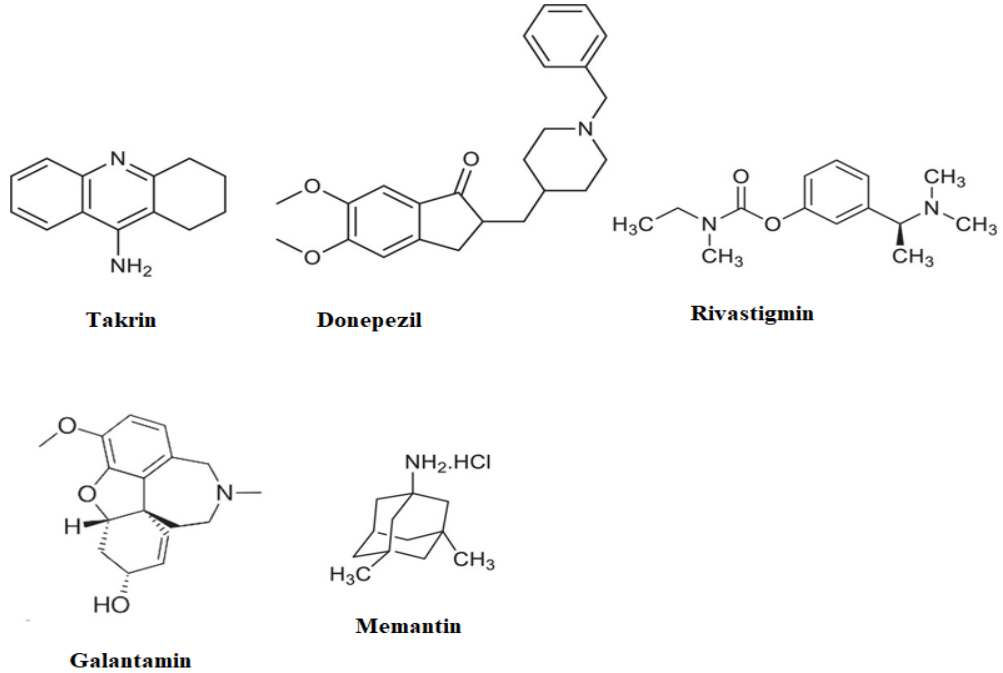
2.5.3. *In Vitro* Anti-Asetilkolinesteraz Aktivite

Asetilkolin (ACh), nöradrenalin, dopamin, gama-aminobutirik asit, serotonin ve glutamat gibi farklı nörotransmitter sistemlerinin dengesi, beyin fonksiyonu için esastır (Marucci ve diğ., 2021). Asetilkolinesteraz (AChE) (E.C.3.1.1.7), nörotransmitter asetilkolinin kolin ve asetik aside hidrolizini katalize eden bir serin hidrolazdır (Şekil 2.22). Hafıza ve öğrenmede önemli bir rol oynayan, merkezi ve periferik sinir sisteminde kritik bir enzimdir (Taqui ve diğ., 2022).

İlk defa *Torpedo californica* 'dan (Tc AChE) izole edilmiş ve 3 boyutlu yapısı 1991 yılında aydınlatılmıştır (Khan ve diğ., 2018b). Enzimin aktif bölgesi 14 korunmuş amino asit kalıntısından oluşmaktadır. AChE aktif bölgesi 20 Å derinliğindedir ve üç amino asit Ser203, Glu334 ve His447 katalitik üçlüyü oluşturmaktadır. Yakınlarda, Tyr337'nin ötesinde bir periferik bağlanma bölgesi mevcuttur. AChE inhibitörleri bu sitelerin her ikisi ile etkileşime girmektedir (Riaz ve diğ., 2020).

AChE, ACh seviyesini düzenleyebilir ve kolinerjik sinapta nörotransmisyonu sonlandırabilir (Walczak-Nowicka ve diğ., 2021). Ayrıca, iltihaplanma, hücre apoptozu ve oksidatif strese katılım dahil olmak üzere bir dizi farklı işlevi vardır (Ruz ve diğ., 2020).

Günümüzde, Alzheimer hastalığı (AH) dahil olmak üzere birçok nörodejeneratif hastalığın beyindeki ACh kaybı ile ilişkili olduğu bilinmektedir. AChE'nin inhibisyonu, sinaptikte ACh'nin hidrolizinin baskılanmasını teşvik ettiğinden bu hastalıkların tedavisi için etkili bir strateji olarak kabul edilmektedir (Liu ve diğ., 2021). Son zamanlarda, anti-AChE aktivitesi gösteren AChE inhibitörleri (AChEi) olarak kullanılan FDA onaylı AH ilaçları arasında moleküler formülleri Şekil 2.25'de gösterilen takrin (hepatotoksitesitesi nedeniyle artık klinik uygulamada kullanılmamaktadır), rivastigmin, galantamin, memantin (*N*-metil- d - aspartat reseptörünün bir antagonisti) ve donepezil bulunmaktadır (Prasasty ve diğ., 2018; Eissa ve diğ., 2023). AChEi'leri arasında galantamin, *Galanthus nivalis* L. ve *Amaryllidaceae* familyasındaki ilgili bitkilerden ekstrakte edilen doğal bir alkaloiddir (Murray ve diğ., 2013).



Şekil 2.22: Alzheimer Hastalığı'nın tedavisinde kullanılan FDA onaylı ilaçlar (Eissa ve diğ., 2023).

Literatürde bildirilen çalışmalar, biyoaktif doğal ürünlerin özellikle Alzheimer ve Parkinson hastalıklarını hedef aldığını ortaya koymaktadır (Ullah ve diğ., 2023). Çeşitli bitki kaynaklarından ekstrakte edilen farklı doğal ürünler, potansiyel bir AChEi olarak dünya

apında popülerlik kazanmaya başlamıştır ve bu nedenle AH tedavisi için terapötik bir seçenek olarak kullanılabilir. Taqui ve diğ., (2022) alışmalarında AChEi aktivitesine sahip bitkilerden ve bunların ekstraktlarından ayrıntılı (2000-2021 yılları arasında yayımlanmış tüm literatür verileri) olarak bahsetmiştir. Başka bir çalışmada, bitki kaynaklı terpenlerin, ekstraksiyonlarına, kimyasal yapılarına, antikolinesteraz etkilerine ve yapı-aktivite ilişkilerine odaklanan terpen türevi kolinesteraz inhibitörlerinin kapsamlı bir araştırılması sunulmuştur (Lai Shi Min ve diğ., 2022). Ahmed ve diğ., (2021) AChE inhibe edici aktiviteler gösteren ve AH'nda potansiyel fayda sağlayabilecek fito-bileşikleri ve tıbbi bitkilerden elde edilen ekstraktları bildiren çalışmaları özetlemiştir. Diğeri bir araştırma AChE inhibitörlerinin mikrobiyal üretimindeki son gelişmeleri vurgulamakta ve mikrobiyal fermentasyondan AChE inhibitörlerinin izolasyonu, taranması, ekstraksiyonu ve tespit metodolojileri hakkında daha önce bildirilen tüm çalışmaları özetlemiştir (Zaki ve diğ., 2020). Moodie ve diğ., (2019) alışmalarında deniz kaynaklarından türetilen kolinesteraz inhibitörlere ilişkin literatürü kapsamlı bir şekilde sunmuştur. Güncel literatür verileri balların zengin bir kolinesteraz inhibitörü kaynağı olabileceğini ortaya koymuştur (Baranowska-Wjcik ve diğ., 2020; Szwajgier ve diğ., 2022). Bal arısı ürünlerinin (arı zehiri ve propolis) tek başına ve kombinasyon halinde uygulanması, skopolamin ile tedavi edilen hayvanların beynindeki asetilkolinesteraz aktivitesini önemli ölçüde azalttığı bildirilmiştir (Dalal ve diğ., 2023).

3. MALZEME VE YÖNTEM

3.1. KİMYASALLAR

- Kalsiyum ve magnezyum içermeyen 1x Fosfat tamponlu salin (PBS)
- %0.25 tripsin/EDTA (Thermo Fisher Scientific, Gibco)
- Fetal sıgır serumu (FBS) (GE Healthcare, HyClone)
- Dulbecco'nun değiştirilmiş Eagle ortamı (DMEM) (Thermo Fisher Scientific, Gibco)
- Penisilin-Streptomisin 10.000 U/ml (Thermo Fisher Scientific, Gibco)
- L-glutamin 200 mM (Thermo Fisher Scientific, Gibco)
- Amonyum asetat (Merck)
- Askorbik asit (Sigma-Aldrich)
- Bakır (II) sülfat (Sigma-Aldrich)
- 2,2-Difenil-1-pikrilhidrazil (Sigma-Aldrich)
- Folin-Ciocalteu belirteci (Merck)
- Neokuprin (Sigma-Aldrich)
- Sodyum karbonat (Merck)
- Sodyum nitrit (Merck)
- Troloks (Sigma-Aldrich)

3.2. EKİPMAN VE ENSTRÜMANLAR

- Buzdolabı (+4, -20 ve -80°C)
- Kurutma etüv
- Liyafilizatör
- Evaporatör
- Otoklav
- Santrifüj
- Su banyosu
- CO₂ inkübatör
- Laminar Flow Kabin
- İnvert mikroskop

3.3. DENEY MATERYALLERİNİN TEMİNİ VE HAZIRLANMASI

3.3.1. Bal Arısı Ürünlerinin Temini ve Ekstrelerinin Hazırlanması

Bu tez kapsamında çalışılan bal arısı ürünlerinin (bal, polen, arı sütü ve apilarnil) toplandığı yerler ve temin eden kuruluşlar Tablo 3.1’de verildi.

Tablo 3.1: Bal arısı ürünlerinin temini

Bal arısı ürünleri	Toplandığı yer	Temin eden kuruluş
Kestane Balı	Batı Karadeniz	Altıparmak Gıda San. ve Tic. A. Ş
Kestane arı poleni	Şile	Şile Arıcılık ve Arı Ürünleri Tarımsal Kalkınma Kooperatifi
Arı sütü	Sivas	Arpaş Arifoğlu Pazarlama Dağıtım ve Ticaret A.Ş.
Apilarnil	Bursa	Dikbıyık Arı Ürünleri Ltd.

Kestane Balı

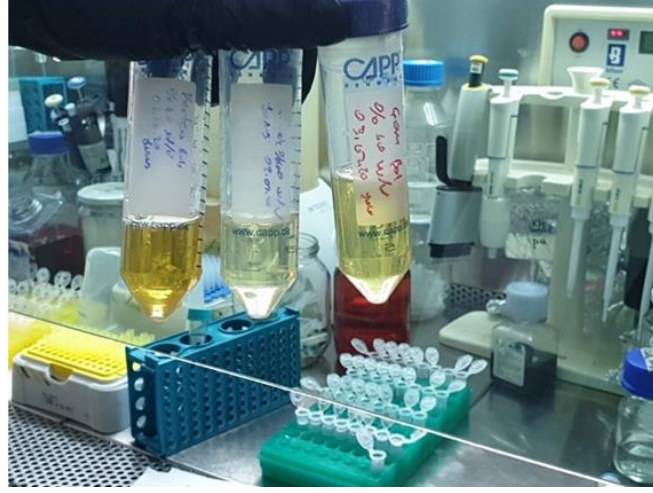
Kestane balı Altıparmak Gıda San. ve Tic. A. Ş tarafından fiziko-kimyasal (EK-1) ve polen (EK-2) analizleri yapılarak temin edilmiştir.

Baldaki polenlerin bitkisel kökeni Melissopalinojoloji yöntemiyle belirlenmektedir (Bodor ve diğ., 2021). Kestane balının dominant polenleri (≥ 45) %78 kestane (*Cestanea sativa*) poleni olarak bulunmuş ve analizi EK-2’de sunulmuştur.



Şekil 3.1: Kestane balı.

- Kestane balı dH₂O’da çözülerek stok solüsyon %40 (ağırlık/hacim) olacak şekilde hazırlandı.



Şekil 3.2: Kestane balı su ekstresi.

Kestane Polen ve Apilarnil (Erkek arı larvası)

Kestane poleni örneğinin polen analizi Altıparmak Gıda San. ve Tic. A. Ş tarafından gerçekleştirildi ve polen analizi sonucu EK-3’de verildi.

- Kestane poleni örneğinden 4 gr tartılarak 150 mL metanol, Apilarnil örneğinden 1 gr tartılarak 50 mL metanol eklendi. Örnekler 1 gece boyunca oda sıcaklığında çalkalayıcıda bırakıldıktan sonra, filtreden geçirilerek süzüldü.
- Kestane poleni ve Apilarnil metanol örneğinin döner evaporatör (75 rpm-50 °C’de) yardımıyla çözücüleri (metanol) uçuruldu. Kalıntılar tartıldıktan sonra, son konsantrasyonları belirlenmek üzere DMSO ‘da çözülerek hazırlandı.
- Çalışmada, Apilarnil metanol ekstresinin stok konsantrasyonu 50 mg/mL ve kestane poleni metanol ekstresinin stok konsantrasyonu 100 mg/mL olacak şekilde hazırlandı.



Şekil 3.3: Apilarnil ve Kestane polenin metanol ekstrahları.

Arı sütü

Arı sütü örneğinin 10-HDA analizi Altıparmak Gıda San. ve Tic. A. Ş tarafından gerçekleştirildi ve analiz sonucu EK-4’de verildi.



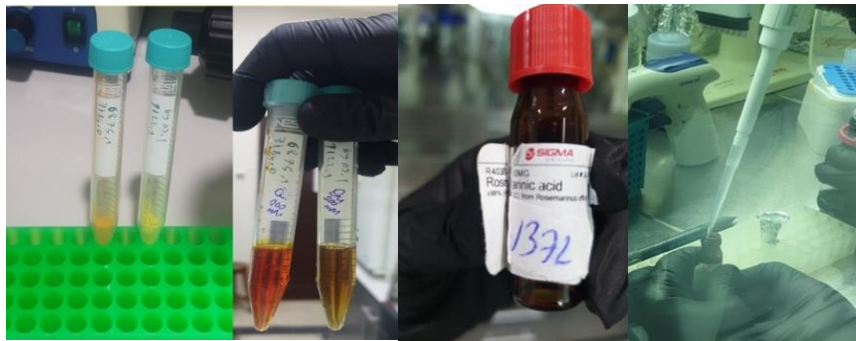
Şekil 3.4: Arı sütü DMSO ekstresi.

- 500 mg liyofilize arı sütü (RJ) 10 mL DMSO’ da çözülerek, stok arı sütü konsantrasyonu 50 mg/mL olacak şekilde hazırlandı.

3.3.2. Bal Arısı Ürünlerinin Doğal Katkılarla Kombine Edilmesi

Kersetin, Kurkumin ve Rosmarinik asit hazırlanışı

- Kullanılan fitokimyasalların stok konsantrasyonları 100 mM olacak şekilde DMSO’ da çözülerek hazırlandı.



Şekil 3.5: Kersetin, Kurkumin ve Rosmarinik asit DMSO ekstresi.

3.4. SAF VE KOMBİNE ÜRÜNLERİN BİYOLOJİK AKTİVİTELERİNİN *İN VİTRO* TESTLERLE BELİRLENMESİ

3.4.1. *İn Vitro* Sitotoksik Aktivite Testi

3.4.1.1. Fare Embriyonik Fibroblast Hücrelerinin (NIH3T3) Büyütülmesi ve Pasajlanması

Deneylerde İstanbul Üniversitesi, Fen Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü Hücre Kültürü koleksiyonunda bulunan embriyonik fare fibroblast (NIH3T3) hücreleri kullanıldı.

Fibroblastlar, karmaşık hücre dışı matris üreterek, biyofiziksel ve biyokimyasal işaretler yoluyla sinyal nişleri oluşturarak doku homeostazına ve hastalığa katılan çeşitli mezenkimal hücrelerdir. Fibroblastlar, bağ dokusu üretmenin ötesinde, embriyonik gelişim, yetişkin homeostazı ve yaralanma, onarım ve yeniden şekillenme sırasında kemik oluşturan osteoblastlar veya lipid dolu adipositler gibi özelleşmiş mezenkimal hücre tipleri için öncü görevi görmektedir (Plikus ve diğ., 2021).

Fare embriyonik fibroblast hücrelerinin kültürü için hücreler elde etmek üzere, süpernatantdan dikkatlice 5 mL'lik bir pipet yerleştirilir ve peleti 0.5-1 mL süpernatant ile birlikte pipetleme yapıldı. Hücre kümelerini dağıtmak için kültür ortamında hücreler yukarı ve aşağı pipetleme yapıldı. Hücrelerin %5 CO₂ ile 37 °C'lik bir inkübatörde yüzeye yapışması ve büyümesi izlendi. (Pasaj 0). Hücreler bir araya geldikten sonra (~ 48 saat), 10 mL PBS ile yıkanır ve 2 mL %0.05 tripsin/EDTA ile hücreler kaldırılır ve nötralizasyondan sonra hücreleri 1:4 seyreltmede 4 yeni 100 mm petri kabına geçirildi (8 mL tam kültür ortamı ile-Pasaj 1). Hücre büyüme oranlarına bağlı olarak hücreler 1:3 ila 1:5 oranında pasajlandı. Sağlıklı NIH3T3 hücreleri için maksimum pasaj sayısı yaklaşık 4'tür, çünkü hücre büyümesi 4-5 pasajların ötesinde yavaşlar (Qiu ve diğ., 2016).

3.4.1.2. MTT Hücre Canlılığı Testi

MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5 difeniltetrazolyum bromür) testi 1983'te geliştirilen ve günümüzde de en yaygın kullanılan testtir. İlaç geliştirme çalışmalarında toksisite ve proliferasyonu değerlendirmek için MTT testi kullanılmaktadır. Tetrazolyum tuzları, canlı hücrelerde mitokondriyal dehidrojenaz enzimleri tarafından indirgenen ve çözünmeyen

formazan kristallerine dönüşen çözünür ve renksiz bileşiklerdir. Formazan kristallerinin çözünmesi, MTT analizinde önemli bir rol oynar. MTT bileşiği sarı renklidir, oluşan formazan ise mor renkli olup suda çözünmez. MTT analizinde dimetil sülfoksit (DMSO), asitleştirilmiş izopropanol, sodyum dodesil sülfat (SDS), asitleştirilmiş etanol çözeltisi gibi çeşitli çözündürme çözeltileri kullanılmaktadır (Gavanji ve diğ., 2023).

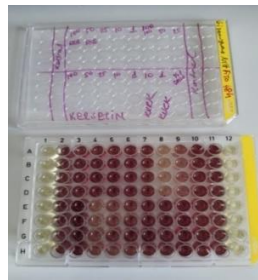
MTT ile yapılan canlılık testinde ilk aşamada hücreler belirli bir süre toksik maddeye maruz bırakılırlar. Daha sonra toksik madde uzaklaştırılarak tetrazolyum bileşiği ortama eklenir ve ortalama 3-4 saat boyunca inkübe edilir. Bu süreçte canlı hücrelerin ilgili bileşikler indirgeyip formazana dönüştürmesiyle renk değişimi gerçekleşir. Son aşamada oluşan renk değişimi 540 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak ölçülür ve denklem 3.1' de gösterildiği gibi canlı/ölü hücre sayısı belirlenir (Mossman, 1983).

$$\text{Hücre canlılığı}(\%) = \frac{OD_{\text{örnek}}}{OD_{\text{kontrol}}} \times 100 \quad (3.1)$$

OD_{örnek}: Örnek absorbansı

OD_{kontrol}: Kontrol absorbansı

Tez kapsamında çalışılan saf ve kombine ürünlerin hücreler üzerindeki sitotoksik etkilerini belirlemek amacıyla NIH3T3 hücreleri (3×10^4 hücre/kuyucuk) 200 µL/kuyucuk olacak şekilde 96 kuyucuklu hücre kültürü plakalarına hücre ekimi yapıldı ve hücreler 24 saat süreyle %5 CO₂'li etüvde 37°C'da inkübe edildi. Sonrasında, 96 kuyucuklu plakalara tutunmuş olan hücrelerin üzerindeki besiyerleri uzaklaştırıldı. Kontrol grubu hücreleri için daha önce hazırlanmış NIH3T3 hücrelerine uygun besiyeri, deney grubu hücrelerinin üzerine ise NIH3T3 hücrelerine uygun besiyerinde hazırlanmış saf ve kombine ürünlerin farklı konsantrasyonları eklendi. DMSO'nun son konsantrasyonu deney gruplarında %1'i geçmeyecek şekilde kullanıldı.



Şekil 3.6: MTT analizinde oluşan renk değişimi.

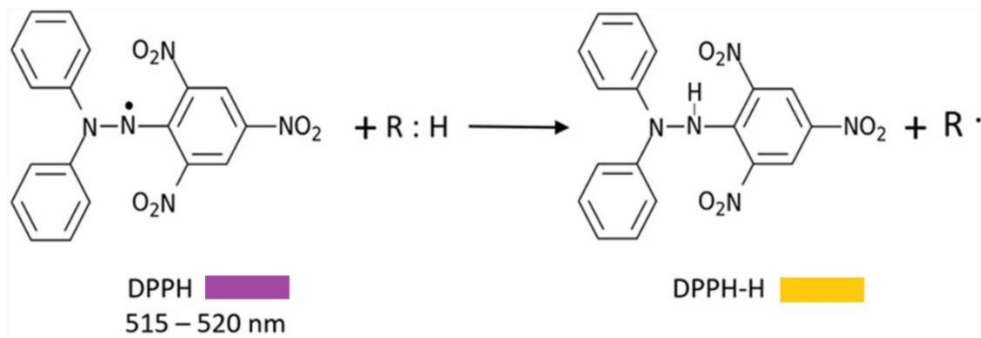
Uygulanan saf ve kombine ürünlerin sitotoksik etkileri 24, 48 ve 72 saat sonra değerlendirilmek için, inkübasyon sonunda hücrelerin üzerindeki besiyeri uzaklaştırılarak 30 µL MTT stok çözeltisi (5 mg/mL, D-PBS içinde hazırlandı) eklenerek 4 saat etüvde bekletildi. Oluşan formazan kristallerinin çözünmesi için inkübasyon sonunda her kuyuya 150 µL DMSO eklendi ve çözelti homojen hale gelinceye kadar kültür kabı oda sıcaklığında çalkalandı. Oluşan renkli ürünün 540 nm dalga boyundaki absorbansı mikropłaka okuyucu ile ölçüldü ve absorbans değerleri kontrole göre karşılaştırılarak hücrelerin canlılığı % cinsinden denklem 3.1 ile belirlendi.

3.4.2. *İn Vitro* Antioksidan Aktivite Testleri

3.4.2.1. DPPH* Radikal Süpürücü

DPPH* (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) radikal süpürücü testi basit, gerçekleştirmesi hızlı, uygun maliyetli ve verimlidir. Bu nedenle bileşenlerin, bileşen karışımlarının, ekstraktların veya biyolojik matrislerin (örneğin bal, şarap, meyve suyu, tükürük salgıları) antioksidan taraması için en yaygın kullanılan yöntemlerden biridir.

DPPH*, suda çözünmeyen, renkli ve oldukça kararlı bir bileşiktir. Diğer birçok serbest radikalın aksine, dimerizasyon olmadan kararlı bir molekül haline gelmek için bir elektron veya hidrojen radikalini kabul eder. DPPH*'nin kendisi yoğun menekşe rengindedir (alkollü çözeltilerde 515–520 nm), ancak indirgenmiş muadili 2,2-difenil-1-pikrilhidrazin (DPPH-H) turuncu-sarı bir renk verir (İslam ve diğ., 2020).



Şekil 3.7: DPPH radikali renk değişimi.

Saf ve kombine ürünlerin serbest radikal süpürme aktivitelerinin test edilmesi için 0.2 mM DPPH çözeltisi hazırlandı. Referans olarak askorbik asit ve kör örnek (su ve DMSO) kullanıldı. Askorbik asit konsantrasyonları 1000 µg/mL, 500 µg/mL, 250 µg/mL, 100 µg/mL,

10 µg/mL ve 1 µg/mL olacak şekilde hazırlandı. 96 kuyucuklu pleytlerin kuyucuklarına 40 µL saf, kombine ürünler ve standart konulduktan sonra üzerlerine 160 µL DPPH eklendi. Pleytler karanlık ortamda 10 dakika bekletildi ve 517 nm’de absorbans ölçümleri yapıldı. Deneyler üç tekrarlı olacak şekilde gerçekleştirildi ve ortalamaları alındı.

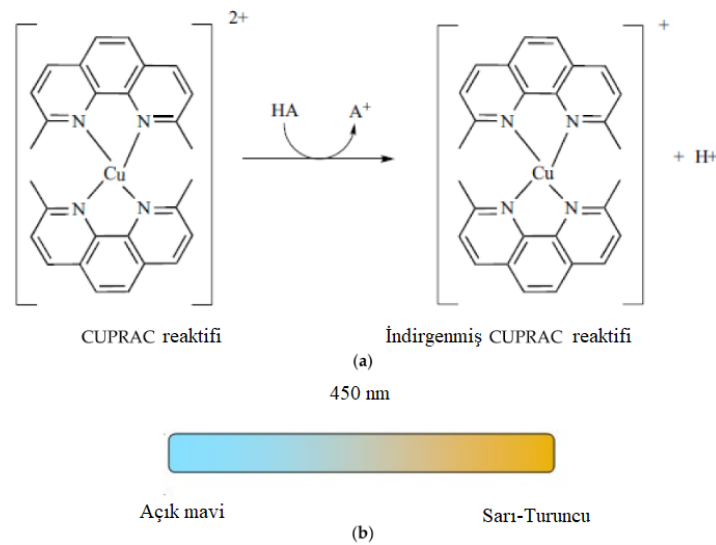
$$(\%)İnhibisyon = [1 - (\frac{A_1}{A_0})] \times 100 \quad (3.2)$$

A₁: Örnek absorbansı

A₀: Kör örnek absorbansı

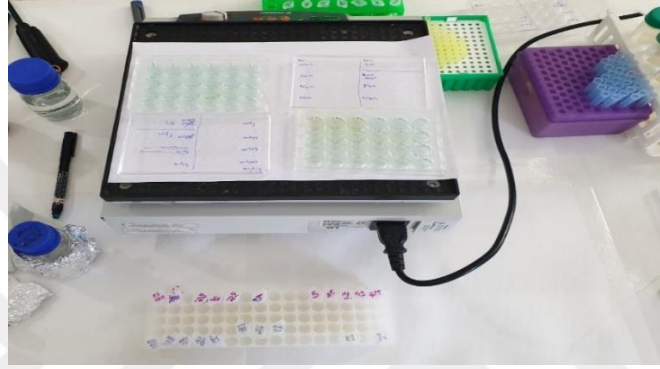
3.4.2.2. Bakır (II) İyonu İndirgeyici Antioksidan Kapasite Tayini

Toplam antioksidan kapasiteyi belirlemek için CUPRAC analizi ilk olarak Apak ve diğ. (2004) tarafından tasarlandı. Geliştirilen bu yöntemde bakır (II)-neokuproin (2,9-dimetil-1,10-fenantrolin) reaktifi, suda veya yağda çözünen antioksidan bileşikleri okside edebilmektedir, kendisi renkli bakır(I)-neokuproin şelat kompleksine indirgenmiştir (Apak ve diğ., 2008). CUPRAC yöntemi pH 7’de antioksidan kapasiteyi ölçer, böylece bu antioksidanların fizyolojik etkisini daha iyi simüle eder. Yöntem esasen sulu CuCl₂, amonyum asetat (NH₄Ac) tamponu (pH 7) ve alkollü neokuproin (Nc) çözeltilerinin karıştırılması, bu karışıma bilinmeyen antioksidan çözeltinin uygun bir alikotunun eklenmesi ve 30 dk 450 nm’de bir a’ya karşı absorbansın okunmasıyla uygulanmaktadır (Özyürek ve diğ., 2011).



Şekil 3.8: Kuprik indirgeyici antioksidan kapasite (CUPRAC) analizinde yer alan reaksiyon şeması. (a) HA, bir antioksidan molekülü ve A⁺ oksitlenmiş bir antioksidan molekülü Analizdeki renk değişimini (b) temsil eder.

Saf ve kombine ürünlerin bakır iyonunu indirgeme yeteneğini belirlemek için CUPRAC yöntemi kullanıldı. 24 kuyucuklu pleytlere bir çalkalayıcı üzerinde Şekil 3.9'da gösterildiği gibi sırasıyla 250 μL CuCl_2 (1×10^{-2} M), 250 μL neokuproin (7.5×10^{-3} M), 250 μL amonyum asetat (pH 7), 25 μL örnek ve 250 μL dH_2O konuldu. Standart olarak farklı konsantrasyonlarda troloks (TR 1×10^{-3} M) hazırlandı. Saf ve kombine ürünler, TR bütün kimyasallar eklendikten sonra 1 sa süresince oda koşullarında inkübe edildi ve daha sonra 450 nm'de absorbanslar okundu.



Şekil 3.9: CUPRAC deneyi.

Çalışmada saf ve kombine ürünlerin bakır (II) iyonu indirgeyici antioksidan kapasitesini hesaplamak için denklemi 3.3 kullanıldı. Denklemden yer alan bilgiler aşağıda sunulmuştur

$$TAC (mM TR) = A / \epsilon \times V_t / V_o \times S.f. \times V_e / m \quad 3.3$$

A: 450 nm'de ölçülen örnek absorbansı

ϵ : TR bileşiğinin CUPRAC yöntemindeki molar absorpsiyon katsayısı ($16.700 \text{ L mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$)

V_t : CUPRAC ölçüm çözeltisinin toplam hacmi (mL)

V_o : Örnek hacmi (mL)

S.f.: Seyreltme faktörü

V_e : Hazırlanan ekstrenin hacmi (mL)

m: Ekstraksiyon işleminde alınan örnek miktarı (g)

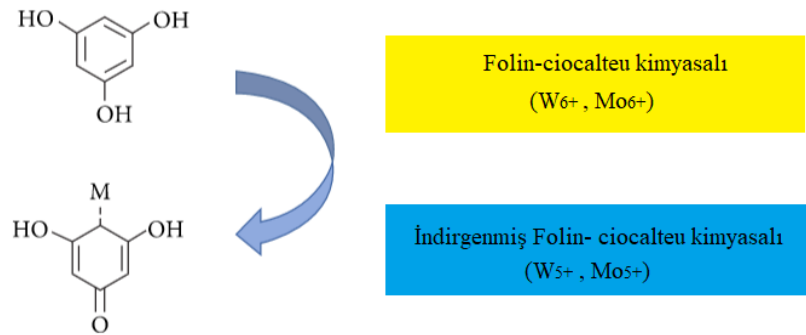
3.4.2.3. Toplam Fenolik Madde Tayini (TPC)

Folin-Ciocalteu testi, toplam fenolik içeriği (TPC) belirlemeyi amaçlayan iyi bilinen bir yöntemdir. Bitki kaynaklı gıdalar ve biyolojik numunelerdeki toplam polifenolik içeriği ölçmek için klinik ve beslenme çalışmalarında yaygın olarak kullanılmaktadır (Munteanu ve Apetrei, 2021). Bu yöntem başlangıçta proteinleri analiz etmek için tasarlanmış, daha sonra şaraptaki fenolik bileşenleri analiz etmek için Singleton ve diğ., (1999) tarafından

benimsenmiştir. Folin-Ciocalteu testi SET tabanlı bir testtir ve fenolik antioksidanların indirgeme gücü ile ilişkilidir. Gallik asit yaygın olarak kullanılan referans standarttır ve TPC sonuçları genellikle Gallik asit eşdeğeri olarak ifade edilir. Bununla birlikte, TPC sonuçları bazen kateşinler, kafeik asit, klorojenik asit veya ferrulik asidin eşdeğeri olarak da ifade edilmektedir (Karadag ve diğ., 2009). TPC ölçümü için Folin-Ciocalteu testinin basitlik, tekrarlanabilirlik ve sağlamlık dahil olmak üzere çok sayıda avantajı bulunmaktadır. Bununla birlikte pH, sıcaklık ve reaksiyon süresi gibi bazı dezavantajları vardır ve bu nedenle tutarlı ve güvenilir sonuçlar için reaksiyon durumunu doğru bir şekilde seçmek gerekir (Blasco ve diğ., 2005). FC reaktifi bir antioksidana maruz kaldığında, spektrofotometri ile ölçülebilen mavi bir komplekse indirgenir. Reaktifin tam bileşimi yayınlanmamıştır, ancak bir heteropoliasit, fosfomolibden ve fosfotungstik asit karışımından oluştuğu bildirilmiştir (Platzer ve diğ., 2021).

Analizde Sodyum karbonat (Na_2CO_3), fenoliklerin FC reaktifi ile uygun reaksiyonu için optimum bir pH değeri (en az 10) sağlayan alkalidir. Bu temel koşul, FC analizinde ideal sonuç için gereklidir; bu kriteri sağlayan fenolat iyon grupları oluşturulur ve bu da FC reaktifindeki asidik bileşenlerin indirgenmesine yol açmaktadır. Reaksiyona giren asitler, reaksiyona giren fenolik grupların sayısına bağlı olarak başlangıçtaki açık sarıdan mavi renge (indirgenmiş durum) farklı yoğunlukta değişir (Sánchez-Rangel ve diğ., 2013).

Şekil 3. 10' da Tungsten (W) ve molibden (Mo) elementlerinin +5'lik bir iyonik forma indirgendiği ve fenolik halkanın oksitlendiği redoks reaksiyonunu vurgulayarak FC kimyasal süreci özetlenmektedir. Fenolik bileşiklerin varlığı, Mo^{6+} 'nın Mo^{5+} 'ya indirgenme derecesine göre çözeltinin mavi bir renk vermesine göre 765 nm'de spektroskopik olarak ölçülmektedir (Carmona-Hernandez ve diğ., 2021).



Şekil 3.10: Folin-ciocalteu kimyasalı renk değişimi (Carmona-Hernandez ve diğ., 2021).

Folin-Ciocalteu analizi için hazırlanan saf ve kombine ürünlerin iki farklı dozları seçilerek her örnekten 100 μL olacak şekilde 1.5 mL'lik eppendorf tüplere kondu. Üzerlerine sırasıyla 50 μL Folin-Ciocalteu reaktifi, 300 μL Na_2CO_3 (200 g/L) ve 550 μL distile su eklenerek vorteks yapıldı. Devamında örnekler 1250xg'de 5 dk süresince santrifüjlendi ve elde edilen süpernatantlardan 200 μL alınarak 96 kuyucuklu pleytlere aktarıldı ve örneklerin absorbans ölçümü 765 nm'de yapıldı. Standart olarak farklı konsantrasyonlarda hazırlanan gallik asit (GA) standardı kullanıldı. Saf ve kombine ürünlerin total fenolik içerikleri, GA standartının konsantrasyon değerleri ile absorbansları arasında çizilen grafiğin eğri denklemi yardımıyla mg GAE/ 100 g olarak hesaplandı.

3.4.2.4. Toplam Flavonoid Tayini (TFC)

Bitkilerde ve gıdalarda toplam flavonoid içeriğinin (TFC) belirlenmesi için yaygın olarak kullanılan yöntemlerden biri, Al (III)'ün bir kompleks oluşturucu olarak kullanıldığı alüminyum klorür kolorimetrik deneydir. Analiz ilk olarak 1960 yılında Christ ve Muller tarafından ilaçlardaki flavonol türevlerinin tayini için kullanılmıştır.

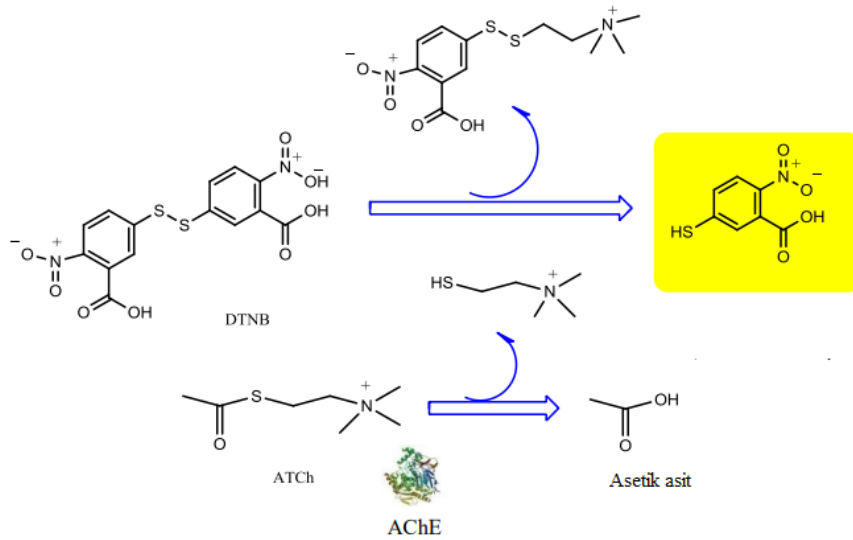
TFC içeriği genellikle, kullanılan reaktiflere bağlı olarak 400 ve 550 nm arasındaki bir absorpsiyon dalga boyunda NaNO_2 (bir nitrasyon maddesi) olmadan veya NaNO_2 ile AlCl_3 kolorimetrik deney kullanılarak belirlenmektedir. AlCl_3 ve sodyum veya potasyum asetat kullanımı da birçok araştırmada rapor edilmiştir. Deneyisel olarak, NaNO_2 yokluğunda AlCl_3 eklenmesi üzerine, sarı renkli Al (III)-flavonoid kompleksleri oluşur ve daha sonra 410-440 nm aralığında belirli bir dalga boyunda absorbansları ölçülür. 510 nm bandı ise genellikle NaNO_2 varlığında AlCl_3 kullanıldığında tercih edilir. TFC, aynı deneySEL koşullarda ve dalga boyunda ölçülen bir referans flavonoid standardına dayalı kalibrasyon eğrilerinden hesaplanmaktadır. En çok kullanılan flavonoid standartları arasında kersetin, kateşin ve rutin bulunmaktadır (Shraim ve diğ., 2021).

TFC analizi için hazırlanan saf ve kombine ürünlerin iki farklı dozları seçilerek her örnekten 100 μL olacak şekilde 1.5 mL'lik eppendorf tüplere kondu ve üzerine 400 μL distile su eklendi. Sonrasında üzerine 30 μL (%5 (w/v)'lik NaNO_2 çözeltisinden eklenerek 5 dk süresince bekletildi. Karışım vorteks yapıldıktan sonra üzerine 30 μL %10 (w/v)'luk AlCl_3 çözeltisinden eklendi ve 1 dakika inkübasyon süresinden sonra 200 μL 1 M NaOH ilave edildi. Toplam hacim 1 mL olacak şekilde 140 μL dH_2O eklenerek 510 nm'de absorbans

ölçümü yapıldı. Standart olarak farklı konsantrasyonlarda hazırlanan kateşin standardı kullanıldı. Saf ve kombine ürünlerin TFC'si, kateşinin konsantrasyon değerleri ile absorbansları arasında çizilen grafiğin eğri denklemi yardımıyla mg CAE/ 100 g olarak hesaplandı.

3.4.3. *In Vitro* Anti-Asetilkolinesteraz Aktivite Testi

Asetilkolinesteraz (AChE), asetilkolin nörotransmitterini kolin ve asetik aside parçalamaktan sorumludur. Bu enzim, beyinde sinir bölgesine bağlı olarak farklı aktivite gösteren heterojen bir dağılım gösterir. AChE, Alzheimer hastalığında (AH) da ana terapötik hedeftir; bu enzimin inhibisyonuyla, kolinerjik sistem açıkları telafi edilmeye çalışılmaktadır (Pohanka, 2011). AChE enzim aktivitesini ölçümleyerek AChE inhibitörlerinin kapasitesini test etmek için kolorimetrik, spektrofotometrik, florometrik, radyometrik veya elektrokimyasal teknikler dahil olmak üzere çeşitli yaklaşımlar geliştirilmiştir. Bunlar arasında en sık kullanılan yöntem, ditiobisnitrobenzoat iyonu ile reaksiyona girdiğinde kolinesterazlar tarafından asetiltiokolin hidrolizinden üretilen tiyokolinden ortaya çıkan sarı renkli kompleksin 412 nm'de fotometrik olarak ölçülmesine dayanan Ellman yöntemidir (Şekil 3.11) (Rienda ve diğ., 2021).



Şekil 3. 11: Ellman yöntemine göre AChE aktivite analizi (Koyuncu ve diğ., 2019).

Çalışmada, saf ve kombine ürünlerin *in vitro* anti-asetilkolinesteraz aktivitesi Ellman spektrofotometrik metodu modifiye edilerek analiz edildi. Analizde 96 kuyucuklu

mikroplaklar kullanıldı. Kısaca, aktivite ölçümü için reaksiyona 140 µL Tris/HCl tamponu (1 M, pH: 8.0), farklı konsantrasyonlarda saf ve kombine ürün örnekleri ve AChE (500 br /mg protein) eklendi. Reaksiyonun inkübasyon sıcaklığı ve süresi 25°C'de 10 dakika olarak belirlendi. Son olarak reaksiyona asetilkolin iyodat (AChI) eklendi ve aktivite ölçümleri yapıldı. Saf ve kombine ürünlerin farklı konsantrasyonlarda hazırlanan örneklerinden 25'şer µL olacak şekilde her örnek 3 tekrar olacak şekilde kuyucuklara eklendi. AChE enziminden de tüm kuyucuklara 25 µL ilave edildikten sonra mikropleytler 10 dakika oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı. Son olarak tüm kuyucuklara sırasıyla 10 µL DTNB ve 10 µL asetiltiyokoliniyodür (0.4 mM) eklenerek 412 nm dalga boyunda ölçüm yapıldı. Saf ve kombine ürünlerin % AChE inhibisyonları Denklem (3.4) e göre hesaplandı. Standart madde olarak Donepezil (%10'luk DMSO içeren metanolde çözülerek hazırlanmış) kullanıldı (Camadan ve Akkemik, 2022).

$$\%Inhibisyon = 100 - \left[\left(\frac{A_1}{A_2}\right) \times 100\right] \quad (3.4)$$

A₁: Örnek absorbansı

A₂: Kontrol absorbansı

3.4.4. *İn Vitro* Bal Arısı Modeli

Bal arıları kolonileri 1-15 Temmuz 2022 tarihleri arasında Tekirdağ ili Süleymanpaşa ilçesinde bulunan bir arılıktan (Şekil 3.12 A) temin edildi. Langstroth tipi kovanlardan 60 koloni içerisinde rastgele 6 kız kardeş, aynı yaşta ana arıları olan, eşit güçte koloniler seçildi. 1 günlük yaşta işçi arı elde etmek için, çıkmak üzere pupalı petekler üzerindeki işçi arılar silkeleme işleminden sonra kovan içinde laboratuvara getirilerek Cho ve diğ. (2022)'de bildirilen 35°C ve %60 nemde bir gece bekletilmiştir. Ertesi gün çerçevelerden çıkan 1 günlük yaşta işçi arılar, ana arılar olmadan her grupta 75 adet işçi arı olmak üzere toplam 1125 adet işçi arı kafeslere aktararak, 35°C sıcaklık ve %60 nem ayarlı inkübatöre yerleştirilmiştir. Bütün gruplar petekten çıktıktan sonraki 3 gün boyunca %50'lik şeker şurubu ve su ile ad libitum olarak beslenmiştir (Rascon ve diğ., 2012).



Şekil 3.12: A. Kolonilerin seçildiği arılık; B. Arı kafesleri; C. Arı besleme tüpleri.

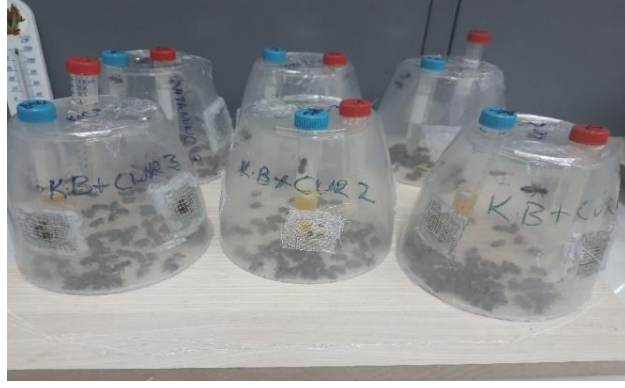
Deney için boyutu 14x13x8.3 cm olup hacmi 1.5 lt olan kafesler kullanılmıştır (Şekil 3.12 B). Kafeslerin geniş kısmı zemine gelecek şekilde ters çevrilmiştir ve yan havalandırma delikleri sinek teli ve silikon yardımıyla kapatılmıştır. Deney gruplarına göre besleme yapabilmek için 15 mL falkon tüplerine 5 mL seviyesinden beslenme deliği açılıp besleme tüpleri (Şekil 3.12 C) kafeslerin üst kısmından yerleştirilmiştir (Oskay, 2021).



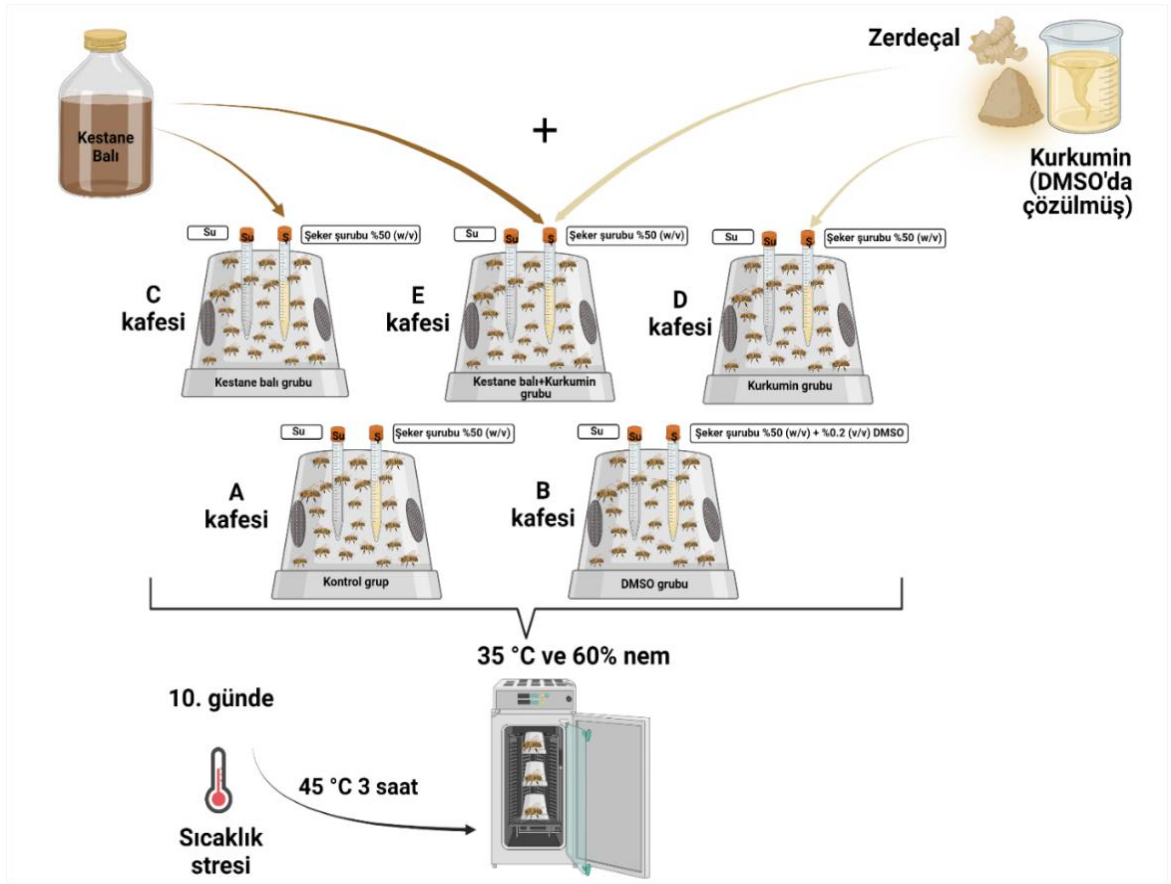
Şekil 3.13: Bir günlük yaştaki işçi arılar ve kafeslere aktarımı.

Deney gruplarının oluşturulması

Çalışmamızda 4. gün tüm gruplar aşağıda belirtildiği şekilde beslenmeye başlanmış ve yaşam uzunluğu deneyi süresince bu şekilde beslenmeye devam edilmiştir. Deneyde 5 grup bulunmaktadır. Tüm deneyler 3 tekrarlı olmak üzere gerçekleştirilmiştir. Deneyin 10. gününde inkübatörün sıcaklığı 45 °C'ye ayarlanmış ve kafesler 3 saat süresince bu sıcaklıkta bekletilmiştir. Isı şoku sıcaklığı ve süresi, farklı çalışmalar göz önünde bulundurularak seçilmiştir (Alqarni ve diğ., 2019; Shih ve diğ., 2021; Zhao ve diğ., 2021; Al-Ghzawi ve diğ., 2022). Sonrasında sıcaklık 35°C'ye düşürülerek besleme yapılmaya devam edilmiştir.



Şekil 3.14: Besleme kafesleri.



- **Kontrol grubu:** Kafesteki işçi arılar 5 mL %50 (ağırlık/hacim) şeker şurubu ve 5 mL su ile beslenmiştir (Williams ve diğ., 2013).
- **DMSO grubu:** Kurkumin için çözücü dimetil sülfoksit (DMSO) kullanıldığından, %50'lik şeker şurubuna Chen ve diğ., (2021) %0.2 (hacim/hacim) DMSO ilave edilerek her gün 5 mL olacak şekilde arılara verilmiştir.

- **Kestane balı grubu:** Ana stok kestane balı %40 (hacim/hacim) olacak şekilde dH₂O'da çözülerek hazırlanmış ve %50'lik şeker şurubuna %0.25 (hacim/hacim) kestane balı ilave edilerek her gün 5 mL olacak şekilde arılara verilmiştir.
- **Kurkumin grubu:** Kurkumin (Sigma-Aldrich, ≥65%) Ana stok 100 mM olarak DMSO'da çözülerek hazırlanmıştır. %50'lik şeker şurubuna 10 µM kurkumin ilave edilerek her gün 5 mL olacak şekilde arılara verilmiştir.
- **Kestane Balı + Kurkumin grubu:** gruplarda tarif edilen şekilde hazırlanan kestane balı ve kurkumin 1/1 oranda karıştırılarak her gün 5 mL olacak şekilde arılara verilmiştir.

3.5. İSTATİSTİK ANALİZLER

Deneysel veriler, GraphPad Prism yazılım programı (GraphPad Prism version 7.0, GraphPad Software, San Diego California USA, Anonim-c) kullanılarak kontrole ve birbirlerine göre istatistiksel açıdan değerlendirildi. Bu amaçla elde edilen verilere tek yönlü ANOVA testi uygulandı. Grupların kontrol grubuna göre anlamlılıkları Dunnett's testi ile değerlendirildi. Anlamlılık değeri olarak $p < 0.05$ olarak alındı.

Hayatta kalma analizi Kaplan-Meier yöntemi kullanılarak yapıldı ve istatistiksel anlamlılık bir log-rank (Mantel-Cox) testi ile analiz edildi. Canlı vücut ağırlığı ölçümleri için her gruptan 15 canlı işçi arı rastgele seçilmiştir. Veriler, her grup için ortalama $\pm$ standart sapma (SD) olarak sunuldu. İstatistiksel analiz, tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ve ardından çoklu karşılaştırmalar için Tukey post hoc testi ile yapıldı. Anlamlı farklılıklar istatistiksel olarak $p < 0.05$ düzeyinde kabul edildi.

4. BULGULAR

4.1. SAF VE KOMBİNE ÜRÜNLERİN NIH3T3 FİBROBLAST HÜCRE CANLILIĞI ÜZERİNE ETKİLERİ

4.1.1. Bal Arısı Ürünlerinin Hücre Canlılığına Etkileri

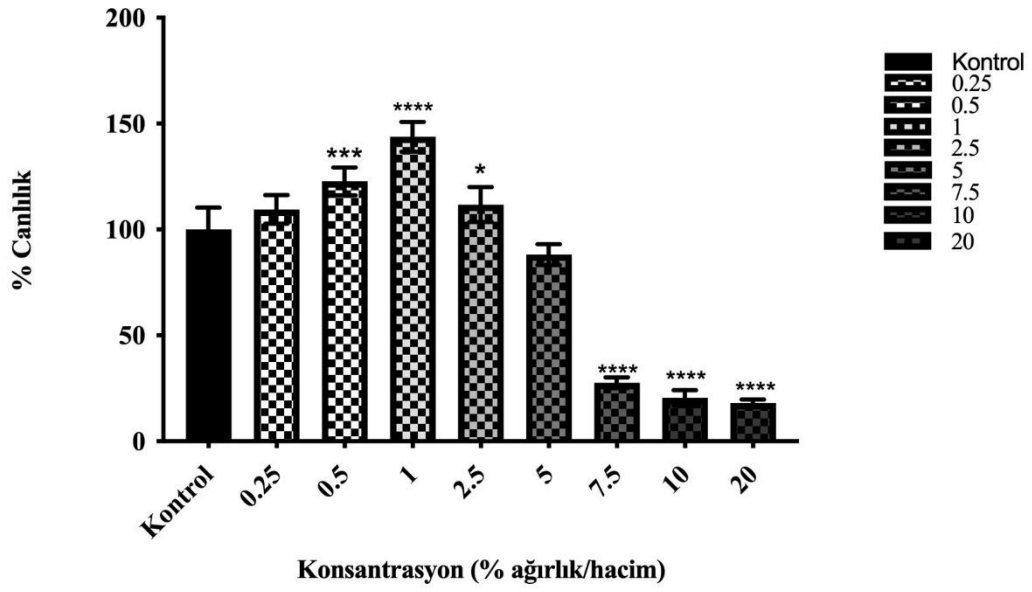
Bal arısı ürünü olarak kombinasyonda yer alan tüm bileşenlerin (kestane balı, kestane poleni, arı sürü ve apilarnilin) NIH3T3 fibroblast hücre canlılığı üzerine etkisi incelendi ve bulgular ayrı başlıklar altında verildi.

4.1.1.1. Kestane Balının Hücre Canlılığına Etkisi

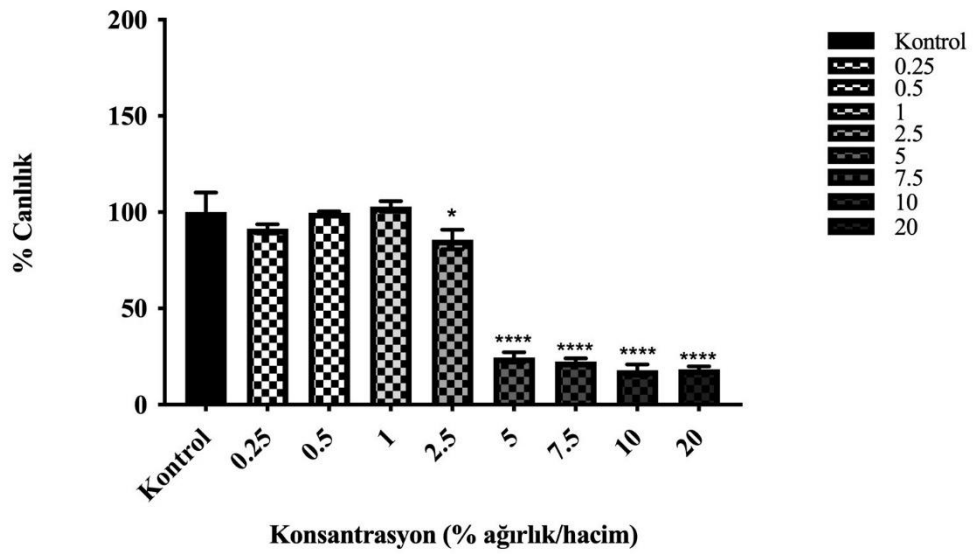
Kestane balının NIH3T3 hücreleri üzerindeki sitotoksik etkilerini belirlemek amacıyla 24, 48 ve 72 saatlik kültürlere 0 (kontrol grubunu temsil etmektedir), 0.25, 0.5, 1, 2.5, 5, 7.5, 10, 20 (% ağırlık/hacim (w/v)) konsantrasyonlarında kestane balı içeren besiyerleri uygulandı. MTT analizi sonucu elde edilen veriler Şekil 4.1, 4.2 ve 4.3' de gösterilmiştir.

NIH3T3 hücre hattı için kestane balının %1'lik (w/v) dozunun istatistiksel açıdan anlamlı, proliferatif etki gösterdiği saptandı (**** $p < 0.0001$). Kestane balının %1 (w/v)'lik dozunun NIH3T3 hücrelerinin canlılığını 43.8 ± 7.07 artırdığı bulundu. Kestane balının %7.5, 10 ve 20'lik (w/v) dozlarının 24 saatlik NIH3T3 hücrelerinin canlılıklarını kontrol grubuna göre sırasıyla 72.32 ± 2.54 , 79.54 ± 3.73 ve 81.85 ± 1.67 düşürdüğü bulundu (**** $p < 0.0001$).

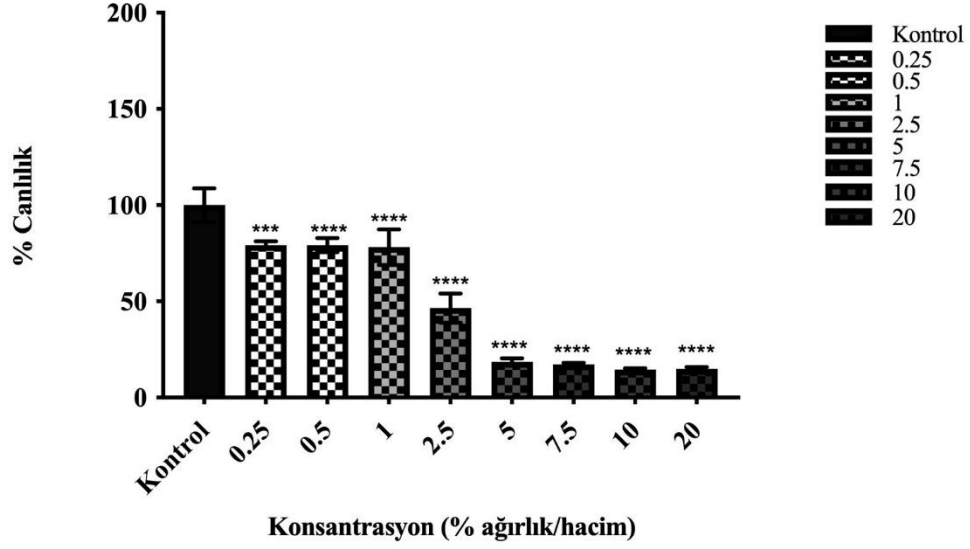
Bu verilere göre, KB'nın NIH3T3 hücreleri üzerinde herhangi bir toksik ya da proliferatif etki göstermeyen Şekil 4.1'de belirtilen en yüksek dozu (%0.25) kombinasyon çalışmaları için seçildi.



Şekil 4.1: Kestane balının (KB) 24 saatte NIH3T3 hücrelerinin canlılığı üzerine etkisi.



Şekil 4.2: Kestane balının (KB) 48 saatte NIH3T3 hücrelerinin canlılığı üzerine etkisi.



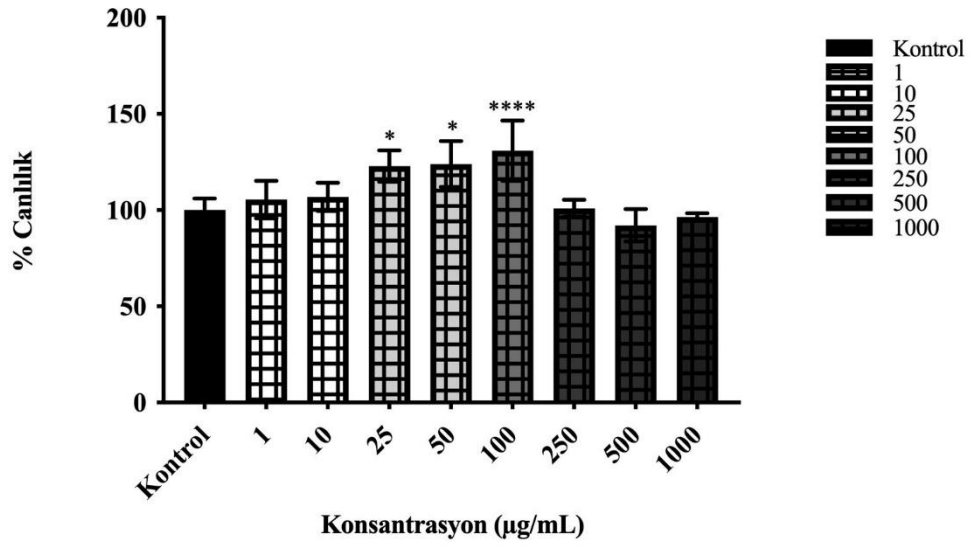
Şekil 4.3: Kestane balının (KB) 72 saatte NIH3T3 hücrelerinin canlılığı üzerine etkisi.

4.1.1.2. Kestane Polen Metanol Ekstresinin Hücre Canlılığına Etkisi

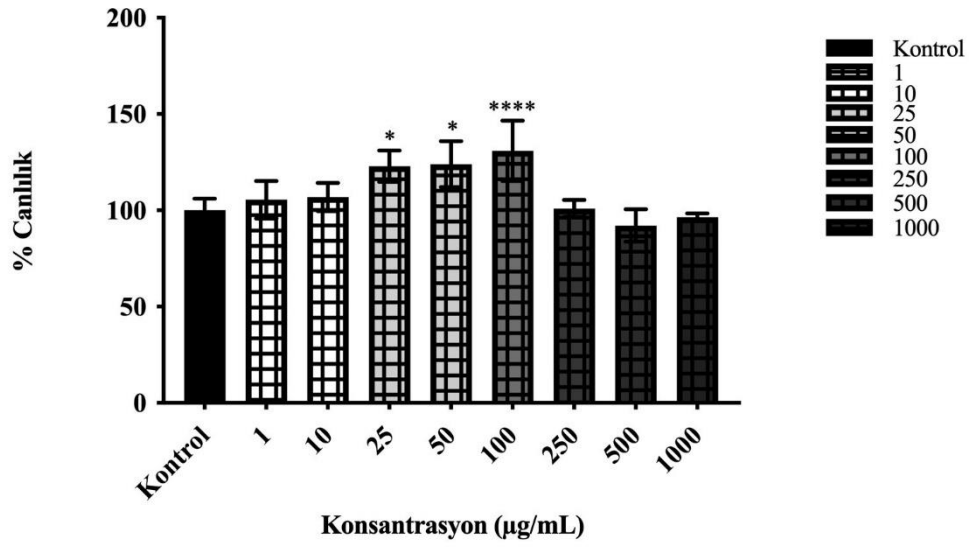
Kestane poleni metanol ekstresinin (KPmet) NIH3T3 hücreleri üzerindeki sitotoksik etkilerini belirlemek amacıyla 24, 48 ve 72 saatlik kültürlere 0 (kontrol grubunu temsil etmektedir), 1, 10, 25, 50, 100, 250, 500 ve 1000 $\mu\text{g/mL}$ konsantrasyonlarında KPmet içeren besiyerleri uygulandı. MTT analizi sonucu elde edilen veriler Şekil 4.3, 4.4 ve 4.5’ de verilmiştir.

KPmet 100 $\mu\text{g/mL}$ ’lik dozunun 24 saatte NIH3T3 hücrelerinin canlılığını kontrol grubuna göre 30.9 ± 15.64 artırdığı belirlendi ($****p < 0.0001$). Bununla birlikte KPmet’in 25 ve 50 $\mu\text{g/mL}$ ’lik dozlarının kontrol grubuna göre istatistiksel açıdan anlamlı ($*p < 0.05$) proliferatif etki gösterdiği bulundu. Uygulanan diğer dozların (250, 500 ve 1000 $\mu\text{g/mL}$) 24 saatte bu hücrelerin canlılığı üzerinde istatistiksel açıdan anlamlı proliferatif ve/veya sitotoksik herhangi bir etkisinin olmadığı belirlendi ($p > 0.05$). KPmet’in 1, 10, 25, 50, 100 ve 250 $\mu\text{g/mL}$ ’lik dozlarının 72 saatte bu hücrelerin canlılığı üzerinde istatistiksel açıdan anlamlı proliferatif ve/veya sitotoksik herhangi bir etki göstermediği belirlendi ($p > 0.05$).

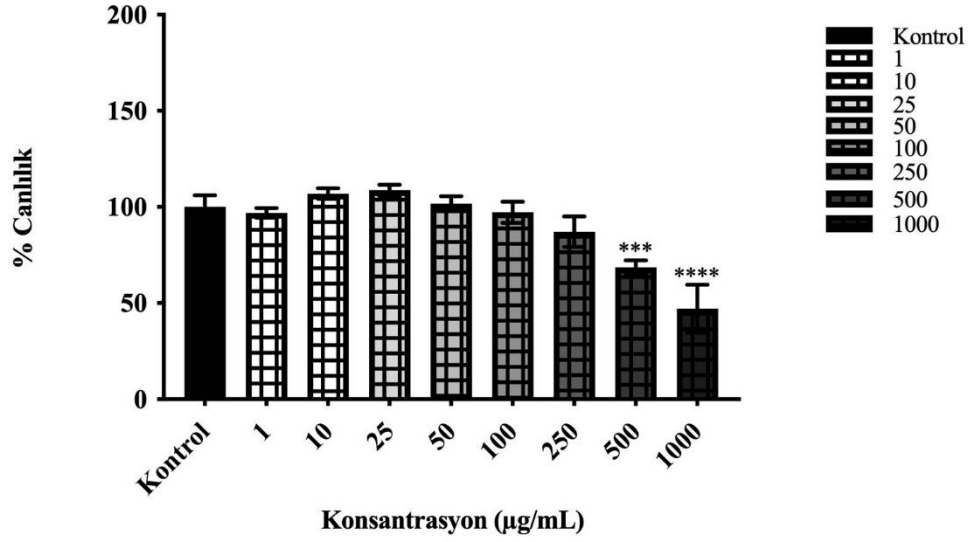
Bu verilere göre KPmet’in NIH3T3 hücreleri üzerinde herhangi bir toksik ya da proliferatif etki göstermeyen Şekil 4.4 ve Şekil 4.5’de belirtilen en yüksek dozu (10 $\mu\text{g/mL}$) kombinasyon çalışmaları için seçildi.



Şekil 4.4: Kestane poleni metanol ekstresinin (KPmet) 24 saatte NIH3T3 hücrelerinin canlılığı üzerine etkisi.



Şekil 4.5: Kestane poleni metanol ekstresinin (KPmet) 48 saatte NIH3T3 hücrelerinin canlılığı üzerine etkisi.



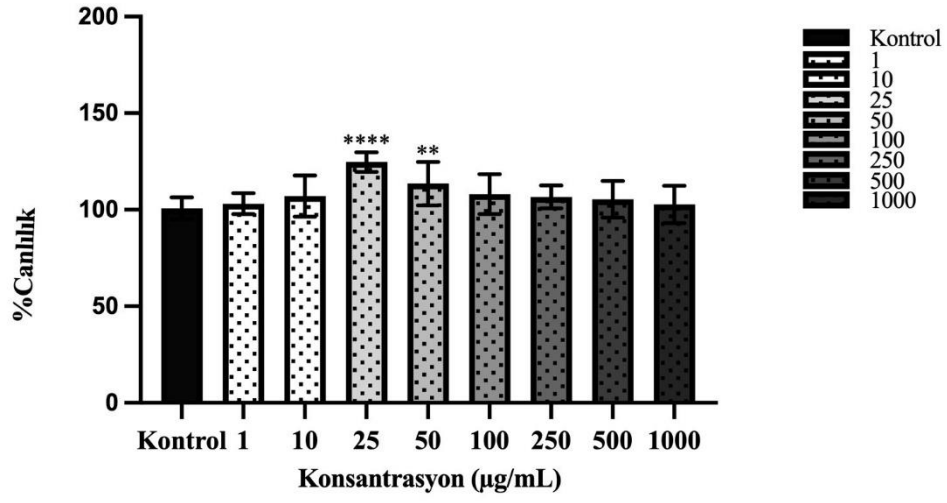
Şekil 4.6: Kestane poleni metanol ekstresinin (KPMet) 72 saatte NIH3T3 hücrelerinin canlılığı üzerine etkisi.

4.1.1.3. Arı Sütünün Hücre Canlılığına Etkisi

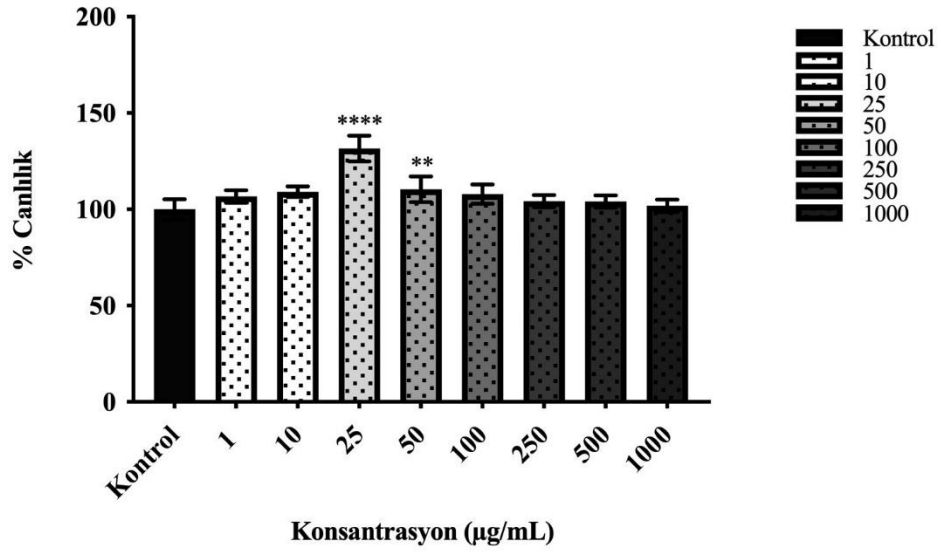
Arı sütünün (RJ) NIH3T3 hücreleri üzerindeki sitotoksik etkilerini belirlemek amacıyla 24, 48 ve 72 saatlik kültürlere 0 (kontrol grubunu temsil etmektedir), 1, 10, 25, 50, 100, 250, 500 ve 1000 µg/mL konsantrasyonlarında arı sütü içeren besiyerleri uygulandı. MTT analizi sonucu elde edilen veriler Şekil 4.7, 4.8 ve 4.9’ da verilmiştir.

Arı sütünün 25 µg/mL’lik dozunun kontrol grubuna göre NIH3T3 hücrelerinin canlılığını 24.7 ± 5.05 ($****p < 0.0001$), 50 µg/mL’lik dozunun ise 13.5 ± 11.25 artırdığı bulundu ($**p < 0.01$). Arı sütünün 25 µg/mL ve 50 µg/mL’lik dozlarının 24 saatte hücre canlılığı üzerindeki etkileri karşılaştırıldığında aradaki fark istatistiksel açıdan anlamlı bulundu ($\#p < 0.05$). Uygulanan tüm dozların 72 saatte kontrol grubuna göre bu hücrelerin canlılığı üzerinde istatistiksel açıdan anlamlı proliferatif ve/veya sitotoksik herhangi bir etkisinin olmadığı belirlendi ($p > 0.05$).

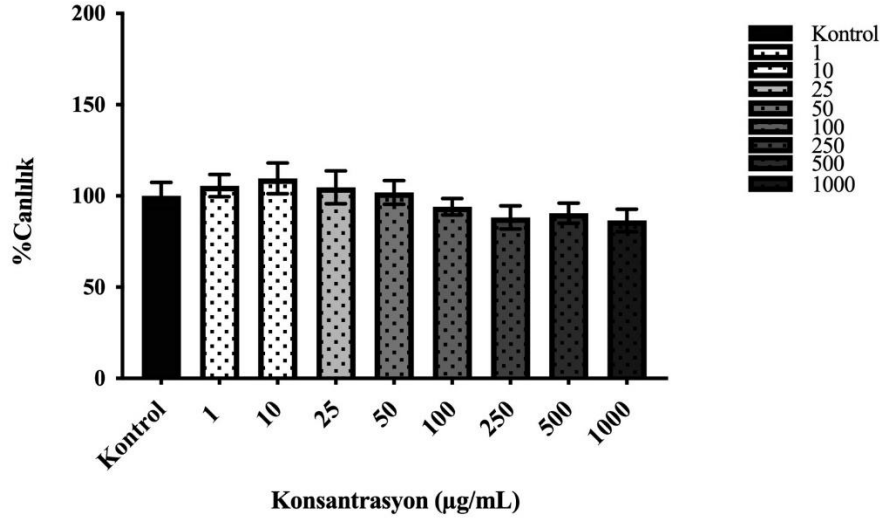
Bu verilere göre, RJ’nin NIH3T3 hücreleri üzerinde herhangi bir toksik ya da proliferatif etki göstermeyen Şekil 4.7 ve 4.8’de belirtilen en yüksek dozu (10 µg/mL) kombinasyon çalışmaları için seçildi.



Şekil 4.7: Arı sütünü (RJ) 24 saatte NIH3T3 hücrelerinin canlılığı üzerine etkisi.



Şekil 4.8: Arı sütünü (RJ) 48 saatte NIH3T3 hücrelerinin canlılığı üzerine etkisi.



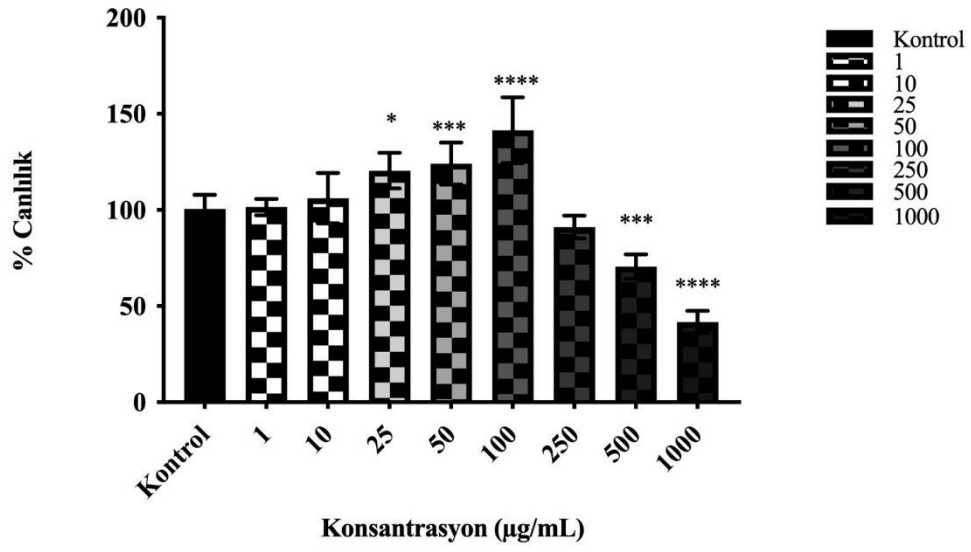
Şekil 4.9: Arı sütünün (RJ) 72 saatte NIH3T3 hücrelerinin canlılığı üzerine etkisi.

4.1.1.4. Apilarnil Metanol Ekstresinin Hücre Canlılığına Etkisi

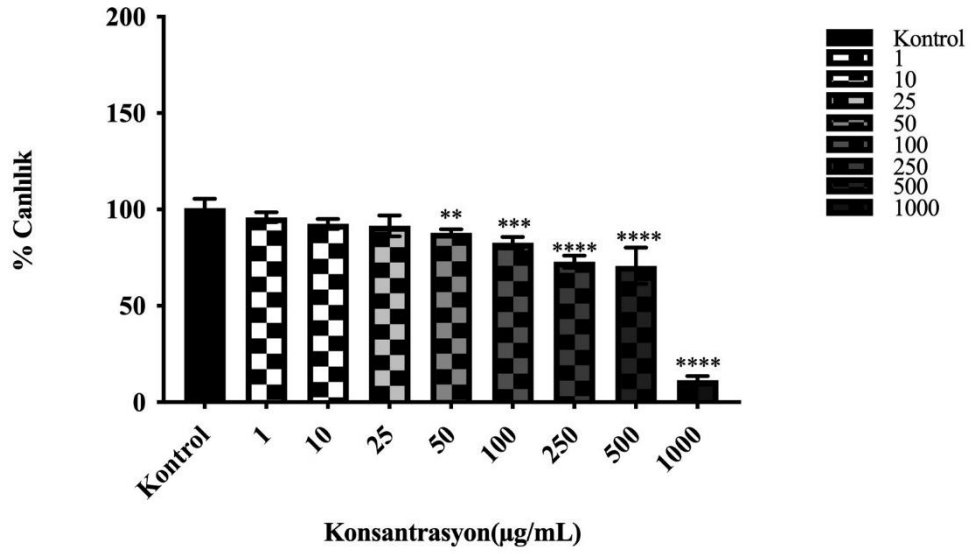
Apilarnil metanol ekstresinin (APLmet) NIH3T3 hücreleri üzerindeki sitotoksik etkilerini belirlemek amacıyla 24, 48 ve 72 saatlik kültürlere 0 (kontrol grubunu temsil etmektedir), 1, 10, 25, 50, 100, 250, 500 ve 1000 µg/mL konsantrasyonlarında apilarnil içeren besiyerleri uygulandı. MTT analizi sonucu elde edilen veriler Şekil 4.10, 4.11 ve 4.12’ de verilmiştir.

APLmet’in 100 µg/mL’lik dozunun 24 saatte NIH3T3 hücrelerinin canlılığını kontrol grubuna göre 41.4 ± 17.09 artırdığı bulundu ($****p < 0.0001$). Uygulanan 500 ve 1000 µg/mL’lik dozların 72 saatte kontrol grubuna göre hücrelerin canlılığı üzerinde istatistiksel açıdan anlamlı sitotoksik etkileri olduğu belirlendi ($****p < 0.0001$). APLmet’in 1000 µg/mL’lik dozunun 24 saatte hücrelerin canlılığını 58.29 ± 5.85 azalttığı bulundu.

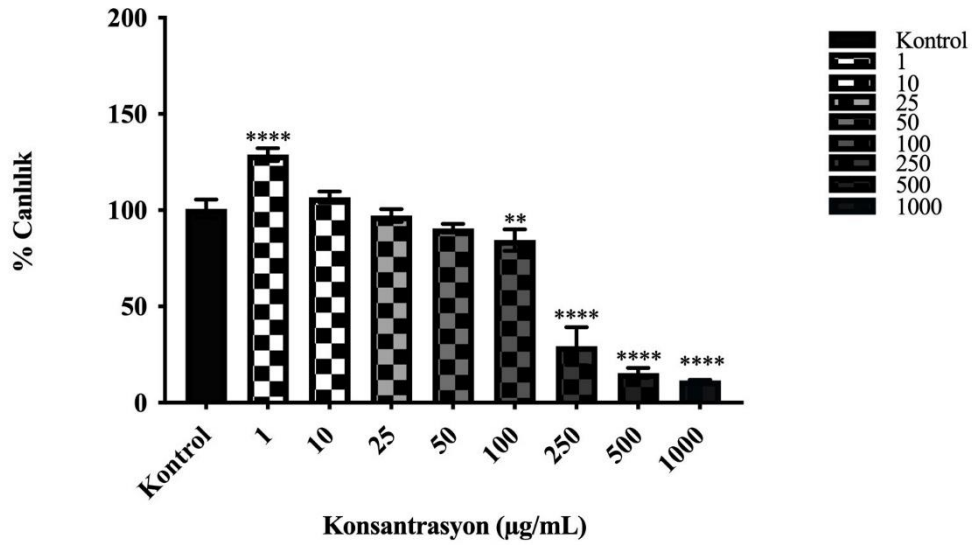
Bu verilere göre APLmet’in NIH3T3 hücreleri üzerinde herhangi bir toksik ya da proliferatif etki göstermeyen Şekil 4.10’da belirtilen en yüksek dozu (10 µg/mL) kombinasyon çalışmaları için seçildi.



Şekil 4.10: Apilarnil metanol ekstresinin (APLmet) 24 saatte NIH3T3 hücrelerinin canlılığı üzerine etkisi.



Şekil 4.11: Apilarnil metanol ekstresinin (APLmet) 48 saatte NIH3T3 hücrelerinin canlılığı üzerine etkisi.



Şekil 4.12: Apilarnil metanol ekstresinin (APLmet) 72 saatte NIH3T3 hücrelerinin canlılığı üzerine etkisi.

4.1.2. Fitokimyasalların NIH3T3 Hücrelerinin Canlılığı Üzerine Etkileri

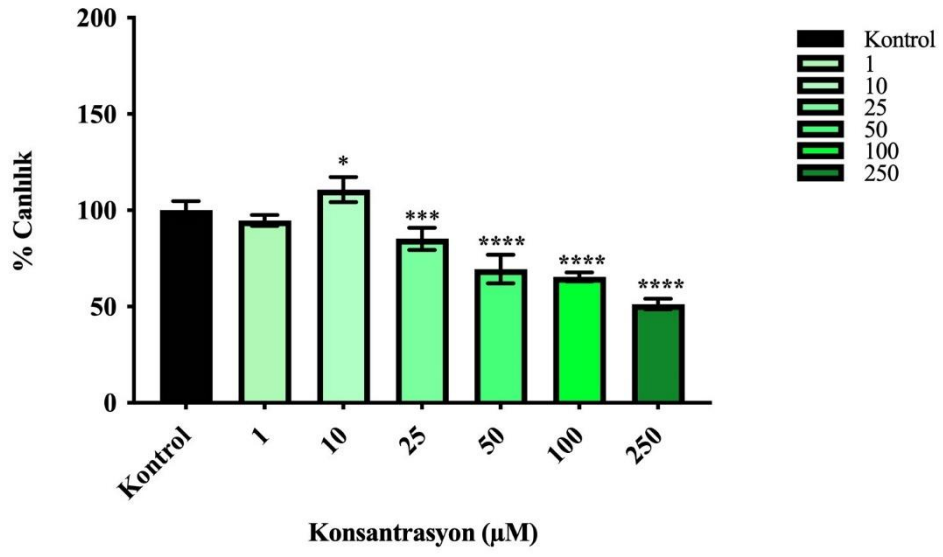
Fitokimyasal olarak kombinasyonda yer alan tüm bileşenlerin (kersetin, kurkumin ve rosmarinik asit) NIH3T3 fibroblast hücre canlılığı üzerine etkisi incelendi ve bulgular ayrı başlıklar altında verildi.

4.1.2.1. Kersetinin Hücre Canlılığına Etkisi

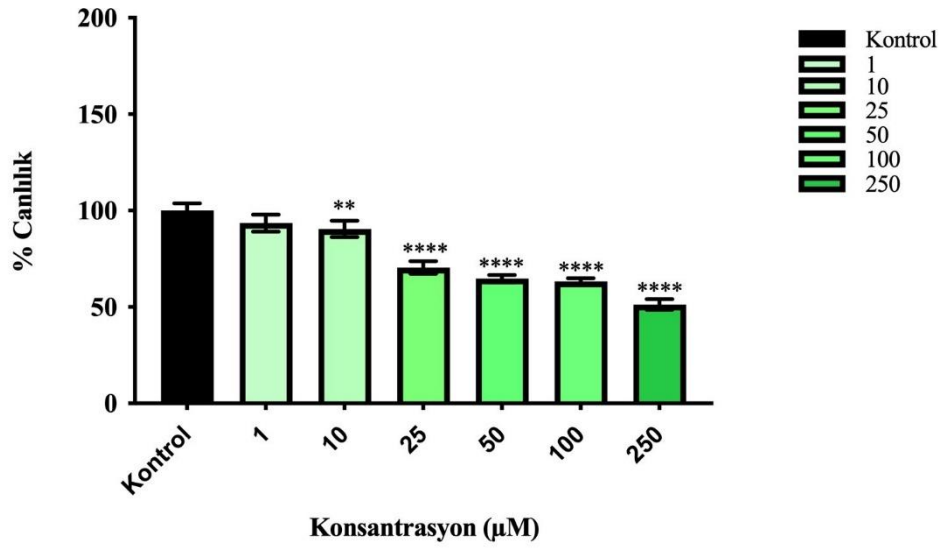
Kersetinin (KER) NIH3T3 hücreleri üzerindeki sitotoksik etkilerini belirlemek amacıyla 24, 48 ve 72 saatlik kültürlere 0 (kontrol grubunu temsil etmektedir), 1, 10, 25, 50, 100 ve 250 µM konsantrasyonlarında kersetin içeren besiyerleri uygulandı. MTT analizi sonucu elde edilen veriler Şekil 4.13, 4.14 ve 4.15’ de verildi.

KER’in 25, 50, 100, 250 µM’lık dozlarının 24, 48 ve 72 saatlik NIH3T3 hücre canlılığı üzerinde kontrole göre sitotoksik etki gösterdiği saptandı ($***p<0.001$ ve $****p<0.001$). NIH3T3 hücrelerine uygulanan 10 µM’lık kersetin dozunun kontrol grubuna göre hücre canlılığını 10.7 ± 6.47 artırdığı bulundu. Uygulanan en yüksek KER dozunun (250 µM) hücre canlılığını 24 saatin sonunda 48.69 ± 2.80 düşürdüğü belirlendi.

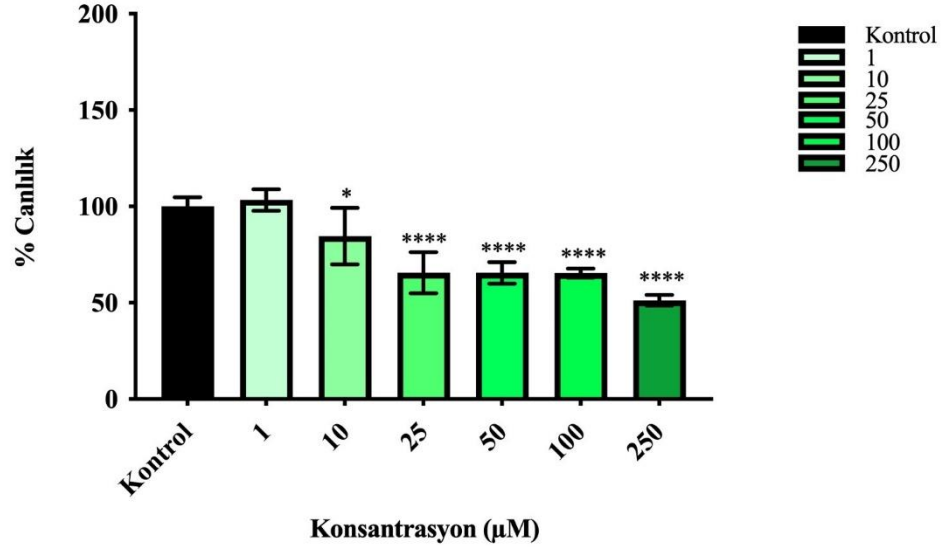
Bu verilere göre KER’in 24 saatte NIH3T3 hücreleri üzerinde kontrole yakın % canlılık gösteren 1- 25 µM aralığındaki 5 farklı dozu kombinasyon çalışmaları için seçildi.



Şekil 4.13: Kersetinin (KER) 24 saatte NIH3T3 hücrelerinin canlılığı üzerine etkisi.



Şekil 4.14: Kersetinin (KER) 48 saatte NIH3T3 hücrelerinin canlılığı üzerine etkisi.



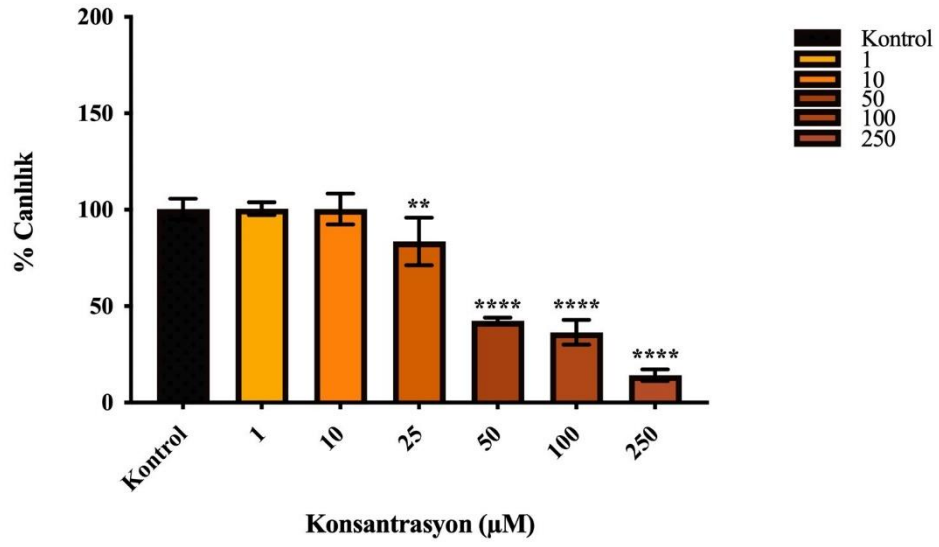
Şekil 4.15: Kersetinin (KER) 72 saatte NIH3T3 hücrelerinin canlılığı üzerine etkisi.

4.1.2.2. Kurkuminin Hücre Canlılığına Etkisi

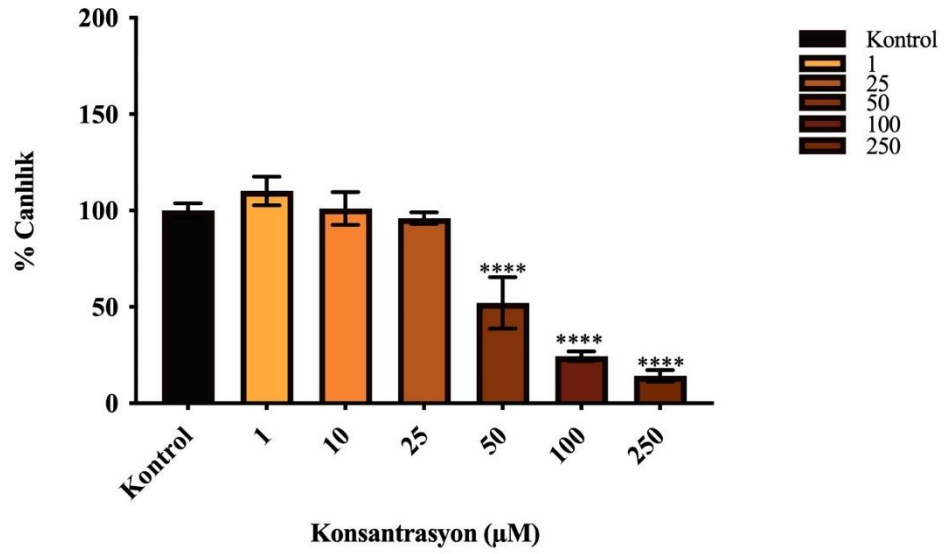
Kurkuminin (KUR) NIH3T3 hücreleri üzerindeki sitotoksik etkilerini belirlemek amacıyla, 24, 48 ve 72 saatlik kültürlere 0 (kontrol grubunu temsil etmektedir), 1, 10, 25, 50, 100 ve 250 µM konsantrasyonlarında kurkumin içeren besiyerleri uygulandı. MTT analizi sonucu elde edilen veriler Şekil 4.16, 4.17 ve 4.18’ de verildi.

KUR’un 25 µM’lık dozu NIH3T3 hücrelerinin canlılığını 24 saatte kontrol grubuna göre 16.36 ± 12.34 düşürdüğü tespit edildi. NIH3T3 hücrelerinde 24, 48 ve 72 saatlik IC_{50} değerleri sırasıyla 38.11 ± 5.03 , 39.15 ± 3.93 ve 38.68 ± 2.75 µM olarak bulundu. Kurkuminin 50, 100 ve 250 µM’lık dozlarının 24, 48 ve 72 saatte NIH3T3 hücreleri üzerinde istatistiksel açıdan anlamlı sitotoksik etki gösterdiği saptandı ($****p < 0.0001$). Uygulanan 1 ve 10 µM’lık kurkuminin 24 ve 48 saatte bu hücrelerin canlılığı üzerinde istatistiksel açıdan anlamlı proliferatif ve/veya sitotoksik herhangi bir etkisinin olmadığı belirlendi ($p > 0.05$).

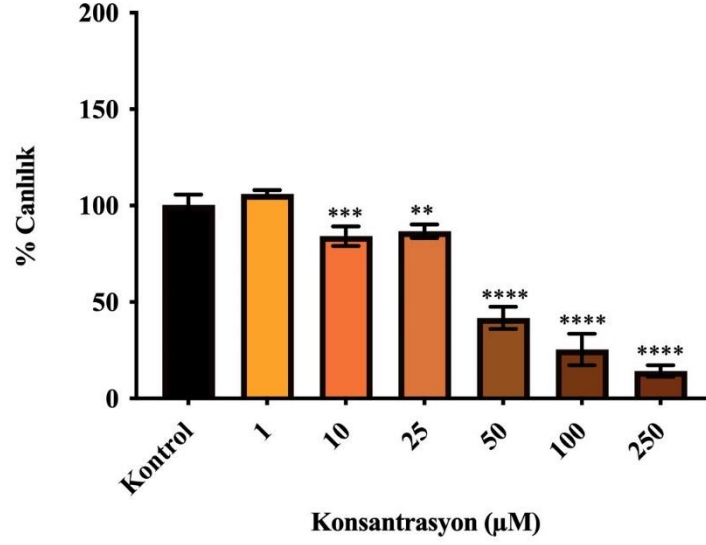
Bu verilere göre KUR’un NIH3T3 hücreleri üzerinde 24 saatte kontrole yakın % canlılık gösteren 1- 25 µM aralığındaki 5 farklı dozu kombinasyon çalışmaları için seçildi.



Şekil 4.16: Kurkuminin (KUR) 24 saatte NIH3T3 hücrelerinin canlılığı üzerine etkisi.



Şekil 4.17: Kurkuminin (KUR) 48 saatte NIH3T3 hücrelerinin canlılığı üzerine etkisi.



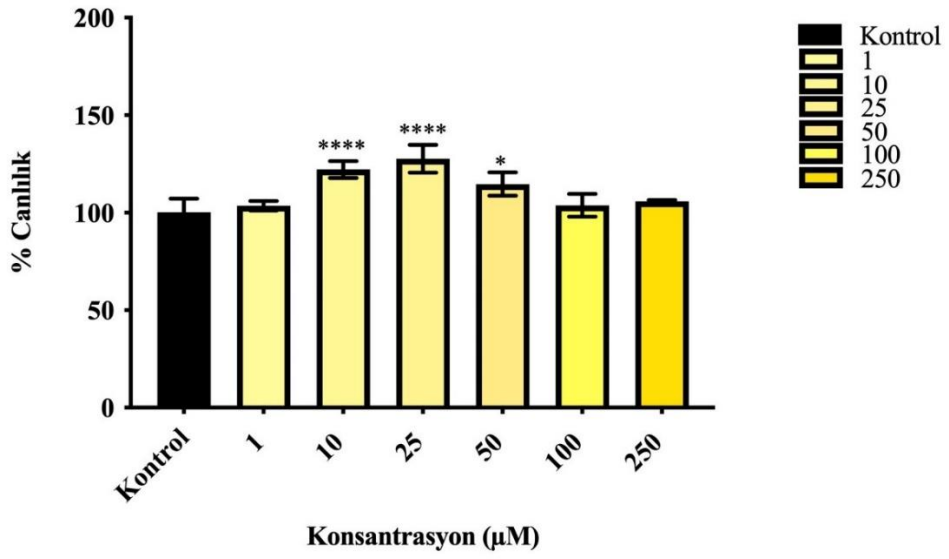
Şekil 4.18: Kurkuminin (KUR) 72 saatte NIH3T3 hücrelerinin canlılığı üzerine etkisi.

4.1.2.3. Rosmarinik Asitin Hücre Canlılığına Etkisi

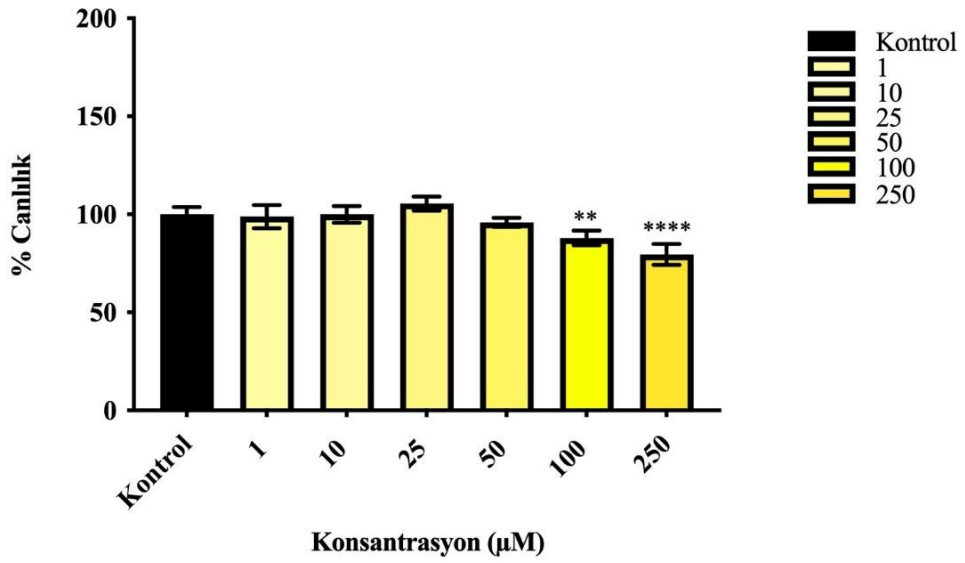
Rosmarinik asitin (ROS) NIH3T3 hücreleri üzerindeki sitotoksik etkilerini belirlemek amacıyla 24, 48 ve 72 saatlik kültürlere 0 (kontrol grubunu temsil etmektedir), 1, 10, 25, 50, 100 ve 250 µM konsantrasyonlarında rosmarinik asit içeren besiyerleri uygulandı. MTT analizi sonucu elde edilen veriler Şekil 4.19, 4.20 ve 4.21’ de verildi.

ROS’un 10 ve 25 µM’lık dozlarının NIH3T3 hücrelerinin canlılığı üzerinde istatistiksel açıdan anlamlı proliferatif etki gösterdiği saptandı ($***p<0.001$). Bu dozların 24 saatte NIH3T3 hücrelerinin canlılığını kontrol grubuna göre sırasıyla 22.1 ± 4.30 ve 27.7 ± 7.11 artırdığı tespit edildi. ROS’un 100 ve 250 µM’lık dozlarının 48 ve 72 saatte NIH3T3 hücrelerinin canlılığını sırasıyla 12.06 ± 3.74 ve 20.38 ± 5.29 düşürdüğü bulundu ($*P<0.05$ ve $****P<0.0001$) (Şekil 4.18 ve 4.19).

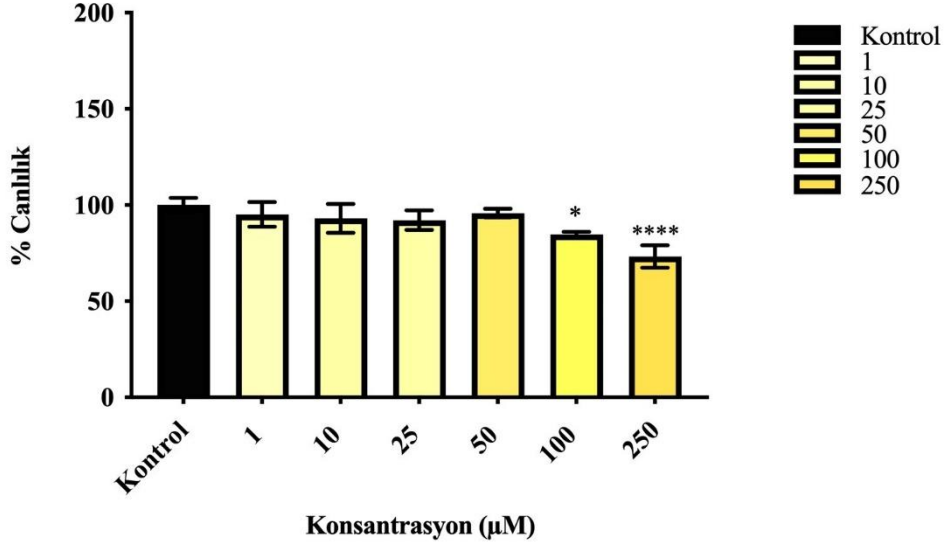
Bu verilere göre ROS’un NIH3T3 hücreleri üzerinde 24 saatte kontrole yakın % canlılık gösteren 1- 25 µM aralığındaki 5 farklı dozu kombinasyon çalışmaları için seçildi.



Şekil 4.19: Rosmarinik asitin (ROS) 24 saatte NIH3T3 hücrelerinin canlılığı üzerine etkisi.



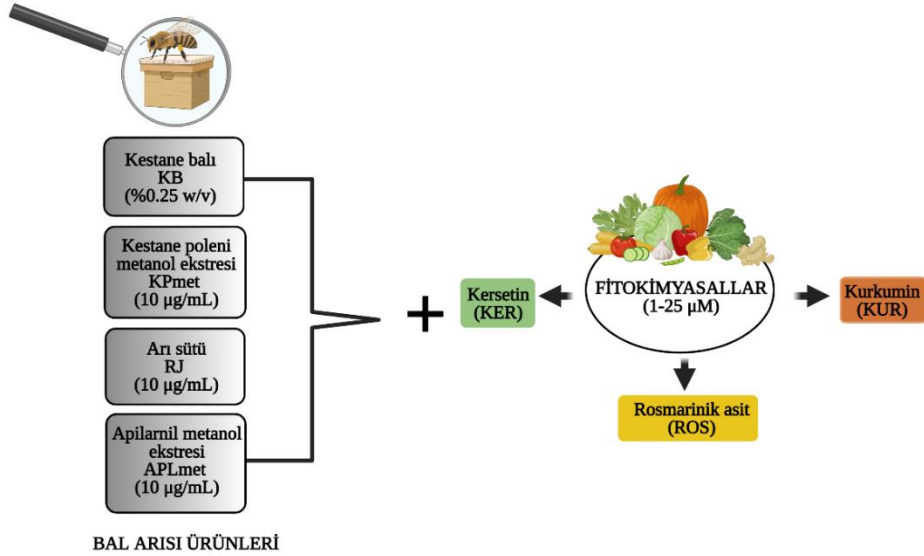
Şekil 4.20: Rosmarinik asitin (ROS) 48 saatte NIH3T3 hücrelerinin canlılığı üzerine etkisi.



Şekil 4.21: Rosmarinik asitin (ROS) 72 saatte NIH3T3 hücrelerinin canlılığı üzerine etkisi.

4.1.3. Kombine Ürünlerin Hücre Canlılığına Etkileri

Hedeflenen kombinasyonları hazırlamak için yapılan ön çalışmalar sonunda, her bir bileşenin sitotoksitesi hakkında kapsamlı verilere ulaşılmış ve oluşturulan kombinasyonların özeti her bir bileşen için seçilen dozlar da belirtilerek Şekil 4.22’de özetlenmiştir.



Şekil 4.22: Kombinasyonlar ve bileşenlerine ait dozların özet gösterimi.

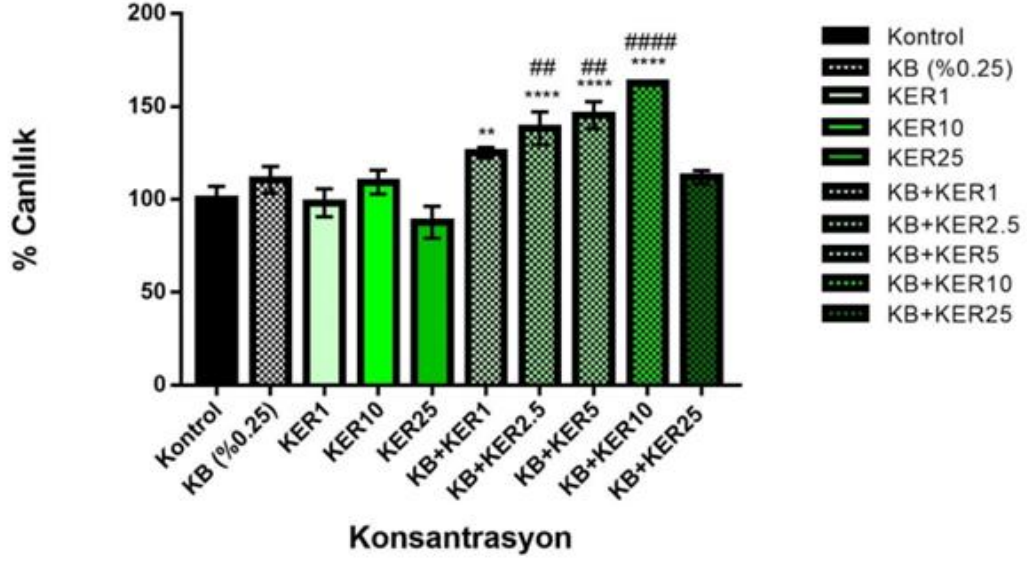
4.1.3.1. Kestane Balı ve Kersetin Kombinasyonlarının Hücre Canlılığına Etkileri

Kestane balının (KB) NIH3T3 hücreleri üzerinde toksik olmayan konsantrasyonu %0.25 (w/v) seçildi ve kersetinin (KER) 1, 2.5, 5, 10 ve 25 μM konsantrasyonlarıyla farklı kombinasyonları yapıldı. Farklı kombinasyonlarda hazırlanan KB ve KER içeren besiyerleri NIH3T3 hücrelerine uygulandı. 24, 48 ve 72 saatlik MTT analizi sonucu elde edilen veriler Tablo 4.1’ de verilmiştir.

Farklı konsantrasyonlarda uygulanan kestane balı ve kersetin kombinasyonlarından KB+KER10 (%62.5 $\pm$ 1.00) kombinasyonu 24 saatte hem kontrole, hem de KB’ye göre NIH3T3 hücrelerinin canlılığını istatistiksel olarak anlamlı şekilde artırmıştır (**** $p<0.0001$ ve #### $p<0.0001$). Ayrıca Şekil 4.23’ de gösterilen KB+KER2.5 ve KB+KER5 kombinasyonlarının ise NIH3T3 hücrelerinin canlılığını KB (%0.25)’ye göre sırasıyla %38.3 $\pm$ 8.82 ve %45.3 $\pm$ 7.34 olarak artırdığı bulundu (## $p<0.01$). KB+KER2.5 ve KB+KER5 kombinasyonlarının arasındaki fark istatistiksel olarak önemsiz bulundu ($p>0.05$).

Tablo 4.1: Kestane balı ve kersetin (KB+KER) kombinasyonlarının 24, 48 ve 72 saatte NIH3T3 hücrelerinin canlılığı üzerine etkisi (en kısa sürede en yüksek proliferatif etki gösteren kombinasyon yeşil zeminde gösterilmiştir).

Kestane Balı (KB) Dozu (%w/v)	Kersetin (KER) Doz (μM)	% Canlılık		
		24h	48h	72h
%0.25	1	125.1 $\pm$ 2.7	93.3 $\pm$ 0.6	96.7 $\pm$ 3.6
%0.25	2.5	138.3 $\pm$ 8.8	89.7 $\pm$ 2.8	100 $\pm$ 6.9
%0.25	5	145.3 $\pm$ 7.3	90.0 $\pm$ 1.6	101 $\pm$ 2.4
%0.25	10	162.5 $\pm$ 1.0	97.2 $\pm$ 2.4	96.3 $\pm$ 7.3
%0.25	25	112 $\pm$ 3.6	74.8 $\pm$ 5.0	80.7 $\pm$ 4.6
Kontrol		100 $\pm$ 5.0	100 $\pm$ 2.9	100 $\pm$ 2.0



Şekil 4.23: Kestane balı ve kersetin (KB+KER) kombinasyonlarının 24 saatte NIH3T3 hücrelerinin canlılığı üzerine etkisi.

4.1.3.2. Kestane Balı ve Kurkumin Kombinasyonlarının Hücre Canlılığına Etkileri

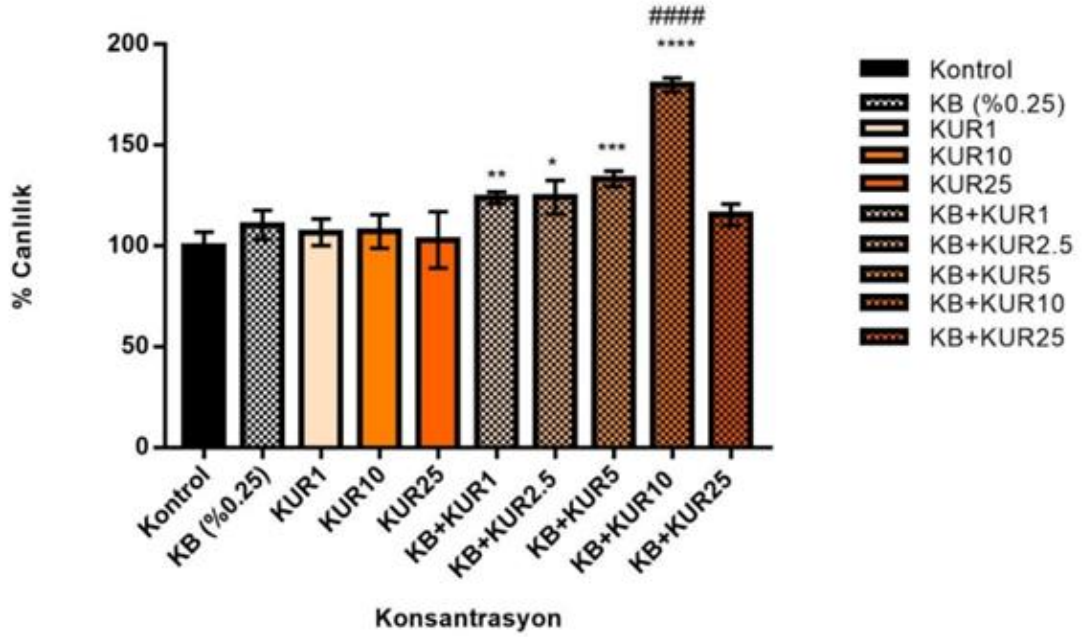
Kestane balının (KB) NIH3T3 hücreleri üzerinde toksik olmayan konsantrasyonu %0.25 (w/v) seçildi ve kurkuminin (KUR) 1, 2.5, 5, 10 ve 25 μ M konsantrasyonlarıyla farklı kombinasyonları yapıldı. Farklı kombinasyonlarda hazırlanan KB ve KUR içeren besiyerleri NIH3T3 hücrelerine uygulandı. 24, 48 ve 72 saatlik MTT analizi sonucu elde edilen veriler Tablo 4.2’ de verilmiştir.

Kestane balı ve kurkumin kombinasyonlarından KB+KUR10 kombinasyonunun NIH3T3 hücrelerinin canlılığı üzerindeki 24 saatlik etkisi hem kontrole hem de KB (%0.25)’ye göre hesaplandı ve hücreler üzerinde istatistiksel olarak anlamlı proliferatif etki (79.9 ± 3.42) gösterdiği bulundu ve Şekil 4.24’de sunuldu ($****p < 0.0001$ ve $####p < 0.0001$).

Farklı konsantrasyonlarda uygulanan kestane balı ve kurkumin kombinasyonlarından KB+KUR10 kombinasyonunun NIH3T3 hücrelerinin canlılığı üzerindeki 48 saatlik etkisi hem kontrole hem de KB (%0.25)’ye göre hesaplandı ve sadece kontrole göre hücreler üzerinde istatistiksel olarak anlamlı proliferatif etki (14.8 ± 2.36) gösterdiği bulundu ($**p < 0.01$).

Tablo 4.2: Kestane balı ve kurkumin (KB+KUR) kombinasyonlarının 24, 48 ve 72 saatte NIH3T3 hücrelerinin canlılığı üzerine etkisi (en kısa sürede en yüksek proliferatif etki gösteren kombinasyon turuncu zeminde gösterilmiştir).

Kestane Balı (KB) Dozu (%w/v)	Kirkumin (KUR) Doz (μ M)	% Canlılık		
		24h	48h	72h
%0.25	1	124 $\pm$ 2.8	104.6 $\pm$ 1.4	84.9 $\pm$ 4.3
%0.25	2.5	124.3 $\pm$ 8.3	104.2 $\pm$ 1.7	96.9 $\pm$ 7.1
%0.25	5	133.4 $\pm$ 3.8	110.8 $\pm$ 2.6	93.1 $\pm$ 9.2
%0.25	10	179.9 $\pm$ 3.4	114.8 $\pm$ 2.3	95.1 $\pm$ 11.0
%0.25	25	115.5 $\pm$ 5.3	90.6 $\pm$ 4.5	86.3 $\pm$ 1.0
Kontrol		100 $\pm$ 1.6	100 $\pm$ 3.0	100 $\pm$ 1.5



Şekil 4.24: Kestane balı ve kurkumin (KB+KUR) kombinasyonlarının 24 saatte NIH3T3 hücrelerinin canlılığı üzerine etkisi.

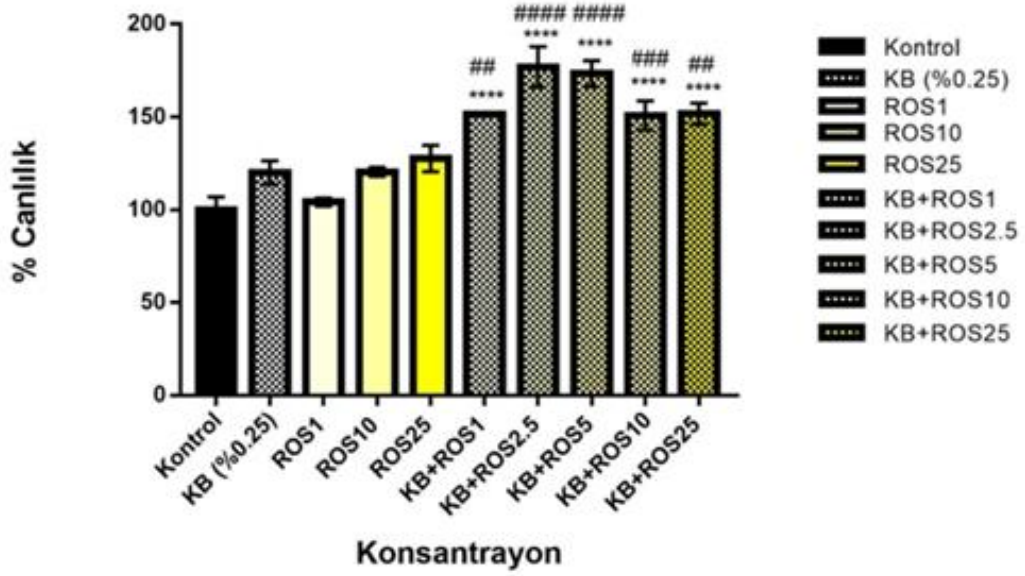
4.1.3.3. Kestane Balı ve Rosmarinik Asit Kombinasyonlarının Hücre Canlılığına Etkileri

Kestane balının (KB) NIH3T3 hücreleri üzerinde toksik olmayan konsantrasyonu %0.25 (w/v) seçildi ve rosmarinik asit (ROS) 1, 2.5, 5, 10 ve 25 μ M konsantrasyonlarıyla farklı kombinasyonları yapıldı. Farklı kombinasyonlarda hazırlanan KB ve ROS içeren besiyerleri NIH3T3 hücrelerine uygulandı. 24, 48 ve 72 saatlik MTT analizi sonucu elde edilen veriler Tablo 4.3’de verilmiştir.

Kestane balı ve rosmarinik asit kombinasyonlarından KB+ROS2.5 kombinasyonunun NIH3T3 hücrelerinin canlılığı üzerindeki 24 saatlik etkisi hem kontrole hem de KB (%0.25)’ye göre hesaplandı ve hücreler üzerinde istatistiksel olarak anlamlı proliferatif etki (76.9 ± 10.95) gösterdiği bulundu ($****p < 0.0001$ ve $####p < 0.0001$). KB+ROS5 kombinasyonunun NIH3T3 hücrelerinin canlılığı üzerindeki 24 saatlik etkisi hem kontrole hem de KB (%0.25)’ye göre anlamlı bulundu ve Şekil 4.25’de gösterildi ($****p < 0.0001$ ve $####p < 0.0001$). Ancak bu iki doz arasındaki fark istatistiksel olarak önemsizdir ($p > 0.05$). Bu nedenle düşük doz ve düşük uygulama zamanı seçilmiştir.

Tablo 4.3: Kestane balı ve rosmarinik asit (KB+ROS) kombinasyonlarının 24, 48 ve 72 saatte NIH3T3 hücrelerinin canlılığı üzerine etkisi (en kısa sürede en yüksek proliferatif etki gösteren kombinasyon sarı zeminde gösterilmiştir).

Kestane Balı (KB) Dozu (%w/v)	Rosmarinik asit (ROS) Doz (μ M)	% Canlılık		
		24h	48h	72h
%0.25	1	151.3 $\pm$ 0.5	102.2 $\pm$ 1.6	98.5 $\pm$ 1.5
%0.25	2.5	176.9 $\pm$ 10.9	112.4 $\pm$ 4.0	104.8 $\pm$ 1.4
%0.25	5	173.4 $\pm$ 7.0	114.2 $\pm$ 6.1	103.9 $\pm$ 1.5
%0.25	10	150.8 $\pm$ 7.7	102.4 $\pm$ 0.6	95.1 $\pm$ 4.1
%0.25	25	151.7 $\pm$ 5.7	104.2 $\pm$ 1.7	95.6 $\pm$ 9.5
Kontrol		100 $\pm$ 4.4	100 $\pm$ 2.0	100 $\pm$ 0.7



Şekil 4.25: Kestane balı ve rosmarinik asit (KB+ROS) kombinasyonlarının 24 saatte NIH3T3 hücrelerinin canlılığı üzerine etkisi.

4.1.3.4. Kestane Polen Metanol Ekstresi ve Kersetin Kombinasyonlarının Hücre Canlılığına Etkileri

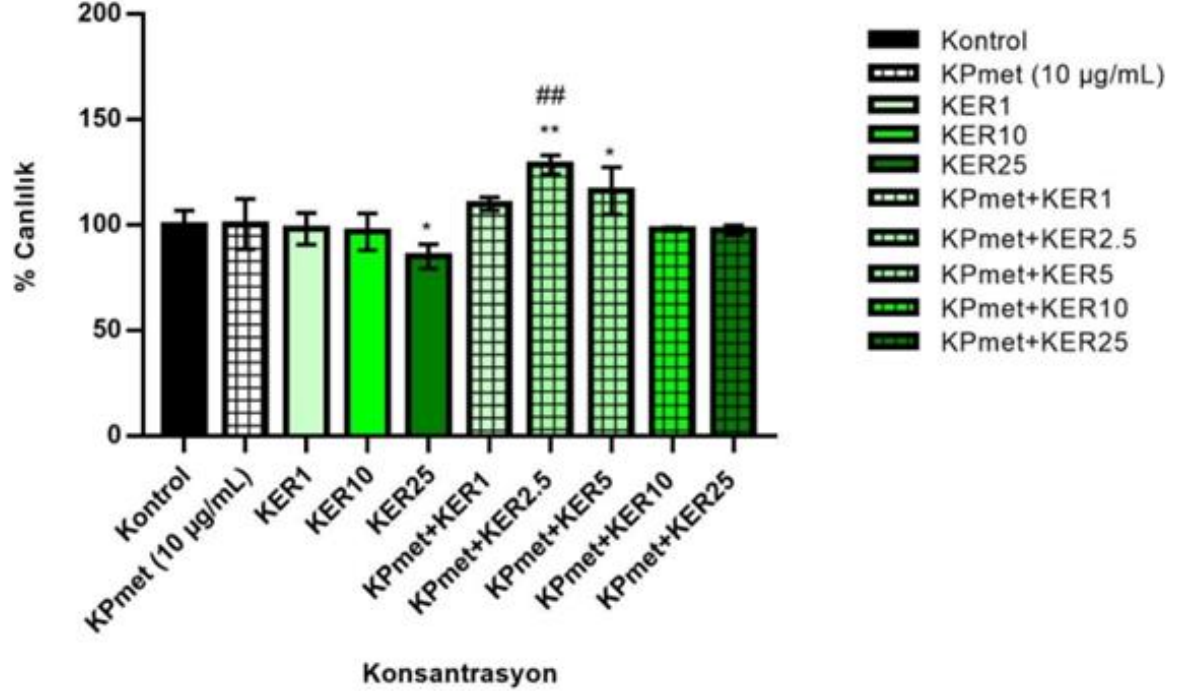
Kestane poleni metanol ekstresinin (KPmet) NIH3T3 hücreleri üzerinde toksik olmayan konsantrasyonu 10 µg/mL seçildi ve kersetinin (KER) 1, 2.5, 5, 10 ve 25 µM konsantrasyonlarıyla farklı kombinasyonları yapıldı. Farklı kombinasyonlarda hazırlanan KPmet ve KER içeren besiyerleri NIH3T3 hücrelerine uygulandı. 24, 48 ve 72 saatlik MTT analizi sonucu elde edilen veriler Tablo 4.4' de verilmiştir.

KPmet+KER2.5 kombinasyonunun NIH3T3 hücrelerinin canlılığı üzerindeki 24 saatlik etkisi hem kontrole hem de KPmet'e göre hesaplandı ve hücreler üzerinde istatistiksel olarak anlamlı proliferatif etki gösterdiği bulundu ve Şekil 4.26'da gösterildi (** $p < 0.01$ ve ## $p < 0.01$).

KPmet+KER25 kombinasyonunun NIH3T3 hücrelerinin canlılığı üzerindeki 48 saatlik etkisi hem kontrole hem de KPmet'e göre hesaplandı ve hücreler üzerinde istatistiksel olarak anlamlı sitotoksik etki gösterdiği bulundu (**** $p < 0.0001$ ve ##### $p < 0.0001$).

Tablo 4.4: Kestane poleni metanol ekstresi ve kersetin (KPmet+KER) kombinasyonlarının 24, 48 ve 72 saatte NIH3T3 hücrelerinin canlılığı üzerine etkisi (en kısa sürede en yüksek proliferatif etki gösteren kombinasyon yeşil zeminde gösterilmiştir).

Kestane poleni metanol ekstresi (KPmet) Dozu ($\mu\text{g/mL}$)	Kersetin (KER) Doz (μM)	% Canlılık		
		24h	48h	72h
10	1	110 $\pm$ 1.3	91.2 $\pm$ 5.8	96.3 $\pm$ 3.0
10	2.5	128.5 $\pm$ 3.6	91.7 $\pm$ 6.2	99.6 $\pm$ 1.2
10	5	116.2 $\pm$ 2.4	89.9 $\pm$ 3.2	99.1 $\pm$ 2.5
10	10	98.0 $\pm$ 2.2	86.8 $\pm$ 1.3	88.7 $\pm$ 3.8
10	25	97.5 $\pm$ 1.9	71.2 $\pm$ 2.7	84.0 $\pm$ 2.5
Kontrol		100 $\pm$ 2.9	100 $\pm$ 1.8	100 $\pm$ 3.6



Şekil 4.26: Kestane poleni metanol ekstresi ve kersetin (KPmet+KER) kombinasyonlarının 24 saatte NIH3T3 hücrelerinin canlılığı üzerine etkisi.

4.1.3.5. Kestane Polen Metanol Ekstresi ve Kurkumin Kombinasyonlarının Hücre Canlılığına Etkileri

Kestane poleni metanol ekstresinin (KPmet) NIH3T3 hücreleri üzerinde toksik olmayan konsantrasyonu 10 µg/mL seçildi ve kurkumin (KUR) 1, 2.5, 5, 10 ve 25 µM konsantrasyonlarıyla farklı kombinasyonları yapıldı. Farklı kombinasyonlarda hazırlanan KPmet ve KUR içeren besiyerleri NIH3T3 hücrelerine uygulandı. 24, 48 ve 72 saatlik MTT analizi sonucu elde edilen veriler Tablo 4.5’de verilmiştir.

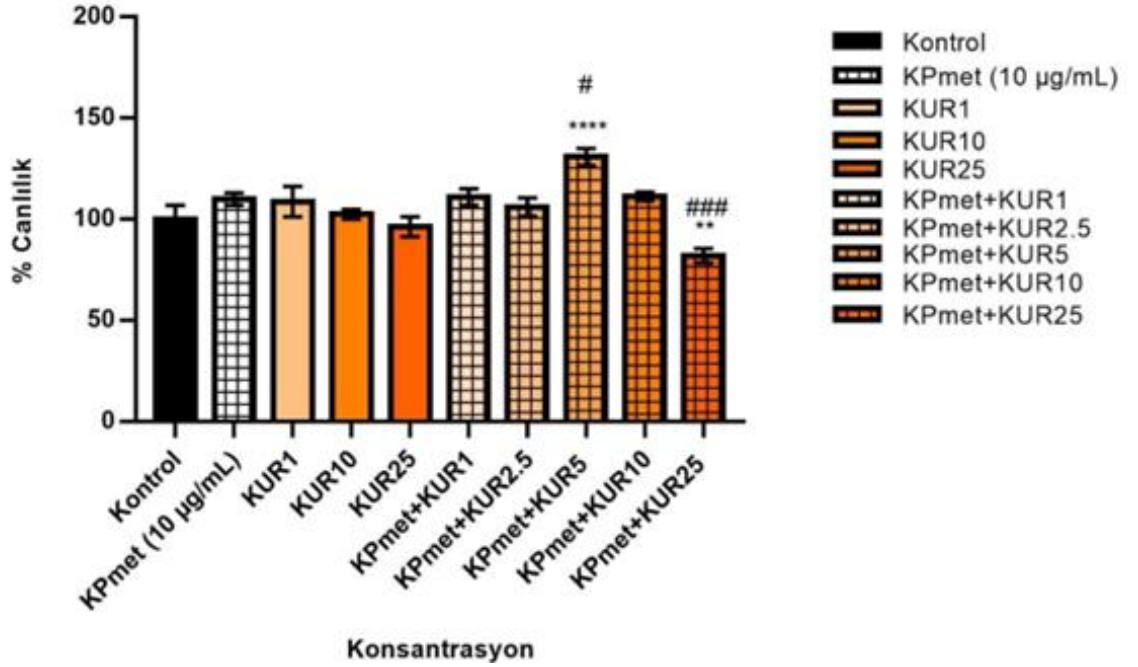
KPmet+KUR5 kombinasyonunun NIH3T3 hücrelerinin canlılığı üzerindeki 24 saatlik etkisi hem kontrole hem de KPmet’e göre hesaplandı ve hücreler üzerinde istatistiksel olarak anlamlı proliferatif etki (%30.9±4.3) gösterdiği bulundu ve Şekil 4.27’de gösterildi (**** $p < 0.0001$ ve # $p < 0.5$).

KPmet+KUR25 kombinasyonunun NIH3T3 hücrelerinin canlılığı üzerindeki 24 saatlik etkisi hem kontrole hem de KPmet’e göre hesaplandı ve hücreler üzerinde istatistiksel olarak anlamlı sitotoksik etki (%17.94±3.5) gösterdiği bulundu ve Şekil 4.27’de gösterildi (** $p < 0.01$ ve ### $p < 0.001$).

KPmet+KUR25 kombinasyonunun NIH3T3 hücrelerinin canlılığı üzerindeki 48 saatlik etkisi KPmet’e göre hesaplandı ve kombinasyonun hücreler üzerinde istatistiksel olarak anlamlı sitotoksik etki (%30.75±8.6) gösterdiği bulundu (#### $p < 0.0001$).

Tablo 4.5: Kestane poleni metanol ekstresi ve kurkumin (KPmet+KUR) kombinasyonlarının 24, 48 ve 72 saatte NIH3T3 hücrelerinin canlılığı üzerine etkisi (en kısa sürede en yüksek proliferatif etki gösteren kombinasyon turuncu zeminde gösterilmiştir).

Kestane poleni metanol ekstresi (KPmet) Dozu (µg/mL)	Kirkumin (KUR) Doz (µM)	% Canlılık		
		24h	48h	72h
10	1	111±4.1	86.2±1.4	100.5±7.5
10	2.5	106.1±4.4	89.9±1.7	96.6±9.2
10	5	130.9±4.3	96.4±8.3	96.5±2.9
10	10	111.2±2.1	84.6±1.1	99.7±6.4
10	25	82.0±3.5	69.2±8.6	90.8±3.6
Kontrol		100±2.8	100±1.9	100±3.2



Şekil 4.27: Kestane poleni metanol ekstresi ve kurkumin (KPmet+KUR) kombinasyonlarının 24 saatte NIH3T3 hücrelerinin canlılığı üzerine etkisi.

4.1.3.6. Kestane Poleni Metanol Ekstresi ve Rosmarinik Asit Kombinasyonlarının Hücre Canlılığına Etkileri

Kestane poleni metanol ekstresinin (KPmet) NIH3T3 hücreleri üzerinde toksik olmayan konsantrasyonu 10 µg/mL seçildi ve rosmarinik asit (ROS) 1, 2.5, 5, 10 ve 25 µM konsantrasyonlarıyla farklı kombinasyonları yapıldı. Farklı kombinasyonlarda hazırlanan KPmet ve ROS içeren besiyerleri NIH3T3 hücrelerine uygulandı. 24, 48 ve 72 saatlik MTT analizi sonucu elde edilen veriler Tablo 4.6’da verilmiştir.

KPmet+ROS2.5 ve KPmet+ROS5 kombinasyonları sadece kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı proliferatif etki göstermiştir (** $p < 0.001$).

Tablo 4.6: Kestane poleni metanol ekstresi ve kurkumin (KPmet+KUR) kombinasyonlarının 24, 48 ve 72 saatte NIH3T3 hücrelerinin canlılığı üzerine etkisi (en kısa sürede en yüksek proliferatif etki gösteren kombinasyon sarı zeminde gösterilmiştir).

Kestane poleni metanol ekstresi (KPmet) Dozu (µg/mL)	Rosmarinik asit (ROS) Doz (µM)	% Canlılık		
		24h	48h	72h
10	1	109.0±1.9	100.1±5.3	106.7±2.0
10	2.5	117.4±5.2	108.6±4.5	109.4±3.4
10	5	118.2±4.7	108.5±3.9	108.0±2.3
10	10	108.0±1.8	106.7±2.6	104.2±4.8
10	25	105.2±6.3	105±1.1	107.2±5.5
Kontrol		100±2.0	100±1.7	100±2.3

4.1.3.7. Arı Sütü ve Kersetin Kombinasyonlarının Hücre Canlılığına Etkileri

Arı sütünün (RJ) NIH3T3 hücreleri üzerinde toksik olmayan konsantrasyonu 10 µg/mL seçildi ve kersetinin (KER) 1, 2.5, 5, 10 ve 25 µM konsantrasyonlarıyla farklı kombinasyonları yapıldı. Farklı kombinasyonlarda hazırlanan RJ ve KER içeren besiyerleri NIH3T3 hücrelerine uygulandı. 24, 48 ve 72 saatlik MTT analizi sonucu elde edilen veriler Tablo 4.7’ de verilmiştir.

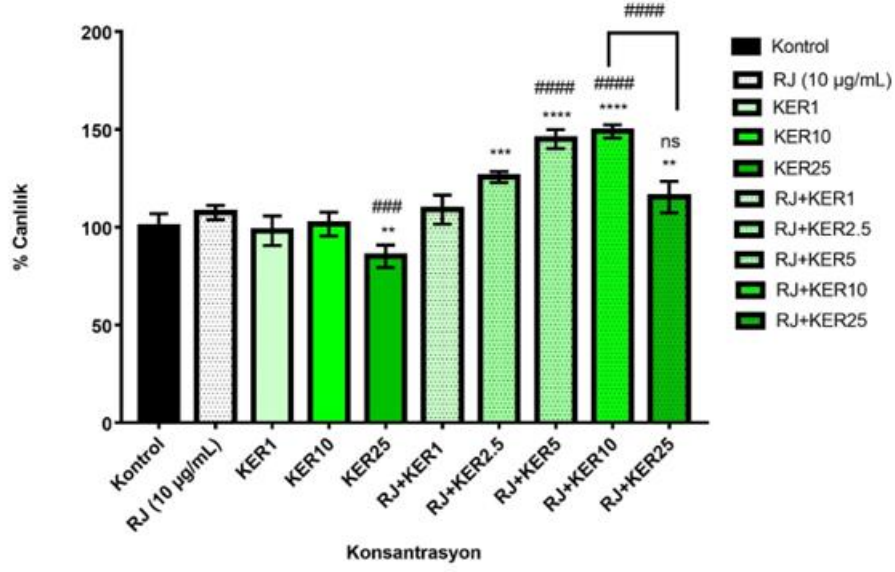
Farklı konsantrasyonlarda uygulanan arı sütü ve kersetin kombinasyonlarından RJ+KER5 (%45.1±4.8) ve RJ+KER10 (%49±3.3) hem kontrole göre hem de RJ (10 µg/mL)'ye göre NIH3T3 hücrelerinin canlılığını istatistiksel olarak anlamlı şekilde artırmıştır (**** $p<0.0001$ ve #### $p<0.0001$). Bu kombinasyon dozları arasındaki fark ise önemsiz bulundu. RJ+KER2.5 (%25.7±2.82) ve RJ+KER25 (%15.5±8.0) kombinasyonları ise sadece kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı proliferatif etki gösterdi (** $p<0.001$ ve ** $p<0.01$) (Şekil 4.28).

Farklı konsantrasyonlarda uygulanan arı sütü ve kersetin kombinasyonlarından RJ+KER25 kombinasyonu (%14.71±3.77) kontrole göre NIH3T3 hücrelerinin canlılığını istatistiksel olarak anlamlı şekilde düşürdü (* $p<0.05$). RJ+KER25 ve RJ (10 µg/mL)'in NIH3T3 hücrelerinin canlılığı üzerindeki etkileri karşılaştırıldığında aradaki fark istatistiksel olarak anlamsız bulundu ($p>0.05$).

Farklı konsantrasyonlarda uygulanan arı sütü ve kersetin kombinasyonlarından RJ+KER25 kombinasyonu (%25.61±2.5) kontrole göre NIH3T3 hücrelerinin canlılığını istatistiksel olarak anlamlı şekilde düşürdü (**** $p<0.0001$). RJ+KER25 ve RJ (10 µg/mL)'in NIH3T3 hücrelerinin canlılığı üzerindeki etkileri karşılaştırıldığında RJ'ye göre aradaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p<0.05$).

Tablo 4.7: Arı sütü ve kersetin (RJ+KER) kombinasyonlarının 24, 48 ve 72 saatte NIH3T3 hücrelerinin canlılığı üzerine etkisi (en kısa sürede en yüksek proliferatif etki gösteren kombinasyon yeşil zeminde gösterilmiştir).

Arı sütü (RJ) Dozu (µg/mL)	Kersetin (KER) Doz (µM)	% Canlılık		
		24h	48h	72h
10	1	109±7.3	104.5±0.9	87.8±3.4
10	2.5	125.7±2.8	100.8±2.3	89.6±2.3
10	5	145.1±4.8	97.8±1.0	96.7±1.2
10	10	149±3.3	93.1±3.8	88.7±2.8
10	25	115.5±8.0	85.2±3.7	74.3±2.5
Kontrol		100±6.9	100±2.4	100±4.3



Şekil 4.28: Arı sütü ve kersetin (RJ+KER) kombinasyonlarının 24 saatte NIH3T3 hücrelerinin canlılığı üzerine etkisi.

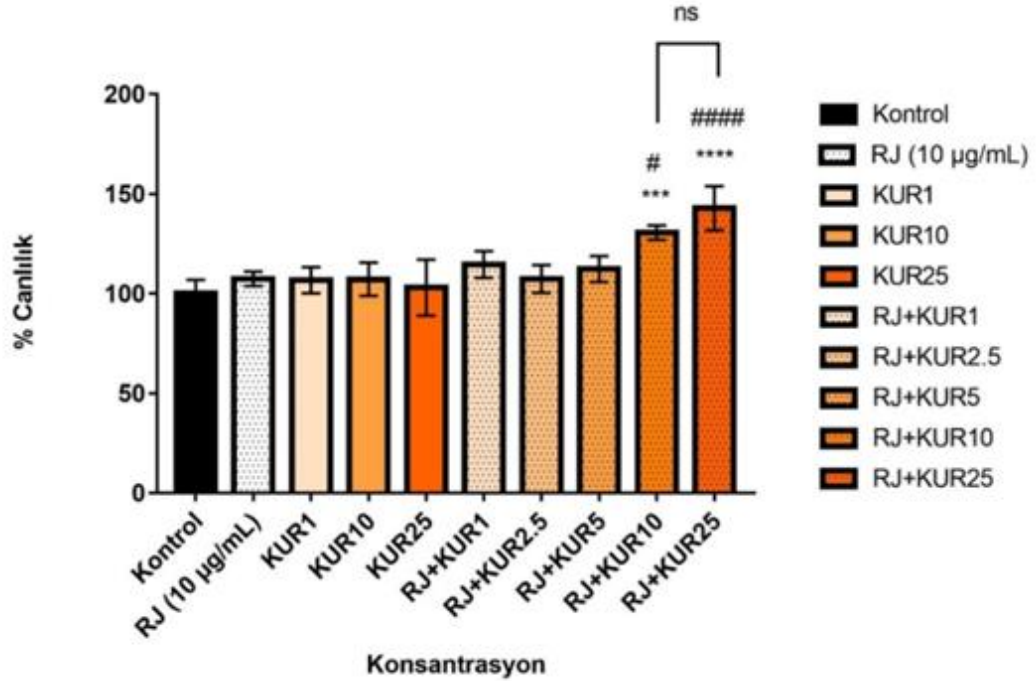
4.1.3.8. Arı Sütü ve Kurkumin Kombinasyonlarının Hücre Canlılığına Etkileri

Arı sütünün (RJ) NIH3T3 hücreleri üzerinde toksik olmayan konsantrasyonu 10 µg/mL seçildi ve kurkuminin (KUR) 1, 2.5, 5, 10 ve 25 µM konsantrasyonlarıyla farklı kombinasyonları yapıldı. Farklı kombinasyonlarda hazırlanan RJ ve KUR içeren besiyerleri NIH3T3 hücrelerine uygulandı. 24, 48 ve 72 saatlik MTT analizi sonucu elde edilen veriler Tablo 4.8’ de verilmiştir.

Arı sütü ve kurkumin kombinasyonlarından RJ+KUR25 (%42.9±11.09) ve RJ+KUR10 (%30.7±3.58) hem kontrole göre hem de RJ (10 µg/mL)’ye göre NIH3T3 hücrelerinin canlılığını istatistiksel olarak anlamlı şekilde artırdığı tespit edildi ve Şekil 4.29’ da sunuldu ($***p<0.001$, $****p<0.0001$ ve $^{\#}p<0.05$, $####p<0.0001$). Bu kombinasyon dozları arasındaki fark ise önemsiz bulundu ($p>0.05$).

Tablo 4.8: Arı sütü ve kurkumin (RJ+KUR) kombinasyonlarının 24, 48 ve 72 saatte NIH3T3 hücrelerinin canlılığı üzerine etkisi (en kısa sürede en yüksek proliferatif etki gösteren kombinasyon turuncu zeminde gösterilmiştir).

Arı sütü (RJ) Dozu (µg/mL)	Kurkumin (KUR) Doz (µM)	% Canlılık		
		24h	48h	72h
10	1	114.7±6.7	99.1±2.6	93.7±1.6
10	2.5	107.4±6.9	99.5±3.9	94.9±1.8
10	5	112.3±6.5	103.7±2.4	97.2±7.3
10	10	130.7±3.5	108.8±8.4	104±4.9
10	25	142.9±11.0	122.5±11.4	123.9±14.6
Kontrol		100±2.4	100±1.7	100±3.6



Şekil 4.29: Arı sütü ve kurkumin (RJ+KUR) kombinasyonlarının 24 saatte NIH3T3 hücrelerinin canlılığı üzerine etkisi.

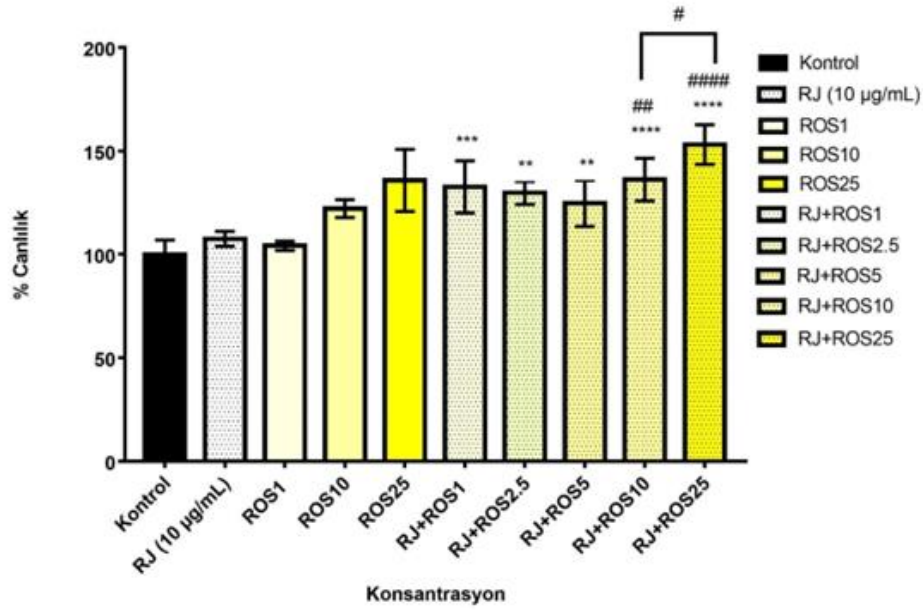
4.1.3.9. Arı Sütü ve Rosmarinik Asit Kombinasyonlarının Hücre Canlılığına Etkileri

Arı sütünün (RJ) NIH3T3 hücreleri üzerinde toksik olmayan konsantrasyonu 10 µg/mL seçildi ve rosmarinik asitin (ROS) 1, 2.5, 5, 10 ve 25 µM konsantrasyonlarıyla farklı kombinasyonları yapıldı. Farklı kombinasyonlarda hazırlanan RJ ve ROS içeren besiyerleri NIH3T3 hücrelerine uygulandı. 24, 48 ve 72 saatlik MTT analizi sonucu elde edilen veriler Tablo 4.9’ da verilmiştir.

Arı sütü ve rosmarinik asit kombinasyonlarından RJ+ROS10 (%36.1±10.31) ve RJ+ROS25 (%53.1±9.58) kontrole göre NIH3T3 hücrelerinin canlılığını istatistiksel olarak anlamlı şekilde artırmıştır (**** $p<0.0001$) (Şekil 4.30). Bu kombinasyon dozları arasındaki fark ise önemli bulundu ($^{\#}p<0.05$).

Tablo 4.9: Arı sütü ve rosmarinik asit (RJ+ROS) kombinasyonlarının 24, 48 ve 72 saatte NIH3T3 hücrelerinin canlılığı üzerine etkisi (en kısa sürede en yüksek proliferatif etki gösteren kombinasyon sarı zeminde gösterilmiştir).

Arı sütü (RJ) Dozu (µg/mL)	Rosmarinik asit (ROS) Doz (µM)	% Canlılık		
		24h	48h	72h
10	1	132.6±12.6	98.3±2.5	106.5±8.3
10	2.5	129.7±5.5	98.2±2.7	104.5±5.5
10	5	124.6±11.2	99.6±5.6	101.4±0.7
10	10	136.1±10.3	102.8±7.3	95±5.9
10	25	153.1±9.5	118.1±11.4	96.2±7.3
Kontrol		100±3.6	100±1.2	100±5.5



Şekil 4.30: Arı sütü ve rosmarinik asit (RJ+ROS) kombinasyonlarının 24 saatte NIH3T3 hücrelerinin canlılığı üzerine etkisi.

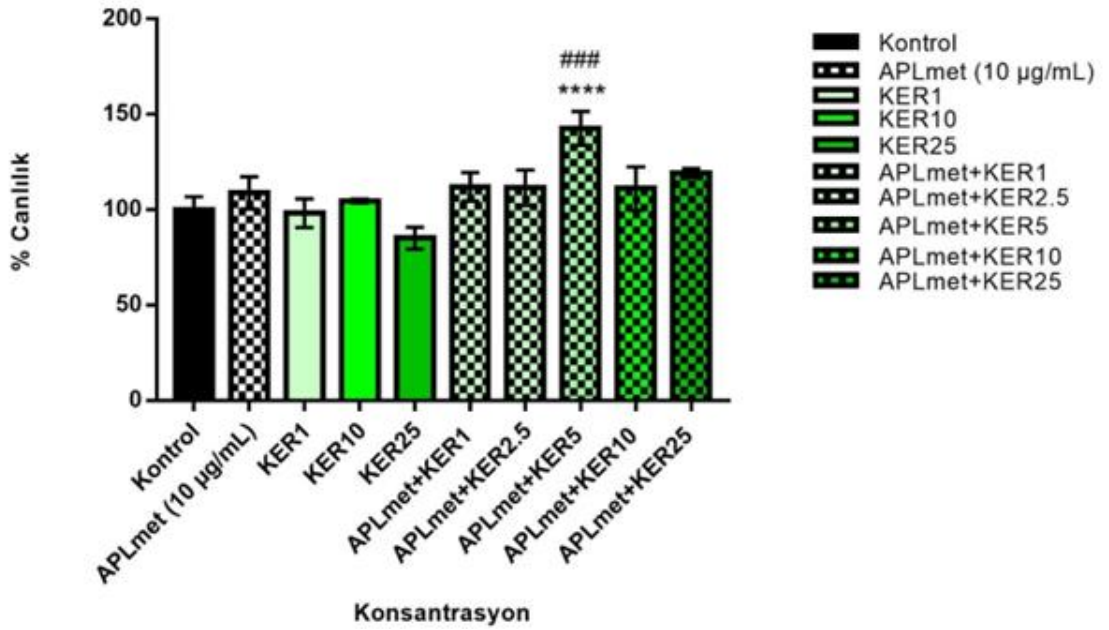
4.1.3.10. Apilarnil Metanol Ekstresi ve Kersetin Kombinasyonlarının Hücre Canlılığına Etkileri

Apilarnil metanol ekstresinin (APLmet) NIH3T3 hücreleri üzerinde toksik olmayan konsantrasyonu 10 µg/mL seçildi ve kersetinin (KER) 1, 2.5, 5, 10 ve 25 µM konsantrasyonlarıyla farklı kombinasyonları yapıldı. Farklı kombinasyonlarda hazırlanan APLmet ve KER içeren besiyerleri NIH3T3 hücrelerine uygulandı. 24, 48 ve 72 saatlik MTT analizi sonucu elde edilen veriler sırasıyla Tablo 4.10' da verilmiştir.

APLmet ve KER kombinasyonlarından APLmet+KER5 kombinasyonunun NIH3T3 hücrelerinin canlılığı üzerindeki 24 saatlik etkisi hem kontrole hem de APLmet'e göre hesaplandı ve hücreler üzerinde istatistiksel olarak anlamlı proliferatif etki (%42.7±8.8) gösterdiği bulundu ve Şekil 4.31'de gösterildi (***** $p < 0.0001$ ve ### $p < 0.0001$).

Tablo 4.10: Apilarnil metanol ekstresi ve kersetin (APLmet+KER) kombinasyonlarının 24, 48 ve 72 saatte NIH3T3 hücrelerinin canlılığı üzerine etkisi (en kısa sürede en yüksek proliferatif etki gösteren kombinasyon yeşil zeminde gösterilmiştir).

Apilarnil metanol ekstresi (APLmet) Dozu (µg/mL)	Kersetin (KER) Doz (µM)	% Canlılık		
		24h	48h	72h
10	1	112.1±7.5	99.5±5.0	97.2±5.7
10	2.5	111.6±9.3	93.6±1.6	102.1±2.2
10	5	142.7±8.8	96.6±2.3	103.6±2.4
10	10	111.2±11.3	95.8±3.1	101.2±3.9
10	25	119.4±2.4	77.6±1.6	83.5±3.7
Kontrol		100±4.1	100±1.8	100±3.2



Şekil 4.31: Apilarnil metanol ekstresi ve kersetin (APLmet+KER) kombinasyonlarının 24 saatte NIH3T3 hücrelerinin canlılığı üzerine etkisi.

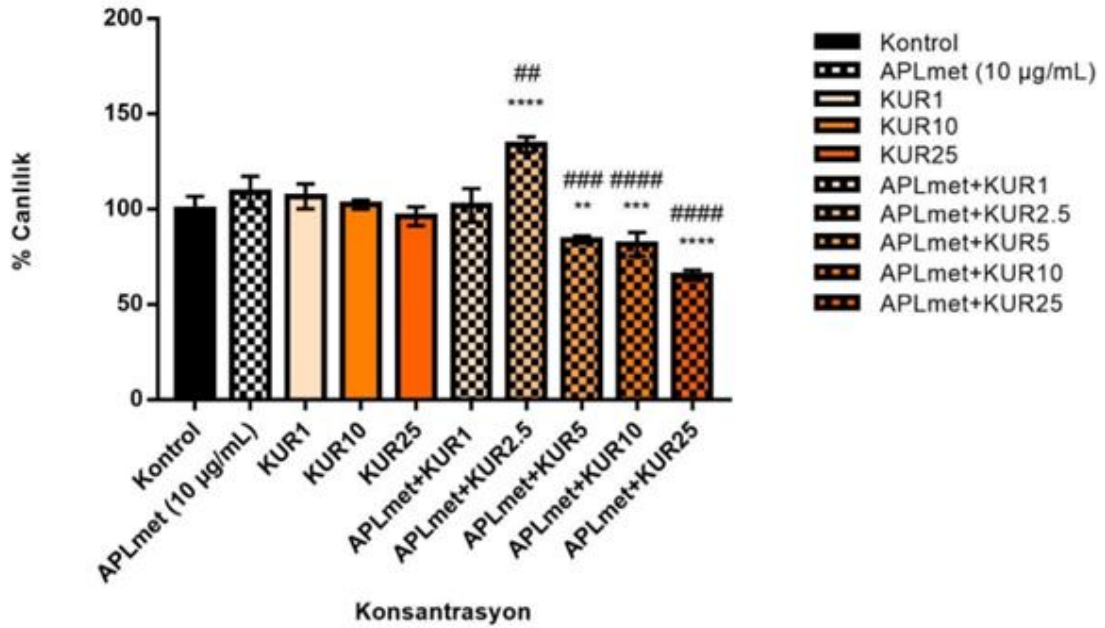
4.1.3.11. Apilarnil Metanol Ekstresi ve Kurkumin Kombinasyonlarının Hücre Canlılığına Etkileri

Apilarnil metanol ekstresinin (APLmet) NIH3T3 hücreleri üzerinde toksik olmayan konsantrasyonu 10 µg/mL seçildi ve kurkumin (KUR) 1, 2.5, 5, 10 ve 25 µM konsantrasyonlarıyla farklı kombinasyonları yapıldı. Farklı kombinasyonlarda hazırlanan APLmet ve KUR içeren besiyerleri NIH3T3 hücrelerine uygulandı. 24, 48 ve 72 saatlik MTT analizi sonucu elde edilen veriler sırasıyla Tablo 4.11’de verilmiştir.

Farklı konsantrasyonlarda uygulanan APLmet ve KUR kombinasyonlarından APLmet+KUR2.5 kombinasyonunun NIH3T3 hücrelerinin canlılığı üzerindeki 24 saatlik etkisi hem kontrole hem de APLmet’e göre hesaplandı ve hücreler üzerinde istatistiksel olarak anlamlı proliferatif etki (34 ± 4.05) gösterdiği bulundu ve Şekil 4.32’de gösterildi (**** $p < 0.0001$ ve ## $p < 0.01$).

Tablo 4.11: Apilarnil metanol ekstresi ve kurkumin (APLmet+KUR) kombinasyonlarının 24, 48 ve 72 saatte NIH3T3 hücrelerinin canlılığı üzerine etkisi (en kısa sürede en yüksek proliferatif etki gösteren kombinasyon turuncu zeminde gösterilmiştir).

Apilarnil metanol ekstresi (APLmet) Dozu (µg/mL)	Kürkumin (KUR) Doz (µM)	% Canlılık		
		24h	48h	72h
10	1	102.1±8.1	99.7±5.2	90.7±2.9
10	2.5	134.0±4.0	114.3±2.1	109.3±6.9
10	5	84.1±3.8	100.3±1.8	111.4±3.0
10	10	81.6±6.2	98.9±1.6	89.5±5.1
10	25	65.4±2.5	95.11±4.5	88.4±2.0
Kontrol		100±2.9	100±1.8	100±1.4



Şekil 4.32: Apilarnil metanol ekstresi ve kurkumin (APLmet+KUR) kombinasyonlarının 24 saatte NIH3T3 hücrelerinin canlılığı üzerine etkisi.

4.1.3.12. Apilarnil Metanol Ekstresinin ve Rosmarinik Asit Kombinasyonlarının Hücre Canlılığına Etkileri

Apilarnil metanol ekstresinin (APLmet) NIH3T3 hücreleri üzerinde toksik olmayan konsantrasyonu 10 µg/mL seçildi ve rosmarinik asit (ROS) 1, 2.5, 5, 10 ve 25 µM konsantrasyonlarıyla farklı kombinasyonları yapıldı. Farklı kombinasyonlarda hazırlanan APLmet ve ROS içeren besiyerleri NIH3T3 hücrelerine uygulandı. 24, 48 ve 72 saatlik MTT analizi sonucu elde edilen veriler Tablo 4. 12’de verilmiştir.

Farklı konsantrasyonlarda uygulanan APLmet ve ROS kombinasyonlarından APLmet+ROS1, APLmet+ROS2.5 ve APLmet5 kombinasyonunun NIH3T3 hücrelerinin canlılığı üzerindeki 24 saatlik etkisi APLmet’e göre hesaplandı ve hücreler üzerinde istatistiksel olarak anlamlı sitotoksik etki gösterdiği bulundu ($^{##}p<0.01$).

APLmet+ROS10 ve APLmet+ROS25 kombinasyonları sadece kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı proliferatif etki ($\%15.2\pm3.08$ ve $\%22.3\pm1.31$) gösterdi ($^{**}p<0.01$ ve $^{****}p<0.0001$).

APLmet ve rosmarinik asitle kombine ürünlerin 48 ve 72 saat sonunda NIH3T3 hücrelerinin canlılığına herhangi bir proliferatif ve/veya sitotoksik etkileri olmadığı bulundu ($p>0.05$).

Tablo 4.12: Apilarnil metanol ekstresi ve rosmarinik asit (APLmet+ROS) kombinasyonlarının 24, 48 ve 72 saatte NIH3T3 hücrelerinin canlılığı üzerine etkisi (en kısa sürede en yüksek proliferatif etki gösteren kombinasyon sarı zeminde gösterilmiştir).

Apilarnil metanol ekstresi (APLmet) Dozu ($\mu\text{g/mL}$)	Rosmarinik asit (ROS) Doz (μM)	% Canlılık		
		24h	48h	72h
10	1	88.0 $\pm$ 1.2	101 $\pm$ 3.3	101.5 $\pm$ 2.5
10	2.5	91.3 $\pm$ 5.2	99.7 $\pm$ 1.4	101.7 $\pm$ 3.4
10	5	85.5 $\pm$ 3.5	101.5 $\pm$ 1.8	100.6 $\pm$ 6.8
10	10	115.2 $\pm$ 3.0	102.5 $\pm$ 0.9	104.1 $\pm$ 5.7
10	25	122.3 $\pm$ 1.1	103.6 $\pm$ 2.1	98.3 $\pm$ 3.1
Kontrol		100 $\pm$ 4.8	100 $\pm$ 1.6	100 $\pm$ 3.7

4.2. SAF VE KOMBİNE ÜRÜNLERİN *İN VİTRO* ANTİOKSİDAN AKTİVİTE SONUÇLARI

4.2.1. DPPH* Radikal Süpürücü Aktivite

Saf ve kombine ürünlerin DPPH radikalini süpürme aktivitesi (IC_{50} mg/mL) ile ilgili veriler Tablo 4.13’de toplu halde gösterildi. Bu tabloda kombine ürünlerdeki bileşenlerin birbirleriyle etkileşim türleri de gösterildi. IC_{50} değeri, DPPH’yi %50 oranında inhibe eden konsantrasyonu yansıttığından, değer küçüldükçe aktivite büyümektedir. Etkileşim türü, kombinasyonun IC_{50} değeri (“gözlemlenen değer”), her bir bileşenin matematiksel toplamına (“beklenen değer”) eşitse *Aditif*, küçükse *Sinerjistik* ve büyükse *Antagonistik* olarak değerlendirildi (Sentkowska ve Pyrzyńska, 2019).

Bal arısı ürünleri arasında DPPH radikalini en etkin şekilde süpüren örneğin kestane poleni metanol ekstresi (KPmet) olduğu görüldü. Fitokimyasallar içinde de en etkili radikal süpürücü rosmarinik asitti. Kombinasyonlar arasında ise, RJ+ROS25, RJ+KER10 ve RJ+KUR25 kodlu 3 ürün bu aktivite bakımından RJ’ye nazaran anlamlı derecede üstündür.

Tablo 4.13: Saf ve kombine ürünlerin DPPH radikali süpürücü (IC₅₀ mg/mL) değerleri.

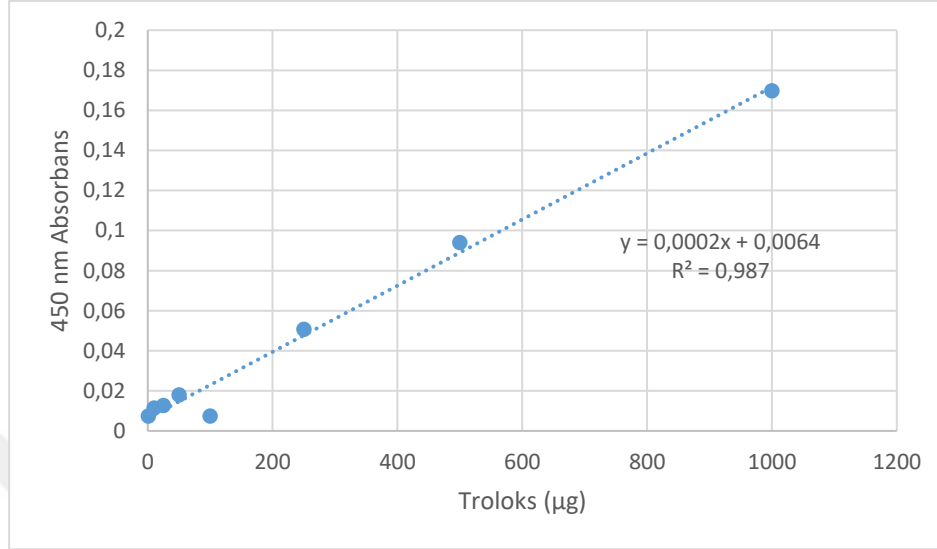
Saf ve kombine ürünler	Gözlemlenen değer (IC ₅₀ mg/mL)	Beklenen değer (IC ₅₀ mg/mL)	Etkileşim türü
Kestane balı (KB)	10.98 ± 1.20	-	-
Kestane poleni metanol ekstresi (KPmet)	0.442 ± 0.02	-	-
Arı sütü (RJ)	24.732 ± 13.34	-	-
Apilarnil metanol ekstresi (APLmet)	4.118 ± 3.53	-	-
Kersetin 10 µM (KER10)	0.092±0.013	-	-
Kersetin 5 µM (KER5)	0.125 ± 0.003	-	-
Kurkumin 25 µM (KUR25)	0.005±0.003	-	-
Kurkumin 10 µM (KUR10)	0.019±0.002	-	-
Kurkumin 5 µM (KUR5)	0.076±0.008	-	-
Kurkumin 2.5 µM (KUR2.5)	0.387 ± 0.011	-	-
Rosmarinik asit 25 µM (ROS25)	0.087±0.014	-	-
Rosmarinik asit 2.5 µM (ROS2.5)	0.131 ± 0.004	-	-
Kestane balı ve 10 µM Kurkumin (KB+KUR10)	25.46 ± 0.53	10.999±1.202	Antagonistik
Kestane balı ve 2.5 µM Rosmarinik asit (KB+ROS2.5)	24.42 ± 3.03	11.111±1.204	Antagonistik
Kestane balı ve 10 µM Kersetin (KB+KER10)	12.81 ± 1.43	11.072±1.213	Antagonistik
Kestane poleni metanol ekstresi ve 5 µM Kurkumin (KPmet+KUR5)	15.46 ± 2.87	0.518±0.028	Antagonistik
Arı sütü ve 25 µM Kurkumin (RJ+KUR25)	15.30 ± 0.66	24.737±13.343	Sinerjistik
Arı sütü ve 25 µM Rosmarinik asit (RJ+ROS25)	7.80 ± 5.65	24.819±13.354	Sinerjistik
Arı sütü ve 10 µM Kersetin (RJ+KER10)	14.11 ± 6.4	24.824±13.342	Sinerjistik
Apilarnil metanol ekstresi ve 5 µM Kersetin (APLmet+KER5)	12.86 ± 1.84	4.243±3.533	Antagonistik
Apilarnil metanol ekstresi ve 2.5 µM Kurkumin (APLmet+KUR2.5)	14.71 ± 0.25	4.505±3.541	Antagonistik
Askorbik asit	0.00959±0.003	-	-

4.2.2. Bakır (II) İyonu İndirgeyici Antioksidan Kapasite

Saf ve kombine ürünlerin bakır indirgeme kapasitesi, CUPRAC testi ile belirlendi. Her bir örneğin gram örnek başına düşen milimolar Troloks eşdeğeri antioksidan kapasitesi (mM TEAC/g) Şekil 4.33’de gösterilen standart grafik yardımıyla hesaplanarak saf ve kombine ürünlere ait elde edilen veriler Tablo 4.14’de sunuldu. Etkileşim türü, kombinasyonun Troloks eşdeğeri antioksidan kapasitesi (“gözlemlenen değer”), her bir bileşenin matematiksel toplamına (“beklenen değer”) eşitse *Aditif*, küçükse *Sinerjistik* ve büyükse *Antagonistik* olarak değerlendirildi (Sentkowska ve Pyrzyńska, 2019).

Elde edilen bulgulara göre en yüksek bakır iyonu indirgeme özelliğine sahip örnekler saf maddelerden kersetin (KER) (4.799 ± 2.78 mM TEAC/g) ve rosmarinik asit (ROS) (3.241 ± 1.84 mM TEAC/g) olarak bulundu. Kersetin ve rosmarinik asiti takiben en yüksek bakır iyonu indirgeme özelliğine sahip kombine ürünler sırasıyla KB+KER10 (2.422 ± 0.23 mM TEAC/g), KB+KER5 (1.636 ± 0.21 mM TEAC/g) ve KPmet+KUR5 (1.112 ± 0.21 mM

TEAC/g) olarak hesaplandı. Diğer saf ve kombine ürünlerin en düşük ve en yüksek bakır iyonu indirgeme kapasitesi $0.048 \pm 0.03 - 0.982 \pm 0.21$ mM TEAC/g değerleri arasında bulundu.



Şekil 4.33: Troloks standart eğrisi grafiği.

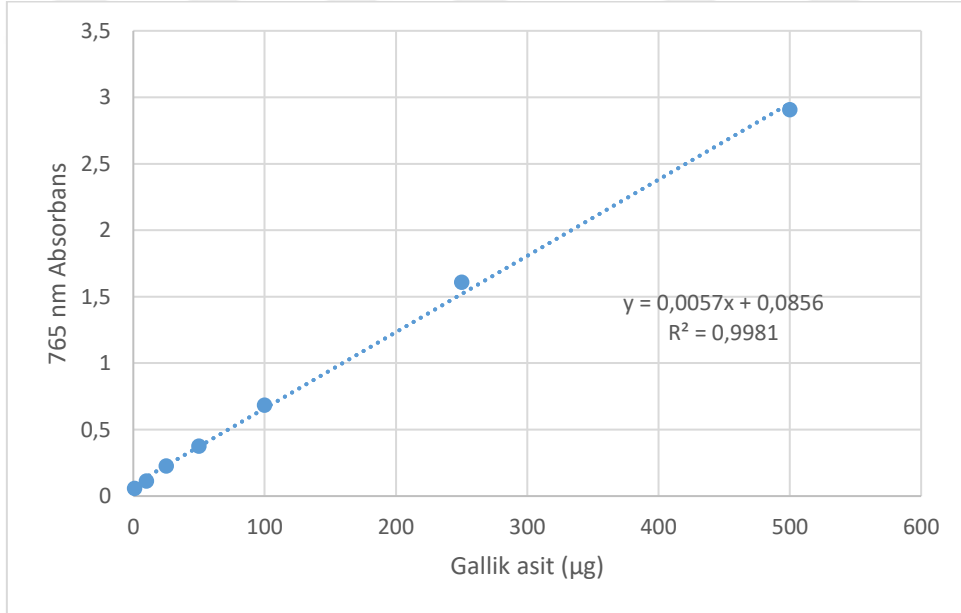
Tablo 4.14: Saf ve kombine ürünlerin CUPRAC değerleri.

Saf ve kombine ürünler	Gözlenen değer (mM TEAC/g)	Beklenen değer (mM TEAC/g)	Etkileşim türü
Kestane Balı (KB)	0.571 ± 0.27	-	-
Kestane Polenı metanol ekstresi (KPmet)	0.765 ± 0.22	-	-
Arı sütü (RJ)	0.048 ± 0.03	-	-
Apilarnil metanol ekstresi (APLmet)	0.374 ± 0.27	-	-
Kersetin 10 µM (KER10)	4.799 ± 2.78	-	-
Kersetin 5 µM (KER5)	1.687 ± 1.24	-	-
Kurkumin 25 µM (KUR25)	1.29 ± 0.57	-	-
Kurkumin 10 µM (KUR10)	0.64 ± 0.29	-	-
Kurkumin 5 µM (KUR5)	0.323 ± 0.25	-	-
Kurkumin 2.5 µM (KUR2.5)	0.31 ± 0.15	-	-
Rosmarinik asit 25 µM (ROS25)	3.241 ± 1.84	-	-
Rosmarinik asit 2.5 µM (ROS2.5)	0.378 ± 0.13	-	-
Kestane Balı ve 10 µM Kurkumin (KB+KUR10)	0.294 ± 0.21	1.211 ± 0.56	Antagonistik
Kestane Balı ve 2.5 µM Rosmarinik asit (KB+ROS2.5)	0.949 ± 0.21	0.949 ± 0.40	Aditif
Kestane Balı ve 10 µM Kersetin (KB+KER10)	2.422 ± 0.23	5.370 ± 3.05	Antagonistik
Kestane Polenı metanol ekstresi ve 5 µM Kurkumin (KPmet+KUR5)	1.112 ± 0.21	1.108 ± 0.47	Aditif
Arı sütü ve 25 µM Kurkumin (RJ+KUR25)	0.170 ± 0.02	1.338 ± 0.60	Antagonistik
Arı sütü ve 25 µM Rosmarinik asit (RJ+ROS25)	0.399 ± 0.24	3.289 ± 1.87	Antagonistik
Arı sütü ve 10 µM Kersetin (RJ+KER10)	0.219 ± 0.21	4.847 ± 2.81	Antagonistik
Apilarnil metanol ekstresi ve 5 µM Kersetin (APLmet+KER5)	0.523 ± 0.21	2.061 ± 1.51	Antagonistik
Apilarnil metanol ekstresi ve 2.5 µM Kurkumin (APLmet+KUR2.5)	0.392 ± 0.21	0.684 ± 0.42	Antagonistik

4.2.3. Toplam Fenolik Madde Tayini (TPC)

Saf ve kombine ürünlerin Folin-Ciocalteu yöntemine göre ölçülen absorbans değerleri, Şekil 4.15 'de oluşturulan gallik asit standart eğrisine göre hesaplandı. Saf ve kombine ürünlerin toplam fenolik içerikleri gallik asit eşdeğeri olarak hesaplandı ve elde edilen sonuçlar Tablo 4.34' de verildi. Aynı tabloda kombine ürünlerin gözlemlenen değerleri, her bir bileşenin beklenen değerleri (saf maddelerin TPC'lerinin matematiksel toplamı) ile karşılaştırılarak etkileşim türleri (sinerjistik, antagonistik ve aditif) sunuldu (Uduwana ve diğ., 2023).

Saf ve kombine ürünlerden en yüksek toplam fenolik içeriğe sahip örnek RJ+ROS25 kombinasyonu (854.971 ± 0.13 mg GAE/100 g) bulundu. Saf ürünlerden en yüksek toplam fenolik içeriğe sahip örnek KER (738.012 ± 0.11 mg GAE/100 g) olarak hesaplandı. Kombinasyon ürünlerden toplam fenolik içeriği en yüksek ikinci örnek KB+KER10 (726.316 ± 0.22 mg GAE/100 g) olarak bulundu. Diğer saf ve kombine ürünlerin en düşük ve en yüksek toplam fenolik içeriği 107.719 ± 2.50 - 550.877 ± 0.12 mg GAE/100 g arasında değiştiği bulundu.



Şekil 4.34: Gallik asit standart eğrisi grafiği.

Tablo 4.15: Saf ve kombine ürünlerin toplam fenolik içeriği

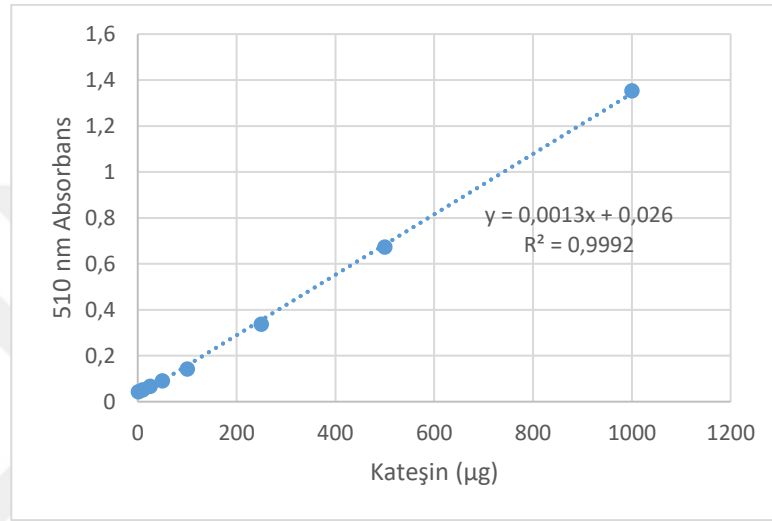
Saf ve kombine ürünler	Gözlemlenen Değer (mg GAE/100 g)	Beklenen Değer (mg GAE/100 g)	Etkileşim Türü
Kestane Balı (KB)	107.719±2.50	-	-
Kestane Polenli metanol ekstresi (KPmet)	264.211±0.06	-	-
Arı sütü (RJ)	125.263±0.15	-	-
Apilarnil metanol ekstresi (APLmet)	273.684±0.07	-	-
Kersetin 10 µM (KER10)	862.175±0.25	-	-
Kersetin 5 µM (KER5)	738.012±0.11	-	-
Kurkumin 25 µM (KUR25)	437.094±1.75	-	-
Kurkumin 10 µM (KUR10)	311.111±0.01	-	-
Kurkumin 5 µM (KUR5)	86.217±7.65	-	-
Kurkumin 2.5 µM (KUR2.5)	78.46±2.41	-	-
Rosmarinik asit 25 µM (ROS25)	550.877±0.12	-	-
Rosmarinik asit 2.5 µM (ROS2.5)	42.357±3.18	-	-
Kestane Balı ve 10 µM Kurkumin (KB+KUR10)	533.333±0.11	418.83±2.51	Sinerjistik
Kestane Balı ve 2.5 µM Rosmarinik asit (KB+ROS2.5)	357.895±0.10	150.076±5.68	Sinerjistik
Kestane Balı ve 10 µM Kersetin (KB+KER10)	726.316±0.22	969.894±2.75	Antagonistik
Kestane Polenli metanol ekstresi ve 5 µM Kurkumin (KPmet+KUR5)	275.322±0.06	350.428±7.71	Antagonistik
Arı sütü ve 25 µM Kurkumin (RJ+KUR25)	328.655±0.10	562.357±1.90	Antagonistik
Arı sütü ve 25 µM Rosmarinik asit (RJ+ROS25)	854.971±0.13	676.15±0.27	Sinerjistik
Arı sütü ve 10 µM Kersetin (RJ+KER10)	362.573±0.08	987.438±0.40	Antagonistik
Apilarnil metanol ekstresi ve 5 µM Kersetin (APLmet+KER5)	205.848±0.09	1011.696±0.18	Antagonistik
Apilarnil metanol ekstresi ve 2.5 µM Kurkumin (APLmet+KUR2.5)	478.363±0.05	352.144±2.47	Sinerjistik

4.2.4. Toplam Flavonoid Tayini (TFC)

Saf ve kombine ürünlerin toplam flavonoid içeriğini belirlemek için ölçülen absorban değerleri Şekil 4.35’de verilen kateşin standart eğrisine göre hesaplandı. Sonuçlar kateşin eşdeğeri olarak Tablo 4.16’da sunuldu. Aynı tabloda kombine ürünlerin gözlemlenen değerleri, her bir bileşenin beklenen değerleri (saf maddelerin TFC’lerinin matematiksel toplamaları) ile karşılaştırılarak etkileşim türleri (sinerjistik, antagonistik ve aditif) verildi (Uduwana ve diğ., 2023).

Saf ve kombine ürünlerden en yüksek toplam flavonoid içeriğe sahip kombine ürün RJ+ROS25 38.461±0.076 mg CAE/100 g olarak bulundu. Takiben kombine ürünlerden

RJ+KUR25 26.410±0.047 mg CAE/100 g ve KPmet+KUR5 26.153±0.06 mg CAE/100 g olarak hesaplandı. Fitokimyasalların toplam flavonoid içeriği (ROS, KUR ve KER) sırasıyla 20.832±0.003, 20.062±0.001 ve 19.914±0.004 mg CAE/100 g bulundu. Kombinasyonlardan KB+ROS5 (20±0.052 mg CAE/100 g) en yüksek flavonoid içeriğe sahip dördüncü ürün olarak yer aldı. Diğer saf ve kombine ürünlerin en düşük ve en yüksek toplam flavonoid içeriği 11.794±0.041-17.692±0.049 mg CAE/100 g arasında değiştiği bulundu.



Şekil 4.35: Kateşin standart eğrisi grafiği.

Tablo 4.16: Saf ve kombine ürünlerin toplam flavonoid içeriği

Saf ve kombine ürünler	Gözlemlenen değer (mg CAE/100 g)	Beklenen değer (mg CAE/100 g)	Etkileşim türü
Kestane Balı (KB)	13.333±0.04	-	-
Kestane Polenli metanol ekstresi (KPmet)	12.820±0.042	-	-
Arı sütü (RJ)	12.820±0.04	-	-
Apilarnil metanol ekstresi (APLmet)	11.794±0.041	-	-
Kersetin 10 µM (KER10)	38.26±2.61	-	-
Kersetin 5 µM (KER5)	19.914±3.45	-	-
Kurkumin 25 µM (KUR25)	29.41±0.78	-	-
Kurkumin 10 µM (KUR10)	20.062±0.017	-	-
Kurkumin 5 µM (KUR5)	9.030±1.05	-	-
Kurkumin 2.5 µM (KUR2.5)	4.619±2.29	-	-
Rosmarinik asit 25 µM (ROS25)	20.832±0.003	-	-
Rosmarinik asit 2.5 µM (ROS2.5)	7.028±2.5	-	-
Kestane Balı ve 10 µM Kurkumin (KB+KUR10)	14.871±0.04	33.395±0.057	Antagonistik
Kestane Balı ve 2.5 µM Rosmarinik asit (KB+ROS2.5)	20±0.052	20.361±2.54	Aditif
Kestane Balı ve 10 µM Kersetin (KB+KER10)	14.359±0.044	51.593±2.65	Antagonistik
Kestane Polenli metanol ekstresi ve 5 µM Kurkumin (KPmet+KUR5)	26.153±0.06	21.850±1.092	Sinerjistik
Arı sütü ve 25 µM Kurkumin (RJ+KUR25)	26.410±0.047	42.130±1.56	Antagonistik
Arı sütü ve 25 µM Rosmarinik asit (RJ+ROS25)	38.461±0.076	33.652±0.043	Sinerjistik
Arı sütü ve 10 µM Kersetin (RJ+KER10)	17.692±0.049	51.080±2.65	Antagonistik
Apilarnil metanol ekstresi ve 5 µM Kersetin (APLmet+KER5)	16.884±0.46	31.708±3.49	Antagonistik
Apilarnil metanol ekstresi ve 2.5 µM Kurkumin (APLmet+KUR2.5)	12.051±0.041	16.213±0.051	Antagonistik

4.3. *İn Vitro* Anti-Asetilkolinesteraz Aktivite Testi

Saf ve kombine ürünlerin Anti-AChE aktivitesini belirlemek için ölçülen absorbands değerleri donepezil standart eğrisine göre hesaplandı. Sonuçlar Tablo 4.17’de sunuldu. Kombinasyon indeksi Čilerdžić ve diğ. (2019) çalışmalarında tarif edildiği gibi denklem 4.1’e göre hesaplandı. Sonuçlara göre, $CI \geq 1.3$ ise *Güçlü Antagonistik* etki, $1.1 \leq CI \leq 1.3$ ise *Orta Derecede Antagonistik* etki, $0.9 \leq CI \leq 1.1$ ise *Aditif* etki, $0.7 \leq CI \leq 0.9$ ise *Orta Derecede Sinerjistik* etki, $CI \leq 0.7$ ise *Güçlü Sinerjistik* etki olarak derecelendirilme yapıldı.

$$CI = \frac{\text{Gözlenen (deneysel) değer}}{\text{Beklenen değer}} \quad (\text{Denklem 4.1})$$

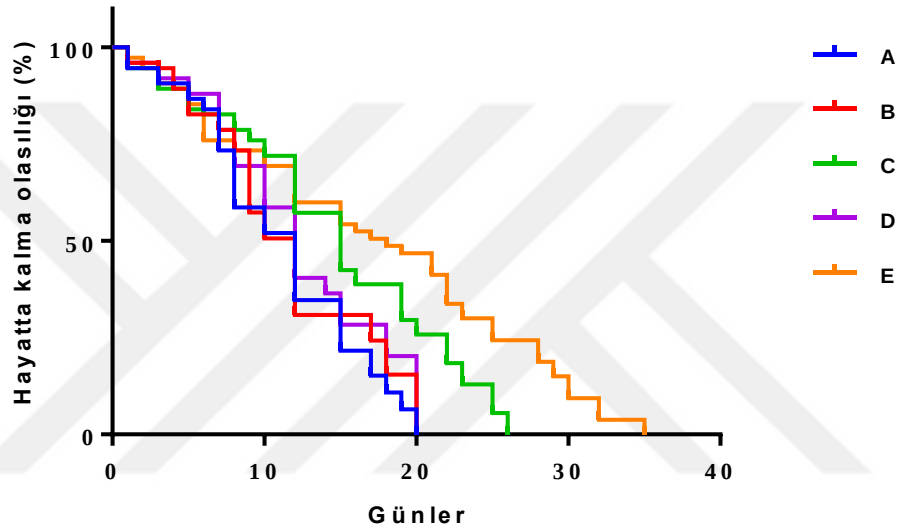
Saf ve kombine ürünlerin AChE aktiviteleri donepezil standardı ile karşılaştırıldığında, daha yüksek AChE aktivitesine sahip oldukları bulundu. Kombine ürünlerden RJ+KER10 ve KPmet+KUR5 en yüksek AChE ($CI=0.35$) aktivitesine sahip kombinasyon olarak belirlendi ($*p > 0.05$).

Tablo 4.17: Saf ve kombine ürünlerin AChE aktivitesi.

Saf ve kombine ürünler	Anti-AChE aktivitesi (IC ₅₀ mg/mL)	Kombinasyon indeksi (CI)	Etkileşim türü
Kestane Balı (KB)	3.16±2.36	-	-
Kestane Poleni metanol ekstresi (KPmet)	5.17±0.61	-	-
Arı sütü (RJ)	5.13±2.68	-	-
Apilarnil metanol ekstresi (APLmet)	4.19±0.22	-	-
Kersetin 10 µM (KER10)	0.34±0.29	-	-
Kersetin 5 µM (KER5)	3.37±0.49	-	-
Kurkumin 25 µM (KUR25)	0.034±0.02	-	-
Kurkumin 10 µM (KUR10)	0.51±0.23	-	-
Kurkumin 5 µM (KUR5)	2.56±0.48	-	-
Kurkumin 2.5 µM (KUR2.5)	0.33±0.13	-	-
Rosmarinik asit 25 µM (ROS25)	0.507±0.18	-	-
Rosmarinik asit 2.5 µM (ROS2.5)	2.54±0.64	-	-
Kestane Balı ve 10 µM Kurkumin (KB+KUR10)	1.68±0.66	0.45	Güçlü sinerjistik
Kestane Balı ve 2.5 µM Rosmarinik asit (KB+ROS2.5)	2.11±0.23	0.40	Güçlü sinerjistik
Kestane Balı ve 10 µM Kersetin (KB+KER10)	3.56±1.55	1.00	Aditif
Kestane Poleni metanol ekstresi ve 5 µM Kurkumin (KPmet+KUR5)	2.71±0.74	0.35	Güçlü sinerjistik
Arı sütü ve 25 µM Kurkumin (RJ+KUR25)	2.65±0.79	0.51	Güçlü sinerjistik
Arı sütü ve 25 µM Rosmarinik asit (RJ+ROS25)	3.53±0.95	0.62	Güçlü sinerjistik
Arı sütü ve 10 µM Kersetin (RJ+KER10)	1.92±0.15	0.35	Güçlü sinerjistik
Apilarnil metanol ekstresi ve 5 µM Kersetin (APLmet+KER5)	2.89±1.44	0.38	Güçlü sinerjistik
Apilarnil metanol ekstresi ve 2.5 µM Kurkumin (APLmet+KUR2.5)	3.76±1.12	0.83	Orta derecede sinerjistik
Donepezil	6.20±0.92	-	-

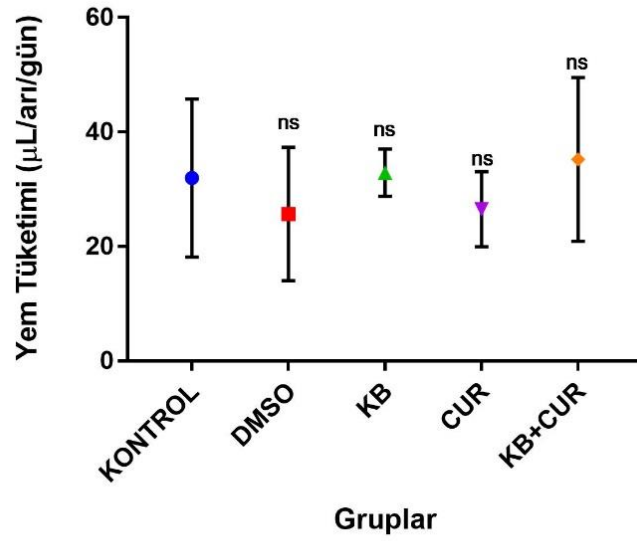
4.4. İN VİTRO BAL ARISI MODELİ

Diyetlerine kestane balı-kurkumin kombinasyonu eklenen ve 3 saat 45°C’de bekletilerek ısı stresine sokulan bal arılarının yaşam süresi kontrol grubuna göre %50 oranında artmaktadır. Kombine uygulamanın yaşam süresini artırıcı etkisi (18 gün) tek başına kestane balından (15 gün), tek başına kurkuminden (12 gün), kontrol ve DMSO gruplarındakinden (12 gün) daha fazla bulunmuştur ($X^2=42.67$, **** $p<0.0001$).



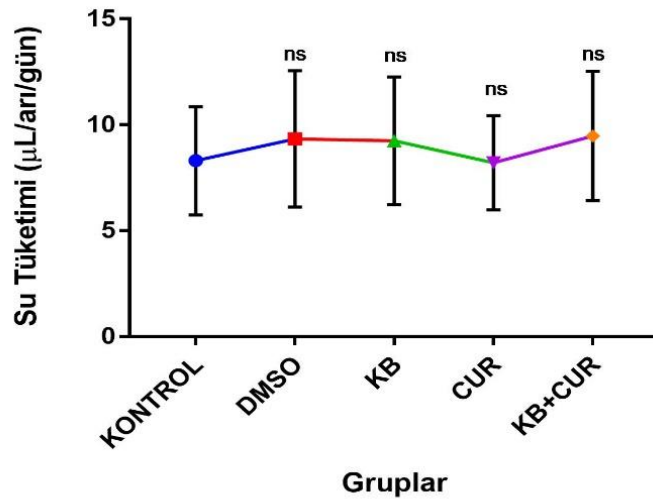
Şekil 4.36: Bal arılarının hayatta kalma olasılığı (%)

Farklı diyetlerle beslenen bal arılarının günlük yem tüketimi Kontrol, DMSO, Kestane balı (KB), Kurkumin (CUR) ve Kestane Balı + Kurkumin (KB+CUR) gruplarında Şekil 4.37’ de gösterildiği gibi sırasıyla $31.97 \pm 13.81 \mu\text{L}$, $25.69 \pm 11.66 \mu\text{L}$, $32.89 \pm 4.12 \mu\text{L}$, $26.52 \pm 6.52 \mu\text{L}$ ve $35.21 \pm 14.21 \mu\text{L}$ olarak bulunmuştur. Gruplar arasındaki fark istatistiki olarak önemsiz bulunmuştur ($p>0.05$).



Şekil 4.37: Farklı diyetlerle beslenen bal arılarının günlük yem tüketimi.

Farklı diyetlerle beslenen bal arılarının günlük su tüketimi Kontrol, DMSO, Kestane balı (KB), Kurkumin (CUR) ve Kestane Balı + Kurkumin (KB+CUR) gruplarında Şekil 4.38’ de gösterildiği gibi sırasıyla $8.30 \pm 2.55 \mu\text{L}$, $9.33 \pm 3.22 \mu\text{L}$, $9.24 \pm 3.01 \mu\text{L}$, $8.20 \pm 2.22 \mu\text{L}$ ve $9.47 \pm 3.04 \mu\text{L}$ olarak bulunmuştur. Gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak önemsiz bulunmuştur ($p > 0.05$).



Şekil 4.38: Farklı diyetlerle beslenen bal arılarının günlük su tüketimi.

1 günlük yaştaki bal arılarının ortalama canlı vücut ağırlıkları hesaplanmıştır. Belirtilen gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamsız bulunmuştur ($p > 0.05$). A (Kontrol), B

(DMSO), C (CH), D (CUR) ve E (CH+CUR) grupları sırasıyla 107.9 ± 9.23 mg, 104.9 ± 7.08 mg, 106.1 ± 13.66 mg, 107.7 ± 7.39 mg, ve 105.2 ± 6.65 mg olarak hesaplanmıştır. Zerdeçal (D) grubundaki bal arılarının ortalama canlı ağırlıkları diğer beslenen gruplara göre istatistiksel olarak daha düşük bulunmuştur ($****p < 0.0001$ ve $####p < 0.0001$). A, B, C, D ve E grupları sırasıyla 79.5 ± 6.23 mg, 74.57 ± 10.35 mg, 85.45 ± 6.94 mg, 52.79 ± 8.08 mg ve 76.96 ± 12.87 mg olarak hesaplandı. A, B, C ve E grupları arasındaki fark istatistiksel olarak anlamsız bulunmuştur ($p > 0.05$).



5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Literatürde bal arısı ürünlerinin ve fitokimyasallarla oluşturulmuş kombinasyonlarının fibroblast hücreleri üzerinde sitotoksik aktivitelerine yönelik yapılan çalışmalar sınırlıdır (Zi Yun ve diğ., 2021; Akmar ve diğ., 2022; Rizqi ve Amestiasih, 2020). Mevcut çalışmalar elde edilen verilerle karşılaştırılarak sunulmuştur.

Bu tez çalışmasında, NIH3T3 hücrelerine 24 saat süreyle uygulanan %0.25, %0.5 ve %1 dozlarında uygulanan kestane balının hücre canlılığını sırasıyla 9.5 ± 6.7 , 22.8 ± 6.6 ve 43.8 ± 7.0 oranında artırdığı belirlendi. Daha uzun süre (48 ve 72 saat) uygulamalarda bile hücre canlılığının ≥ 78 olduğu bulundu. Hazırlanmış bütün kombinasyonlarda kestane balı dozu olarak kontrole (%100 canlılığa) en yakın etkilere sahip en düşük doz olan %0.25 kullanıldı. Aynı sürelerde 3.125-200 mg/mL konsantrasyon aralığındaki Malezya balı ile muamele edilen HGF-1 insan diş eti fibroblast hücrelerinin canlılığı %70'in üzerinde bulunmuş ve balın sitotoksik olmadığı bildirilmiştir (Zi Yun ve diğ., 2021). Buna göre söz konusu 3 kestane balı dozunun da NIH3T3 hücreleri için toksik olmadığı söylenebilir. Kellut balı ve Akasya balının %0.015-5 (v/v) çeşitli konsantrasyonlarının HGF fibroblast hücreleri üzerinde sitotoksik etkilerinin araştırıldığı başka bir çalışmada, her iki balın da, IC_{50} değerinin %2 olduğu bildirilmiştir (Akmar ve diğ., 2022). Uygulama süresi aynı (24, 48 ve 72 saat) olmakla birlikte, bal türü, uygulama dozu ve fibroblast hücre tipi farklı olduğundan bu tezde elde edilmiş sonuçlarla birebir bir karşılaştırma yapmak mümkün olamasa da, kestane balının NIH3T3 hücreleri için IC_{80} değeri %20 (w/v) olarak belirlenmiştir.

Çalışmada test edilen daha yüksek bal dozlarının (%2.5, %5, %7.5, %10 ve %20) genel olarak toksik etki gösterdiği, toksisitenin doza ve zamana bağlı olarak arttığı belirlendi. Literatürde çeşitli balların farklı hücreler, özellikle de kanser hücreleri üzerindeki toksik etkisini rapor eden birçok çalışmaya rastlanmıştır. Balın sitotoksitesinden sorumlu ana bileşenlerin fenolik veya flavonoid yapıdaki krisin, kamferol, kateşin, galangin, mirisetin, kaffeik asit, siringik asit, klorojenik asit, gallik asit ve ferulik asit gibi fitokimyasallar olduğu; etki mekanizmalarının ise hücre döngüsünün durdurulması ve mitokondriyal yol aktivasyonu (mitokondriyal dış zar geçirgenliği, apoptoz indüksiyonu, oksidatif stres ve insülin sinyal modülasyonu, inflamasyon ve östrojenik aktivitenin artırılması) olduğu ileri sürülmektedir

(Erejuwa ve diğ., 2014; Porcza ve diğ., 2016; Imtara ve diğ., 2019; Waheed ve diğ., 2019). Bu tezde her ne kadar balın sitotoksik olmayan dozları kullanılmış olsa da, doz belirleme çalışmaları sırasında gözlemlenmiş toksik dozların, literatürde belirtildiği gibi, yüksek fenolik ve flavonoid içeriğinden kaynaklanabileceği öngörülmektedir. Buna ek olarak, balın içeriğindeki yüksek şeker oranının da (fruktoz+glukoz, %57.1) ileri glikasyon son ürünlerinin (“AGE’ler, “advanced glycation end products”) oluşumunu artırarak toksik etki gösterebileceği sonucuna varılmıştır (Pang ve diğ., 2016; Abel ve Baird, 2018).

Bu çalışmada kestane poleninden hazırlanmış metanol ekstresi, uygulama dozu ve süresine göre hücreler üzerinde farklı etkiler yaratmıştır. Bu örneklerin 25-100 µg/mL konsantrasyonları en uzun uygulama süresinde dahi toksik bir etki göstermemiştir. Ancak test edilen en yüksek dozu (1000 µg/mL) en uzun uygulama süresinde (72 saat) hücre canlılığını %53 oranında azaltmıştır. Kombinasyon çalışmalarında polen örneklerinin de proliferasyon veya inhibisyon etkisi göstermeyen en yüksek dozu (10 µg/mL) kullanılmıştır. Literatürde kestane balının sitotoksitesini rapor eden bir çalışmaya rastlanmamıştır. Genel olarak arı poleninin sitotoksitesine ilişkin çalışmalar da yok denecek kadar azdır (Wu ve diğ., 2007; Omar ve diğ., 2016). *Brassica campestris* poleninden steroid içeren bir kloroform ekstresinin prostat kanseri hücreleri üzerinde toksik etki gösterdiği bildirilmiştir (Wu ve diğ., 2007). Omar ve diğ. (2016)’nin çalışmasındaki arı poleni ise Malezya’ya özgü olup insan fibroblast hücrelerinin (L929) canlılığını %70 oranında azaltan metanol ekstresinin konsantrasyonu oldukça yüksektir (40 mg/mL). Her iki çalışmada da farklı örnekler ve hücreler kullanıldığından tezde elde edilmiş orijinal verilerle karşılaştırma yapmak mümkün olmamıştır.

Bu çalışmada arı sütünün (RJ) test edilen tüm konsantrasyonları (1-1000 µg/mL) nispeten kısa uygulama sürelerinde (24 ve 48 saat) NIH3T3 hücrelerinin canlılığını artırmış ya da kontrole yakın etkiler göstermiştir. Ancak, yüksek doz (250-1000 µg/mL) ve uzun süreli (72 saat) uygulamalar hücre canlılığını en fazla %13.4 oranında azaltmıştır. Kombine örneklerdeki polen konsantrasyonu, proliferasyona veya inhibisyona yol açmayan en yüksek doz olan 10 µg/mL’dir. Kim ve diğ. (2010), 0.1-5 µg/mL konsantrasyon aralığındaki arı sütü örnekleriyle 48 saat işleme sokulan insan dermal fibroblast (HDFn) hücrelerinin >%90 canlı kaldığını bildirmektedir. Fibroblast hücrelerinin kökeni ve test materyalleri aynı olmamakla birlikte, bu çalışma ile ortak tek doz (1 µg/mL) ve süre (48 saat) verilerimiz rapor edilen bulgularla

uyumludur. İnsan embriyonik akciğer fibroblast (MRC-5) hücreleriyle yürütölmüş başka bir çalışmada da benzer sonuçlar alınmıştır (Jovanovic ve diğ., 2018).

Tezdeki son arı ürünü olan apilarnilin sitotoksitesisi ile ilgili herhangi bir literatüre rastlanmamıştır. Dolayısıyla bu çalışma apilarnilden hazırlanmış metanol ekstresinin hücreler üzerindeki toksik etkilerinin araştırıldığı ilk çalışma olarak değerlendirilebilir. Uygulanan en yüksek dozun (1000 µg/mL) orta ve uzun vadede (48 ve 72 saat) hücre canlılığını çok belirgin şekilde (%88.4 oranında) azalttığı belirlenmiştir. Diğer örneklerde olduğu gibi kombinasyonlarda bu örneğin de proliferasyona veya inhibisyona yol açmayan en yüksek dozu (10 µg/mL) kullanılmıştır.

Çalışmamızda, arı ürünleri ile kombine edilerek kullanılan fitokimyasallar kersetin, kurkumin ve rosmarinik asittir.

Bunlardan fibroblast hücrelerine uygulanan kersetinin (KER) IC₅₀ değerine ilişkin farklı literatür verilerine rastlanmıştır. Matsuo ve diğ. (2005), insan embriyonik akciğer fibroblast (TIG-1) hücreleri için bu değeri 303 µM olarak rapor ederken, Danihelová ve diğ. (2013) NIH3T3 hücreleri için 20.9 µM olarak bildirmektedir. Bu tezde elde edilen sonuç (250 µM) ilk referans (Matsuo ve diğ., 2005) ile uyumludur. Hücre tipi bu tez çalışmasındaki ile aynı olmasına rağmen ikinci referanstan (Danihelová ve diğ., 2013) yaklaşık 10 kat daha yüksek bulunmuş IC₅₀ değeri, yüksek olasılıkla kullanılan saf maddenin kersetin değil, onun bir türevi olmasından kaynaklanmaktadır (Öztürk ve diğ., 2023). Bu çalışmada sabit konsantrasyondaki her bir arı ürünü ile kersetinin hücreler üzerinde toksik etki göstermeyen düşük konsantrasyonları (1-25 µM arasındaki 5 farklı konsantrasyonu) ile çalışılmıştır.

Kurkuminin (KUR) test edilen konsantrasyonları (1-250 µM) arasında tüm uygulama süreleri için 25 µM'dan itibaren toksik etki gözlenmiştir. Bu nedenle kombinasyonlarda 1-25 µM aralığındaki 5 doz test edilmiştir. Literatürde fibroblast hücrelerine 24 saat süreyle uygulanan kurkuminin IC₅₀ değeri 27.59 µM olarak rapor edilmektedir (Waghela ve diğ., 2015). Bizim çalışmamızda bu değer 38.11±5.03 µM olarak bulunmuştur. İki değer arasındaki farkın kullanılan saf kurkumin örneklerinin aynı olmamasından kaynaklandığı düşünülmektedir. Kurkuminin toksik etkisi aynı hücre tipi olsa bile hücrenin kökenine göre değişebilir. Örneğin, 24 saat süreyle 20 µM kurkumin uygulanan insan dermal fibroblast (HDF) hücrelerinde canlılık oranı %43 bulunmuştur (Cianfruglia ve diğ., 2019). Bu çalışmada ise,

fare embriyonik fibroblast hücreleri aynı sürede 25 μ M kurkumine maruz kaldığında canlılık %83.4 olarak bulunmuştur. Bu sonuçlara göre, kurkuminin insan dermal fibroblast (HDF) hücreleri için daha toksik olduğu söylenebilir.

Bu çalışmada rosmarinik asitin (ROS) 1-250 μ M uygulama dozlarından hiçbiri 24 saatlik uygulamalarda NIH3T3 hücreleri üzerinde toksik bir etki göstermemiştir. Hatta düşük dozları (10 ve 25 μ M) hücre canlılığını kontrol grubuna göre sırasıyla %22.1 $\pm$ 4.30 ve %27.7 $\pm$ 7.11 artırmış ve kombinasyonlarda 1-25 μ M aralığında yer alan 5 doz kullanılmıştır. Rosmarinik asitin insan dermal fibroblast (HDF) hücreleri üzerindeki etkisi bu çalışmadakinden farklıdır. Sutkowska ve diğ. (2021) 0.1–100 μ M konsantrasyon aralığında 24 saatlik rosmarinik asit uygulamasının hücre canlılığı üzerinde anlamlı bir proliferatif ve/veya sitotoksik etkisi bulunmadığını bildirmektedir. Bu verilere göre test edilen kombinasyonlardaki ROS konsantrasyonlarının en azından fibroblast hücreleri için rapor edilen non-toksik değerler arasında kaldığı sonucuna varılmıştır.

Bu kombinasyonların NIH3T3 fare embriyonik fibroblast hücre canlılığı üzerindeki etkileri ilk kez bu tez çalışmasıyla ortaya konmuştur. Bulgular incelendiğinde (bkz. Tablo 4.1 – 4.3 ve Şekil 4.22- 4.24) üç kombinasyonun [%0.25 (w/v) kestane balı (KB) ve 10 μ M kurkumin içeren kombinasyon (KB+KUR10), KB ve 2.5 μ M rosmarinik asit içeren kombinasyon (KB+ROS2.5), KB ve 10 μ M kersetin içeren kombinasyon (KB+KER10)] NIH3T3 hücrelerinin canlılığını belirgin şekilde artırdığı (sırasıyla %79.9 $\pm$ 3.42, %76.9 $\pm$ 10.95 ve %62.5 $\pm$ 1.00); diğer kombinasyonların da hücre canlılığını yaklaşık %30-%53 oranında artırdığı anlaşılmıştır. Kombinasyonların fibroblast hücreleri üzerindeki proliferasyon artırıcı etkisi, deri yenilenmesi ve yara iyileşmesi ile ilişkili olup bu çalışmada yer alan fitokimyasalların sahip olduğu bir özelliktir (Chittasupho ve diğ., 2021; Hasham ve diğ., 2023). Bal ve *Aloe vera* ekstresinden oluşan kombinasyonların NIH3T3 fibroblast hücre canlılığını ortalama olarak %86.13 oranında artırdığı rapor edilmektedir (Rizqi ve Amestiasih, 2020). Bu kombinasyonun nispeten yüksek proliferatif etkisi, içerdiği balın farklılığı ile bitkisel bileşenin bir karışım olmasından ve birden fazla biyoaktif fitokimyasal içermesinden ileri geliyor olabilir. Ancak kombinasyonlarda ekstre yerine saf madde kullanılmasının standardizasyon açısından çok daha yararlı olacağı düşünülmektedir.

Antioksidan aktivite çalışmalarının en önemli bulgularından biri, 10 μ g/mL arı sütü (RJ) ve 25 μ M rosmarinik asit içeren kombinasyonun (RJ+ROS25) test edilen örnekler içinde DPPH

süpürme aktivitesi en yüksek kombinasyon olmasıdır. Arı sütü, tüm arı ürünleri içinde en düşük radikal süpürme aktivitesine sahipken, rosmarinik asitle kombine edildiğinde daha etkin bir ürün elde edilebilmektedir (bkz. Tablo 4.13). Bunun nedeni, rosmarinik asitin çok güçlü bir radikal süpürücü antioksidan olmasıdır (Hitl ve diğ., 2021) ve arı sütünün içindeki bileşenlerle sinerjistik bir etki ortaya koymasındır. Nitekim, arı sütündeki total fenolik ve flavonoidler rosmarinik asitle sinerjistik etkileşim göstermektedir (bkz. Tablo 4.15 ve Tablo 4.16). Kurkumin ve kersetin de arı sütüyle sinerjistik etkileşim göstermesine rağmen, bu fitokimyasallarla hazırlanan arı sütü kombinasyonları (RJ+KUR25 ve RJ+KER10) radikal süpürmede RJ+ROS25 kombinasyonundan daha az etkilidir (bkz. Tablo 4.13). Arı ürünleri tek tek ele alındığında, arı sütü radikal süpürme aktivitesi bakımından en geri olandır. Arı sütü için aynı birimlerle ifade edilmiş DPPH IC₅₀ değerlerinin rapor edildiği referanslar incelendiğinde, bu çalışmada bulduğumuz değerden (24.732 ± 13.34 mg/mL) daha düşük (7.94 ± 0.43 mg/mL), yani daha etkin bir örnek bulunduğu gibi (Sonmez ve diğ., 2023), daha yüksek (113.5 ± 46.8 mg/mL), yani daha az etkili bir örnek de vardır (Kolaylı ve diğ., 2016b). Aktiviteler arasındaki bu fark, toplam fenolik içeriklerindeki farkla açıklanabilir. Üretici işçi arı ırkının farklı olması ve yaşadığı bölgede değişik besin kaynaklarının bulunması arı sütünün kimyasal içeriğine etki eden en önemli faktörlerdir. Genel olarak radikal süpürme aktivitesi yüksek olan ürünlerde toplam fenolik ve/ya flavonoid içeriği de yüksek olmaktadır. Arı sütünün ve fitokimyasallarla hazırlanmış tüm kombinasyonlarının bakır (II) iyonlarını indirgeme kapasitesi, incelenen tüm ürünler arasında en düşükler arasında yer almaktadır.

Bakır (II) iyonlarını indirgeme kapasitesi fitokimyasallarla artan sadece 2 kombinasyon vardır. Aditif etkileşim gösteren bu kombinasyonlar 10 µg/mL kestane poleni metanol ekstresi (KPmet) ve 5 µM kurkumin içeren kombinasyon (KPmet+KUR5) ve %0.25 (w/v) kestane balı (KB) ve 2.5 µM rosmarinik asit içeren kombinasyon (KB+ROS2.5)'dur. Bu kombinasyonlarda yer alan arı ürünleri tek başlarına da CUPRAC değeri en yüksek olanlarken, kurkumin ve rosmarinik asitle kombine edildiklerinde CUPRAC değerleri aditif şekilde artmaktadır (bkz. Tablo 4.14). Bu artışta ilk kombinasyon için total flavonid içeriğindeki, ikinci kombinasyon içinse total fenolik içeriğindeki sinerjistik etkileşim rol oynuyor olabilir (bkz. Tablo 4.15 ve Tablo 4.16). KPmet'in CUPRAC değeri tek başına 0.765 ± 0.22 mM TEAC/g iken, kombinasyonda kurkuminin aditif etkisiyle 1.112 ± 0.21 mM TEAC/g'a çıkmaktadır. Literatürde bu verileri karşılaştıracak arı ürünleriyle ilgili bir referansa rastlanmamıştır. Ancak bu örnek, en azından bazı çay (*Camellia sinensis*)

örneklerinden daha etkili bir indirgen gibi durmaktadır (Karademir ve diğ., 2006). KB'nin CUPRAC değeri tek başına 0.571 ± 0.27 mM TEAC/g iken, kombinasyonda rosmarinik asitin aditif etkisiyle 0.949 ± 0.21 mM TEAC/g'a çıkmaktadır. Bu çalışmada kullanılan kestane balının CUPRAC değeri, literatürde rapor edilenlerden (Saral, 2018; Suerdem ve diğ., 2018) nispeten düşüktür. Saral (2018) Doğu Karadeniz Bölgesi'nden toplanan kestane balında CUPRAC değerinin 1.37 ± 0.13 - 3.40 ± 0.01 mM TEAC/g arasında değiştiğini bildirmektedir. Kaz Dağlarından (Çanakkale) toplanan bir örneğin CUPRAC değeri ise 1.952 ± 0.08 mM TEAC/g olarak bulunmuştur (Suerdem ve diğ., 2018).

Kombinasyon ürünlerinin anti-AChE aktivitesi kombinasyon indeksine (CI) göre karşılaştırıldığında, en güçlü sinerjistik etkiye sahip kombine ürünler 10 µg/mL arı sütü (RJ) ve 10 µM kersetinden oluşan kombinasyon (RJ+KER10, CI=0.35) ve 10 µg/mL kestane poleni metanol ekstresi (KPmet) ve 5 µM kurkumin içeren kombinasyon (KPmet +KUR5, CI=0.35) olarak bulunmuştur. Bunları üç kombinasyon (APLmet+KER5, CI=0.38; KB+ROS2.5, CI=0.40 ve KB+KUR10, CI=0.45) takip etmektedir. Tüm kombinasyonların anti-AChE aktivitesi ilk kez bu tez çalışmasında ortaya koyulmuştur.

Bu kombinasyonların arı ürünü bileşenlerinden kestane balı (KB) anti-AChE aktivitesi bakımından diğerlerinden üstündür ($IC_{50}=3.16 \pm 2.36$ mg/mL). Polen miktarları %51-81 arasında değişen kestane balı örneklerinin AChE inhibitör aktivitelerinin en yüksek 7.18 ± 0.83 mg/mL ve en düşük 9.95 ± 1.25 mg/mL olduğu bildirilmiştir (Taş-Küçükaydın ve diğ., 2023). Bu çalışmada kullanılan KB örneğinin daha etkili bir AChE inhibitörü olması, elde edildiği bölgedeki flora farklılığının içeriğini zenginleştirmesinden kaynaklanıyor olabilir. Arı sütü (RJ) örneğinin anti-AChE aktivitesi ikinci sırada yer almaktadır ($IC_{50}=5.13 \pm 2.68$ mg/mL). Literatürde arı sütünün anti-AChE aktivitesi ile ilgili tek bir çalışmaya rastlanmıştır. Altı farklı arı sütünün anti-AChE aktivitesinde IC_{50} değerlerinin 0.7-4.6 mg/mL arasında değiştiği bildirilmiştir (El-Guendouz ve diğ., 2020). Aktiviteler arasındaki büyük farklar üretici arı ırkının ve coğrafi bölgenin tamamen değişik olmasıyla açıklanabilir. Kestane poleni metanol ekstresi (KPmet) ile apilarnil metanol ekstresinin (APLmet) anti-AChE aktiviteleri (sırasıyla $IC_{50}=5.17 \pm 0.61$ mg/mL ve $IC_{50}=4.19 \pm 0.22$ mg/mL) ilk kez bu çalışmada rapor edilmiştir.

Fitokimyasallar arasında ise kurkumin (KUR) anti-AChE aktivitesiyle öne çıkmaktadır ($IC_{50}=0.034 \pm 0.02$ mg/mL). Kombinasyonlardaki tüm fitokimyasallar arı ürünlerinin anti-AChE aktivitesini yaklaşık 1-2 kat artırmaktadır.

İklim değışikliğinin ve küresel ısınmanın insan sağlığı üzerindeki etkisi potansiyel olarak yıkıcı olabilir (Crowly, 2016). Çalışmalar, başta çocuklar ve yaşlılar olmak üzere birçok insanın artan sıcaklıklardan olumsuz etkilenebileceğini göstermektedir (Limaye, 2021). Son yıllarda, sağlıklı yaşam süresini uzatmaya yönelik araştırmalar, yaşlanma sürecini bir dereceye kadar geciktirebilecek diyet, yaşam tarzı veya farmasötik müdahalelere odaklanmıştır (Shen ve diğ., 2013).

İklim değışikliğine ve küresel ısınmaya neden olan faaliyetleri kontrol altına alma ve önleme girişimleri son yıllarda hız kazanmasına rağmen, sorunun çözümünde henüz önemli bir ilerleme kaydedilememiştir. Termal stres sadece insanoğlunun değil diğer canlıların da hayatını tehdit etmeye devam etmektedir. Termal stres koşulları altında, yaşlanma ve yaşa bağlı hastalıklar üzerine model organizmalarda yapılan araştırmalar, çeşitli antioksidan diyetlerin *Caenorhabditis elegans*, *Drosophila melanogaster*, *Saccharomyces cerevisiae* ve fare gibi organizmaların ortalama yaşam süresini uzattığını göstermiştir (Liao ve diğ., 2011; Chen ve diğ., 2018; Stepien ve diğ., 2020; Chen ve diğ., 2020).

Bal arısı ekonomik ve ekolojik öneme sahip sosyal bir böcektir ve öğrenme, hafıza ve iş bölümü gibi biyolojik özellikleri onu ideal bir model organizma yapar (Giray ve Robinson, 1994; Zheng ve Hu, 2009). Güncel literatür, bal arılarının oksidatif hasarları artıran ve reaktif oksijen türlerinin (ROS) oluşumunu teşvik eden ısı stresinden olumsuz etkilendiğini ve sıcaklık artışının bu canlıların yaşam sürelerini kısalttığını bildirmektedir (Zhao ve diğ., 2021). Bal arılarında ısı stresi altında beslenme çalışmaları oldukça sınırlıdır. Bu çalışmalar çoğu durumda bal arısı kolonileri üzerinde yapılmıştır. Yüksek kaliteli besin kaynaklarına erişimin sağlanması kovandaki arılar üzerindeki ısı stresinin etkilerini azalttığı bildirilmiştir (Remolina ve diğ., 2007; Vanderplanck ve diğ., 2019).

Literatürde bu alanda yapılmış sadece bir deneysel çalışma bulunmaktadır. Medine ve diğ. (2018), bira mayası ve şeker şurubunun ısı stresine karşı koruyucu etkilerini belirlemek için kafes sistemindeki bal arılarını bu maddelerle besledikten sonra ısı stresi uygulamış ve yaşam sürelerini araştırmışlardır. Bu tezde de benzer bir yaklaşımla, bal arısı deneysel ısı stresi modeli kurulmuş ve besin takviyesi olarak, özellikle anti-AChE aktivitesi ve proliferatif etkisi iyi çıkan ve ekonomik olarak en elverişli olan %0.25 (w/v) kestane balı ve 10 µM kurkumin içeren kombinasyonun (KB+KUR10) yaşam süresi üzerindeki etkileri araştırılmıştır. Kafes çalışmalarında sadece %50 (w/v) şeker şurubu ile beslenen (kontrol grubu) işçi bal arıların

ömürlerinin en az 15 gün olduğu bildirilmesine rağmen (Topal ve diğ., 2022; Brown ve diğ., 2022), bu çalışmada kontrol grubu arılar büyük olasılıkla ısı stresinden dolayı 12 gün yaşamıştır. Medine ve diğ. (2018)'nin çalışmasında ısı stresi altındaki arılar ile stres uygulanmamış arıların yaşam süreleri (sırasıyla, 21.70 gün ve 22.79 gün) arasında yalnızca yaklaşık bir gün olduğu belirtilmektedir. Bu arıların çalışmamızdaki arılardan daha uzun yaşamaları, sıcaklık stresinin derecesinin ve süresinin kısa olması ve diyetlerinde şeker şurubunun yanı sıra protein bulunmasından kaynaklanmış olabilir. Bal arılarına sadece kestane balı verildiğinde, yaşam süreleri kontrol grubuna göre %25 oranında (12 günden 15 güne) artmıştır. Kafes çalışmalarında arıları beslemek için balın kullanıldığı sadece birkaç çalışma bulunmaktadır. Wheeler ve Robinson (2014), baldaki bileşenlerin fizyolojik süreçleri farklı şekillerde düzenlediğini göstermiştir. Bir başka kafes çalışmasında multifloral balın kimyasal stres (pestisit stresi) altındaki arıların ömrünü uzattığı saptanmıştır (Hýbl ve diğ., 2021). Verilerimiz, monofloral olmasına rağmen kestane balının da ısı stresi altındaki arılar üzerinde benzer bir etkiye sahip olduğunu göstermektedir.

Düşük konsantrasyonlarda diyet fitokimyasallarıyla beslenen bal arılarının daha uzun süre hayatta kaldığı bildirilmiştir (Bernklau ve diğ., 2019). Kurkumin'in bal arılarında etanolle ilişkili ömür azalmasını tersine çevirdiği bulunmuştur (Rasmussen ve diğ., 2021). Kafeslerdeki kurkumin takviyeli işçi arılarda daha yüksek antioksidan enzim aktivitesi ve daha uzun ömür gözlemlenmiştir (Strachecka ve diğ., 2015). *C. elegans* (Liao ve diğ., 2011), *Drosophila* (Chen ve diğ., 2018), sıçanlar (Chen ve diğ., 2020) ve fareler (Chen ve diğ., 2020) gibi diğer organizmalarda da kurkuminin yaşam süresini uzatan etkisine ilişkin benzer sonuçlar bildirilmiştir. Ancak çalışmamızda, kurkuminin şeker şurubuna eklendiğinde yaşam ömrünü değiştirmediğini gördük; kurkumin grubu ve kontrol grubundaki yaşam süresi aynıydı (12 gün). Kurkuminin en azından burada uygulanan ısı stresi koşulları altında (nispeten yüksek sıcaklık ve uzun maruziyet) yaşam süresi üzerinde olumlu bir etkisinin olmadığı sonucuna varılmıştır. Çalışmamızda diyetlerine sadece kurkumin eklenen gruptaki (D grubu) arıların 10. gündeki ortalama vücut ağırlıkları (52.79 ± 8.08 mg), kontrol grubundaki (A grubu) arıların ağırlığına (79.5 ± 6.23 mg) göre anlamlı derecede düşüktür. Bu sonuç, kurkuminin insanda (Mousavi ve diğ., 2020), diyetle bağlı obez fare modelinde (Lee ve diğ., 2022), besi hayvanlarında ve kümes hayvanlarında (Pan ve diğ., 2022; Salah ve diğerleri, 2021) vücut ağırlığını ve vücut kitle indeksini (VKİ) azalttığını ortaya koyan önceki raporlarla uyumludur.

Kafes çalışmamızın en çarpıcı bulgusu, kestane balı ve kurkumin kombinasyonunun ısı stresi uygulanan bal arılarının yaşam süresini %50 oranında artırmasıdır. Bu kombinasyonla beslenen bal arılarının ömürleri (18 gün), kontrol grubundakilerden (12 gün) daha uzundur.

Aslında, bal ve kurkuminin sinerjistik antioksidan, antifungal, antimikrobiyal ve yara iyileştirici aktiviteleri daha önceki çalışmalarda bildirilmiştir (Ahmed ve diğ., 2013; Balan ve diğ., 2016; Kirupha ve diğ., 2021; Shahid ve diğ., 2021). Kestane balı ve kurkuminin arının yaşam süresini sinerjistik olarak artırdığı ilk kez bu tez çalışmasında gösterilmiştir. Isı stresi altındaki bal arılarının ömrünün uzaması, literatürde belirtildiği gibi antioksidan aktiviteye sahip bu besin takviyelerinin etkilerinden kaynaklanmış olabilir. Ancak, bu çalışmada ürünlere ait *in vitro* antioksidan aktivite testleri yapıldığından, arılar üzerindeki fizyolojik etkilere dair bir yorumda bulunmak mümkün olamamıştır. Küresel ısınmanın neden olduğu sıcaklık stresine karşı sadece insanlar için değil diğer canlılar için de doğal gıda/yem takviyesi bulma çabalarının yakın gelecekte her zamankinden daha önemli hale gelmesi beklenmektedir. Bu çalışma, kestane balı-kurkumin kombinasyonunun diyet takviyesinin ısı stresi koşullarında bal arılarının ömrünü uzattığını ortaya koyan ilk çalışmadır. Ancak kestane balı-kurkumin takviyesinin bal arılarında yaşamı uzatıcı (koruyucu) etkisinin mekanizmasını açıklamak için daha ileri moleküler çalışmalara ihtiyaç vardır. Isı stresi (örn. ısı şoku proteinleri) ve yaşam süresi (örn. sirtuinler) ile ilgili genlerin ekspresyonu ve düzenlenmesi ile ilgili çalışmalarımız devam etmektedir. Veriler, küresel ısınmanın zararlı etkilerine karşı potansiyel kullanımı için temel oluştursa da, diğer etkiler ve ekonomi gibi farklı yaklaşımlar bağlamında koloni düzeyinde çalışmalara ihtiyaç vardır.

Kafes çalışmalarında %50 karbonhidrat solüsyonları hidrasyon için yeterli görülse ve bu nedenle karbonhidrat kaynağı katı olmadıkça suya ihtiyaç duyulmasa da, su bir diyet ihtiyacıdır ve olmaması kafesteki bal arıları için ekstra stres oluşturur (Nearman ve VanEngelsdorp, 2022). Çalışmamızda şeker şurubuna ek olarak su verilmiş ve tüm gruplarda ortalama su tüketimi aynı (yaklaşık 9 µL/arı/gün) bulunmuştur. Bu tüketim kafesteki arıların suya gereksinim duyduklarının bir göstergesidir.

Bu çalışmada arı ürünlerine eklenen fitokimyasallar ticari olarak temin edilmiş olsa da, aslında zerdeçalın köklerinde yer alan kurkumin hariç, bal arılarının ziyaret ettiği bazı bitkilerin polen ve nektarında bulunmaktadır. Dolayısıyla, bu bitkilerin yoğun olduğu bölgelerdeki arılıklardan elde edilecek bal ve polen örnekleri doğal olarak bu fitokimyasalları

içerecektir. Örneğin, İspanya’da “biberiye balı” olarak da adlandırılan bir balın biberiye bitkisinin nektarından gelen kersetin flavonoidini yüksek oranda içerdiği bilinmektedir (Gil ve diğ., 1995). Rosmarinik asit içeriği yüksek bitkilerden nektar toplayan bal arılarının ürettiği balların da bu metabolit bakımından zengin olabileceği öngörülmektedir. Nitekim, Litvanya’dan toplanan akasya, ahududu, karabuğday, okaliptus ve orman balı örneklerinin rosmarinik asit içerdiği rapor edilmiştir (Ramanauskiene ve diğ., 2012).

Özetle, bu tez çalışmasında;

- Kersetin, kurkumin ve rosmarinik asidin en azından burada incelenen arı ürünlerinden bazılarının nutrasötik ve kozmesötik potansiyelini önemli oranda artırdığı,
- 10 µg/mL arı sütü (RJ) ve 25 µM rosmarinik asit içeren kombinasyonun (RJ+ROS25) radikal süpürücü antioksidan aktivite bakımından güçlü sinerjistik etki gösterdiği ve hücre canlılığını %53.1 oranında artırdığı, dolayısıyla kozmesötik uygulamalar için elverişli bir ürün olabileceği,
- 10 µg/mL kestane poleni metanol ekstresi (KPmet) ve 5 µM kurkumin içeren kombinasyon (KPmet+KUR5) ile 10 µg/mL arı sütü (RJ) ve 10 µM kersetinden oluşan kombinasyonun (RJ+KER10) anti-asetilkolinesteraz aktivitesi bakımından güçlü sinerjistik etkileşim gösteren kombinasyonlar olduğu, dolayısıyla nutrasötik uygulamalar için önemli adaylar olabileceği,
- 10 µg/mL kestane poleni metanol ekstresi (KPmet) ve 5 µM kurkumin içeren kombinasyonun (KPmet+KUR5) aditif etkileşimle troloksa yakın bakır (II) indirgeme kapasitesine de sahip olduğu, bu nedenle kozmesötik açıdan incelenmeye değer olduğu,
- %0.25 (w/v) kestane balı ve 10 µM kurkumin içeren kombinasyonun (KB+KUR10) en azından ısı stresi altındaki bal arılarının yaşam süresini uzatacak nutrasötik bir ürün olarak değerlendirilebileceği,
- Çalışılan arı ürünlerinin ve fitokimyasallarla kombinasyonlarının sağlıklı hücreler için toksik olmadığı, aksine proliferasyonu belirgin şekilde indüklediği, bu nedenle hücre yenileyici ve yaşlanmayı geciktirici, fonksiyonel ve yenilikçi kozmetik ve nutrikozmetik ürünler olarak geliştirilebileceği,

sonucuna varılmıştır.

Nutrasötikler ve kozmesötikler sağlıklı yaşam tarzlarıyla birleştğinde sağlığın korunması, kronik hastalıkların gelişme riskinin azaltılması, hatta farmakolojik tedavilerin desteklenmesi veya tamamlanması için yararlı olabilir. Bu ürünlerin potansiyel sağlık yararlarına ve istikrarlı pazar büyümesine rağmen, etkinlikleri, toksisiteleri, biyoyararlanımları gibi konularda kanıta dayalı verilerin yetersiz olduğu dikkati çekmektedir. Bu tip ürünlerin, tıpkı ilaç sektöründe olduğu gibi, pazar öncesi onay sırasında etkinlik ve güvenliklerinin kanıtlanması gerekmektedir. Nutrasötik, kozmesötik ve nutrikozmetik ürünlerde en belirleyici faktör genellikle antioksidan aktivite ve sitotoksisitedir (Anunciato ve da Rocha Filho, 2012). Bu nedenle bu aktiviteler konuyla ilgili temel araştırmalarda test edilen ilk özellikler arasında yer almaktadır. Kozmesötik ürünlerde aranan bir diğer özellik de antimikrobiyal aktivitedir (de Lima Cherubim ve diğ., 2020). Bu aktiviteye tez çalışmasında yer verilememiştir.

Gelecekte bal arısı ürünlerinin ve kombinasyonlarının farklı hücre tipleri üzerindeki etkilerini araştırmak, *in vitro* aktivite testlerini çeşitlendirmek ve test sonuçlarını, gıda veya kozmetik ürün olarak tüketimi modelleyen sistemlerde doğrulamak ve biyoyararlanımlarını sorgulamak yararlı olacaktır.

Bu tez çalışmasında, fitokimyasal katkılarla *in vitro* antioksidan ve anti-asetilkolinesteraz aktivitesi artırılmış çeşitli bal arısı ürünleri önerilmiş ve insan sağlığı üzerindeki etkilerinin daha iyi anlaşılabilmesi için yürütülecek daha kapsamlı analizlere ve *in vivo* deneylere temel oluşturacak önemli verilere ulaşılmıştır.

KAYNAKLAR

- Abd El-Wahed, A. A., Khalifa, S. A., Sheikh, B. Y., Farag, M. A., Saeed, A., Larik, F. A., ... and El-Seedi, H. R., 2019, Bee venom composition: From chemistry to biological activity. *Studies in Natural Products Chemistry*, 60, 459-484.
- Abdelnour, S. A., Abd El-Hack, M. E., Alagawany, M., Farag, M. R., and Elnesr, S. S., 2019, Beneficial impacts of bee pollen in animal production, reproduction and health. *Journal of Animal Physiology And Animal Nutrition*, 103(2), 477-484.
- Abel, S. D., and Baird, S. K., 2018, Honey is cytotoxic towards prostate cancer cells but interacts with the MTT reagent: Considerations for the choice of cell viability assay. *Food chemistry*, 241, 70-78.
- Açıkgöz, Z., and Yücel, B., 2016, Using facilities of apilarnil (bee drone larvae) in poultry nutrition. *Godina Lxi Broj*, 66, 12.
- Afrin, S., Haneefa, S. M., Fernandez-Cabezudo, M. J., Giampieri, F., al-Ramadi, B. K., and Battino, M., 2019, Therapeutic and preventive properties of honey and its bioactive compounds in cancer: an evidence-based review. *Nutrition Research Reviews*, 1-27.
- Agripina, S., Rădoi, I., Condur, D., Eliza, C., Guresoae, I., Cecilia, R., ... and Crenguța, P., 2007, Effects of therapeutic nutrition with the apitherapeutic product apiter in dogs and cats in rickets disease, *Lucrări Științifice Zootehnie Și Biotehnologii*, vol. 40(2).
- Ahmad, S., Campos, M. G., Fratini, F., Altaye, S. Z., and Li, J., 2020, New insights into the biological and pharmaceutical properties of royal jelly. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(2), 382.
- Ahmed, M., Djebli, N., Aissat, S., Zerrouki, K., and Bourabeh, A., 2013, *In vitro* synergistic antibacterial activity of natural honey combined with curcuma starch and their correlation with diastase number, flavonoid and polyphenol content. *Journal of Plant Pathology and Microbiology*, 4(152), 2.
- Ahmed, S., Khan, S. T., Zargaham, M. K., Khan, A. U., Khan, S., Hussain, A., ... and Al-Harrasi, A., 2021, Potential therapeutic natural products against Alzheimer's disease with reference of acetylcholinesterase. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 139, 111609.
- Akmar, S. L., Ansari, M., Berahim, Z., and Shahidan, W. N. S., 2022, Phytochemical compound and non-cytotoxicity effect of sting bee and stingless bee honey against normal human gingival cell lines. *Bangladesh Journal of Medical Science*, 21(1), 158-164.
- Alagawany, M., Farag, M. R., Abdelnour, S. A., Dawood, M. A., Elnesr, S. S., and Dhama, K., 2021, Curcumin and its different forms: A review on fish nutrition. *Aquaculture*, 532, 736030.

- Al-Ghzawi, A. A. M. A., Al-Zghoul, M. B., Zaitoun, S., Al-Omary, I. M., and Alahmad, N. A., 2022, Dynamics of heat shock proteins and heat shock factor expression during heat stress in daughter workers in pre-heat-treated (rapid heat hardening) *Apis mellifera* mother queens. *Journal of Thermal Biology*, 104, 103194.
- Alharbi, K. L., Raman, J., and Shin, H. J., 2021, Date fruit and seed in nutricosmetics. *Cosmetics*, 8(3), 59.
- Alimoglu, G., Guzelmeric, E., Yuksel, P. I., Celik, C., Deniz, I., and Yesilada, E., 2021, Monofloral and polyfloral bee pollens: Comparative Evaluation of Their Phenolics and Bioactivity Profiles. *Lwt*, 142, 110973.
- Allen, A., Daniel, R., Liverpool, E., and Ram, M., 2023, Synergic antibacterial activity of honey-garlic versus honey-ginger on *Pseudomonas aeruginosa* and *Klebsiella pneumoniae* isolated from acute wound infection in Guyana, South America. *GSC Biological and Pharmaceutical Sciences*, 22(2), 141-157.
- Alqarni, A. S., Ali, H., Iqbal, J., Owayss, A. A., and Smith, B. H., 2019, Expression of heat shock proteins in adult honey bee (*Apis mellifera* L.) workers under hot-arid subtropical ecosystems. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 26(7), 1372-1376.
- Alvarez-Suarez, J.M., Giampieri, F., and Battino, M., 2013, Honey as a source of dietary antioxidants: structures, bioavailability and evidence of protective effects against human chronic diseases. *Current Medicinal Chemistry*, 20(5), 621-638.
- Al-Waili, N., Salom, K., and Al-Ghamdi, A. A., 2011, Honey for wound healing, ulcers, and burns; data supporting its use in clinical practice. *The Scientific World Journal*, 11, 766-787.
- Al-Waili, N., Salom, K., Al-Ghamdi, A., and Ansari, M. J., 2012, Antibiotic, pesticide, and microbial contaminants of honey: human health hazards. *The Scientific World Journal*.
- Alves, A., Sousa, E., Kijjoa, A., and Pinto, M., 2020, Marine-derived compounds with potential use as cosmeceuticals and nutricosmetics. *Molecules*, 25(11), 2536.
- Amalraj, A., Pius, A., Gopi, S., and Gopi, S., 2017, Biological activities of curcuminoids, other biomolecules from turmeric and their derivatives—A review. *Journal of Traditional and Complementary Medicine*, 7(2), 205-233.
- Amoah, S. K., Sandjo, L. P., Kratz, J. M., and Biavatti, M. W., 2016, Rosmarinic acid—pharmaceutical and clinical aspects. *Planta Medica*, 82(05), 388-406.
- Andrew, R., and Izzo, A. A., 2017, Principles of pharmacological research of nutraceuticals. *British Journal of Pharmacology*, 174(11), 1177.
- Anunciato, T. P., and da Rocha Filho, P. A., 2012, Carotenoids and polyphenols in nutricosmetics, nutraceuticals, and cosmeceuticals. *Journal of Cosmetic Dermatology*, 11(1), 51-54.

- Apak, R., Güçlü, K., Özyürek, M. ve Karademir, S.E., 2004, Novel total antioxidant capacity index for dietary polyphenols and vitamins c and e, using their cupric ion reducing capability in the presence of neocuproine: Cuprac method, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52,7970–7981.
- Apak, R., Güçlü, K., Özyürek, M., and Celik, S. E., 2008, Mechanism of antioxidant capacity assays and the CUPRAC (cupric ion reducing antioxidant capacity) assay. *Microchimica Acta*, 160(4).
- Aslantürk, Ö. S., 2018, *In vitro* cytotoxicity and cell viability assays: principles, advantages, and disadvantages. *Genotoxicity-a Predictable Risk to Our Actual World*, 2, 64-80.
- Assagaf, H. M., Naceiri Mrabti, H., Rajab, B. S., Attar, A. A., Hamed, M., Sheikh, R. A., ... and Bouyahya, A., 2022, Singular and combined effects of essential oil and honey of *Eucalyptus globulus* on anti-inflammatory, antioxidant, dermatoprotective, and antimicrobial properties: *in vitro* and *in vivo* findings. *Molecules*, 27(16), 5121.
- Atayoğlu, A. T. (2019). Apiterapiye genel bakış. *Journal of Biotechnology and Strategic Health Research*, 3, 61-66.
- Aylanc, V., Falcão, S. I., and Vilas-Boas, M., 2023, Bee pollen and bee bread nutritional potential: chemical composition and macronutrient digestibility under *in vitro* gastrointestinal system. *Food Chemistry*, 135597.
- Azeem, M., Hanif, M., Mahmood, K., Ameer, N., Chughtai, F. R. S., and Abid, U., 2022, An insight into anticancer, antioxidant, antimicrobial, antidiabetic and anti-inflammatory effects of quercetin: A review. *Polymer Bulletin*, 1-22.
- Bakoyiannis, I., Daskalopoulou, A., Pergialiotis, V., and Perrea, D., 2019, Phytochemicals and cognitive health: Are flavonoids doing the trick? *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 109, 1488-1497.
- Baky, M. H., Aboulela, M. B., Wang, K., and Farag, M. A., 2023, bee pollen and bread as a super-food: a comparative review of their metabolome composition and quality assessment in the context of best recovery conditions. *Molecules*, 28(2), 715.
- Balan, P., Mal, G., Das, S., and Singh, H., 2016, Synergistic and additive antimicrobial activities of curcumin, manuka honey and whey proteins. *Journal of Food Biochemistry*, 40(5), 647-654.
- Baranowska-Wójcik, E., Szwajgier, D., and Winiarska-Mieczan, A., 2020, Honey as the potential natural source of cholinesterase inhibitors in Alzheimer's disease. *Plant Foods for Human Nutrition*, 75, 30-32.
- Bărnăuțiu, L. I., Mărghitaș, L. A., Dezmirean, D., Bobiș, O., Mihai, C., and Pavel, C., 2013, Physicochemical composition of Apilarnil (bee drone larvae). *Lucrări Științifice-Seria Zootehnie*, 59, 199-202.

- Bahri, S., Mies, F., Ben Ali, R., Mlika, M., Jameleddine, S., Mc Entee, K., and Shlyonsky, V., 2017, Rosmarinic acid potentiates carnosic acid induced apoptosis in lung fibroblasts. *PloS One*, 12(9), e0184368.
- Basa, B., Belay, W., Tilahun, A., and Teshale, A., 2016, Review on medicinal value of honeybee products: apitherapy. *Advances in Biological Research*, 10(4), 236-247.
- Batiha, G. E. S., Beshbishy, A. M., Ikram, M., Mulla, Z. S., El-Hack, M. E. A., Taha, A. E., ... and Elewa, Y. H. A., 2020, The pharmacological activity, biochemical properties, and pharmacokinetics of the major natural polyphenolic flavonoid: Quercetin. *Foods*, 9(3), 374.
- Battino, M., Giampieri, F., Cianciosi, D., Ansary, J., Chen, X., Zhang, D., and Forbes-Hernández, T., 2020, The roles of strawberry and honey phytochemicals on human health: a possible clue on the molecular mechanisms involved in the prevention of oxidative stress and inflammation. *Phytomedicine*, 153170.
- Belmehdi, O., El Menyiy, N., Bouyahya, A., El Baaboua, A., El Omari, N., Gallo, M., ... and Abrini, J., 2022. Recent advances in the chemical composition and biological activities of propolis. *Food Reviews International*, 1-51.
- Beretta, G., Moretti, R. M., Nasti, R., Cincinelli, R., Dallavalle, S., and Montagnani Marelli, M., 2021, Apoptosis-mediated anticancer activity in prostate cancer cells of a chestnut honey (*Castanea sativa* L.) quinoline–pyrrolidine gamma-lactam alkaloid. *Amino Acids*, 53(6), 869-880.
- Bernardini, S., Tiezzi, A., Laghezza Masci, V., and Ovidi, E., 2018, Natural products for human health: an historical overview of the drug discovery approaches. *Natural Product Research*, 32(16), 1926-1950.
- Bernklau, E., Bjostad, L., Hogeboom, A., Carlisle, A., and HS, A., 2019, Dietary phytochemicals, honey bee longevity and pathogen tolerance. *Insects*, 10(1), 14.
- Blasco, A. J., Rogerio, M. C., González, M. C., and Escarpa, A., 2005, “Electrochemical Index” as a screening method to determine “total polyphenolics” in foods: A proposal. *Analytica Chimica Acta*, 539(1-2), 237-244.
- Bodor, Z., Kovacs, Z., Benedek, C., Hitka, G., and Behling, H., 2021, Origin identification of hungarian honey using melissopalynology, physicochemical analysis, and near infrared spectroscopy. *Molecules*, 26(23), 7274.
- Bogdanov, S., 2011, Royal jelly, bee brood: composition, health, medicine: a review. *Lipids*, 3(8), 8-19.
- Bogdanov, S., Jurendic, T., Sieber, R., and Gallmann, P., 2008, Honey for nutrition and health: a review. *Journal of the American College of Nutrition*, 27(6), 677-689.
- Bolatovna, K.S, Rustenov, A., Eleuqalieva, N., Omirzak, T. and Akhanov, U.K., 2015, Improving reproductive qualities of pigs using the drone brood homogenate, *Biol. Med. (Aligarh)*, 7:2.

- Bommakanti, V., Puthenparambil Ajikumar, A., Sivi, C. M., Prakash, G., Mundanat, A. S., Ahmad, F., ... and Rana, S. S., 2023, An overview of herbal nutraceuticals, their extraction, formulation, therapeutic effects and potential toxicity. *Separations*, 10(3), 177.
- Brown, A., Rodriguez, V., Pfister, J., Perreten, V., Neumann, P., and Retschnig, G., 2022, The dose makes the poison: feeding of antibiotic-treated winter honey bees, *Apis mellifera*, with probiotics and b-vitamins. *Apidologie*, 53(2), 19.
- Burlando, B. and Cornara, L., 2013, Honey in dermatology and skin care: a review. *Journal of Cosmetic Dermatology*, 12(4), 306-313.
- Calderone, N. W., 2012, Insect pollinated crops, insect pollinators and US agriculture: trend analysis of aggregate data for the period 1992–2009. *PloS One*, 7(5), e37235.
- Camadan, Y., and Akkemik, E., 2022, Searching for new natural inhibitors of acetylcholinesterase enzyme. *Cumhuriyet Science Journal*, 43(1), 66-71.
- Campos, M. G., Bogdanov, S., de Almeida-Muradian, L. B., Szczesna, T., Mancebo, Y., Frigerio, C., and Ferreira, F., 2008, Pollen composition and standardisation of analytical methods. *Journal of Apicultural Research*, 47(2), 154-161.
- Can, Z., Yildiz, O., Sahin, H., Turumtay, E. A., Silici, S., and Kolayli, S., 2015, An investigation of Turkish honeys: their physico-chemical properties, antioxidant capacities and phenolic profiles. *Food Chemistry*, 180, 133-141.
- Cao, L. F., Zheng, H. Q., Pirk, C. W., Hu, F. L., and Xu, Z. W., 2016, High royal jelly-producing honeybees (*Apis mellifera ligustica*) (Hymenoptera: Apidae) in China. *Journal of Economic Entomology*, 109(2), 510-514.
- Caponio, G. R., Lippolis, T., Tutino, V., Gigante, I., De Nunzio, V., Milella, R. A., ... and Notarnicola, M., 2022, Nutraceuticals: Focus on anti-inflammatory, anti-cancer, antioxidant properties in gastrointestinal tract. *Antioxidants*, 11(7), 1274.
- Carmona-Hernandez, J. C., Taborda-Ocampo, G., and González-Correa, C. H., 2021, Folin-Ciocalteu reaction alternatives for higher polyphenol quantitation in Colombian passion fruits. *International Journal of Food Science*.
- Carpio, L. E., Sanz, Y., Gozalbes, R., and Barigye, S. J., 2021, Computational strategies for the discovery of biological functions of health foods, nutraceuticals and cosmeceuticals: a review. *Molecular Diversity*, 25, 1425-1438.
- Căuia, E., Șapcaliu, A., Rădoi, I., and Preda, C., 2007, Apiphytotherapy with propolis, plants extract and Aloe vera gel in infected calves with trichophyton (*Trichophyton verrucosum*). *Bulletin of university of agricultural sciences and veterinary medicine cluj-napoca. Veterinary Medicine*, 64(1/2), 88-90.
- Chen, Y., Liu, X., Jiang, C., Liu, L., Ordovas, J. M., Lai, C. Q., and Shen, L., 2018, Curcumin supplementation increases survival and lifespan in *Drosophila* under heat stress conditions. *BioFactors*, 44(6), 577-587.

- Chen, Y., Jiang, W., Liu, X., Du, Y., Liu, L., Ordovas, J. M., ... and Shen, L., 2020, Curcumin supplementation improves heat-stress-induced cardiac injury of mice: physiological and molecular mechanisms. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 78, 108331.
- Chen, H., Wang, K., Ji, W., Xu, H., Liu, Y., Wang, S., ...and Ji, T., 2021, Metabolomic analysis of honey bees (*Apis mellifera*) response to carbendazim based on UPLC-MS. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 179, 104975.
- Chikara, S., Nagaprashantha, L. D., Singhal, J., Horne, D., Awasthi, S., and Singhal, S. S., 2018, Oxidative stress and dietary phytochemicals: role in cancer chemoprevention and treatment. *Cancer Letters*, 413, 122-134.
- Chin, N. L., and Sowndhararajan, K., 2020, A review on analytical methods for honey classification, identification and authentication. In honey analysis. *IntechOpen*.
- Cho, S., Lee, S. H., and Kim, S. (2022). Determination of the optimal maturation temperature for adult honey bee toxicity testing. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 257, 109359.
- Choi, M. H., Yang, S. H., Kim, D. S., Kim, N. D., Shin, H. J., and Liu, K., 2021, Novel quercetin derivative of 3, 7-dioleoylquercetin shows less toxicity and highly potent tyrosinase inhibition activity. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(8), 4264.
- Chopra, A. S., Lordan, R., Horbańczuk, O. K., Atanasov, A. G., Chopra, I., Horbańczuk, J. O., ... and Arkells, N., 2022, The current use and evolving landscape of nutraceuticals. *Pharmacological Research*, 175, 106001.
- Chittasupho, C., Manthaisong, A., Okonogi, S., Tadtong, S., and Samee, W., 2022, Effects of quercetin and curcumin combination on antibacterial, antioxidant, *in vitro* wound healing and migration of human dermal fibroblast cells. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(1), 142.
- Cianfruglia, L., Minnelli, C., Laudadio, E., Scirè, A., and Armeni, T., 2019, Side effects of curcumin: Epigenetic and antiproliferative implications for normal dermal fibroblast and breast cancer cells. *Antioxidants*, 8(9), 382.
- Cianciosi, D., Forbes-Hernández, T. Y., Afrin, S., Gasparrini, M., Reboredo-Rodriguez, P., Manna, P. P., and Quiles, J. L., 2018, Phenolic compounds in honey and their associated health benefits: A review. *Molecules*, 23(9), 2322.
- Ćilerdžić, J., Alimpić Aradski, A., Stajić, M., Vukojević, J., and Duletić-Laušević, S., 2019, Do *Ganoderma lucidum* and *Salvia officinalis* extracts exhibit synergistic antioxidant and antineurodegenerative effects?. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 13, 3357-3365.
- Conedera, M., Tinner, W., Krebs, P., de Rigo, D., and Caudullo, G., 2016, *Castanea sativa* in Europe: distribution, habitat, usage and threats.
- Conte, G., Benelli, G., Serra, A., Signorini, F., Bientinesi, M., Nicoletta, C., ... and Canale, A., 2017, Lipid characterization of chestnut and willow honeybee-collected pollen:

- Impact of freeze-drying and microwave-assisted drying. *Journal of Food Composition and Analysis*, 55, 12-19.
- Cornara, L., Biagi, M., Xiao, J., Burlando, B., 2017, Therapeutic properties of bioactive compounds from different honeybee products. *Frontiers in Pharmacology*, 8, 412.
- Crane, E., 1975, History of honey. In Crane E (ed): "Honey, A Comprehensive Survey." London: William Heinemann, pp 439–488.
- Crowley, R. A., and Health and Public Policy Committee of the American College of Physicians, 2016, Climate change and health: a position paper of the American College of Physicians. *Annals of Internal Medicine*, 164(9), 608-610.
- Cviljević, S., Bilić Rajs, B., Primorac, L., Strelec, I., Gal, K., Cvijetić Stokanović, M., ... and Flanjak, I., 2020, Antibacterial activity of Chestnut honey (*Castanea sativa* Mill.) against *Helicobacter pylori* and correlation to its antioxidant capacity. *Hrana U Zdravlju I Bolesti: Znanstveno-Stručni Časopis Za Nutricionizam I Dijetetiku*, 9(2), 52-56.
- Dahchour, A., 2022, Anxiolytic and antidepressive potentials of rosmarinic acid: A review with focus on antioxidant and anti-inflammatory effects. *Pharmacological Research*, 106421.
- Dalal, R. D. R., Kulshreshtha, A. K. A., Lamiyan, A. K. L. A. K., Kumar, N. R. K. N. R., and Piplani, P. P. P., 2023, Synergistic potential of honey bee products with rivastigmine as novel neuropharmacological approach in rodent model of scopolamine-induced dementia. *World Wide Journals*, 12(01), 1-6.
- Danihelová, M., Veverka, M., Šturdík, E., and Jantová, S., 2013, Antioxidant action and cytotoxicity on HeLa and NIH-3T3 cells of new quercetin derivatives. *Interdisciplinary Toxicology*, 6(4), 209-216.
- DeFelice, S. L., 1995, The nutraceutical revolution: its impact on food industry R and D. *Trends in Food Science and Technology*, 6(2), 59-61.
- de Lima Cherubim, D. J., Buzanello Martins, C. V., Oliveira Fariña, L., and da Silva de Lucca, R. A., 2020, Polyphenols as natural antioxidants in cosmetics applications. *Journal of Cosmetic Dermatology*, 19(1), 33-37.
- Di Lorenzo, R., Grumetto, L., Sacchi, A., Laneri, S., and Dini, I., 2022, Dermocosmetic evaluation of a nutricosmetic formulation based on Curcuma. *Phytotherapy Research*.
- Di Petrillo, A., Orrù, G., Fais, A., and Fantini, M. C., 2022, Quercetin and its derivatives as antiviral potentials: A comprehensive review. *Phytotherapy Research*, 36(1), 266-278.
- Diffenbaugh, N. S., Singh, D., Mankin, J. S., Horton, D. E., Swain, D. L., Touma, D., ... and Rajaratnam, B., 2017, Quantifying the influence of global warming on unprecedented extreme climate events. *Proceedings of The National Academy of Sciences*, 114(19), 4881-4886.

- Dini, I., and Laneri, S., 2019, Nutricosmetics: A brief overview. *Phytotherapy Research*, 33(12), 3054-3063.
- Dini, I., 2022, Contribution of nanoscience research in antioxidants delivery used in nutricosmetic sector. *Antioxidants*, 11(3), 563.
- Dini, I., and Mancusi, A., 2023, Food peptides for the nutricosmetic industry. *Antioxidants*, 12(4), 788.
- Doğanyigit, Z., Silici, S., Kaymak, E., Aslı, O., Akın, A. T., and Pandır, D., 2019, Determination of the protective role of apilarnil against testicular toxicity due to lipopolysaccharide (lps) in male rats. *Bozok Tıp Dergisi*, 9(2), 146-154.
- Dorni, A. C., Amalraj, A., Gopi, S., Varma, K., and Anjana, S. N., 2017, Novel cosmeceuticals from plants—An industry guided review. *Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants*, 7, 1-26.
- Dulger Altiner, D., Sandikci Altunatmaz, S., Sabuncu, M., Aksu, F., and Sahan, Y., 2020, *In-vitro* bioaccessibility of antioxidant properties of bee pollen in Turkey. *Food Science and Technology*, 41, 133-141.
- Eissa, K. I., Kamel, M. M., Mohamed, L. W., and Kassab, A. E., 2023, Development of new Alzheimer's disease drug candidates using donepezil as a key model. *Archiv Der Pharmazie*, 356(1), 2200398.
- Ekşi, S., Esertaş, Ü. Z. Ü., Kilic, A. O., Ejder, N., and Uzunok, B., 2020, Determination of the antimicrobial and antibiofilm effects and 'Quorum Sensing' inhibition potentials of *Castanea sativa* Mill. extracts. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, 48(1), 66-78.
- El-Guendouz, S., Machado, A. M., Aazza, S., Lyoussi, B., Miguel, M. G., Mateus, M. C., and Figueiredo, A. C., 2020, Chemical characterization and biological properties of royal jelly samples from the Mediterranean area. *Natural Product Communications*, 15(2).
- Ellman, G.L., Courtney, D., Andies, V., Featherstone, R.M., 1961, A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical Pharmacology*, 7(2), 88-95.
- Erdem, S., and İnci, H., 2022, Apilarnilin yağ asidi özelliklerinin belirlenmesi. *Türk Tarım ve Doğa Bilimleri Dergisi*, 9(4), 900-906.
- Erejuwa, O. O., Sulaiman, S. A., and Wahab, M. S. A., 2014, Effects of honey and its mechanisms of action on the development and progression of cancer. *Molecules*, 19(2), 2497-2522.
- Ewnetu, Y., Lemma, W., and Birhane, N., 2014, Synergetic antimicrobial effects of mixtures of Ethiopian honeys and ginger powder extracts on standard and resistant clinical bacteria isolates. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*.

- Fadel, O., El Kirat, K., and Morandat, S., 2011, The natural antioxidant rosmarinic acid spontaneously penetrates membranes to inhibit lipid peroxidation in situ. *Biochimica et Biophysica Acta (Bba)-Biomembranes*, 1808(12), 2973-2980.
- Faqihi, R. A., and Taha, E. A. H., 2022, Apitherapy as an alternative medicine: article review. *African Journal of Biological Sciences*, 18(2), 43-57.
- Fouedjou, R. T., Fogang, H. P. D., Ouassaf, M., Daoui, O., Qais, F. A., Elkhatabi, S., ... and Chtita, S., 2022, Targeting the main protease and the spike protein of sars-cov-2 with naturally occurring compounds from some cameroonian medicinal plants: an in-silico study for drug designing. *Journal of the Chilean Chemical Society*, 67(3), 5602-5614.
- Francis, M. and Williams, S., 2014, Effectiveness of Indian turmeric powder with honey as complementary therapy on oral mucositis: a nursing perspective among cancer patients in Mysore. *Nurs j India* 105: 258–260.
- Fratini, F., Cilia, G., Mancini, S., and Felicioli, A., 2016, Royal Jelly: An ancient remedy with remarkable antibacterial properties. *Microbiological Research*, 192, 130-141.
- Gafar, M., Dumitriu, H., Dumitriu, S., and Guti, L., 1989, Apiphytotherapeutic original preparations in the treatment of chronic marginal parodontopathies. A clinical and microbiological study. *Revista De Chirurgie, Oncologie, Radiologie, Orl, Oftalmologie, Stomatologie. Seria: Stomatologie*, 36(2), 91-98.
- Gavanji, S., Bakhtari, A., Famurewa, A. C., and Othman, E. M., 2023, Cytotoxic activity of herbal medicines as assessed *in vitro*: A review. *Chemistry and Biodiversity*, 20.
- Gil, M. I., Ferreres, F., Ortiz, A., Subra, E., and Tomas-Barberan, F. A., 1995, Plant phenolic metabolites and floral origin of rosemary honey. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 43(11), 2833-2838.
- Giray, T., and Robinson, G. E., 1994, Effects of intracolony variability in behavioral development on plasticity of division of labor in honey bee colonies. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 35, 13-20.
- Gok, D. K., Ozturk, N., Er, H., Aslan, M., Demir, N., Derin, N., and Yargicoglu, P., 2015, Effects of rosmarinic acid on cognitive and biochemical alterations in ovariectomized rats treated with D-galactose. *Folia Histochemica Et Cytobiologica*, 53(4), 283-293.
- Goodrich, B. K., 2019, Do more bees imply higher fees? Honey bee colony strength as a determinant of almond pollination fees. *Food Policy*, 83, 150-160.
- Gopi, S., Jacob, J., Varma, K., Jude, S., Amalraj, A., Arundhathy, C. A., ... and Stohs, S. J., 2017, Comparative oral absorption of curcumin in a natural turmeric matrix with two other curcumin formulations: An open-label parallel-arm study. *Phytotherapy Research*, 31(12), 1883-1891.
- Hamamci, M., Doganyigit, Z., Silici, S., Okan, A., Kaymak, E., Yilmaz, S., ... and Inan, L. E., 2020, Apilarnil: a novel neuroprotective candidate. *Acta Neurologica Taiwanica*, 29(2), 33-45.

- Hasham, R., Maniarasu, N., Jemon, K., Abd Latif, N., & Bahari, H. (2023). A review on rosmarinic acid rich extract for skin regeneration through rapamycin signaling pathway. *Biological and Natural Resources Engineering Journal*, 7(1), 1-9.
- Hernandez, D. F., Cervantes, E. L., Luna-Vital, D. A., and Mojica, L., 2021, Food-derived bioactive compounds with anti-aging potential for nutricosmetic and cosmeceutical products. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 61(22), 3740-3755.
- Hewlings, S. J., and Kalman, D. S., 2017, Curcumin: A review of its effects on human health. *Foods*, 6(10), 92.
- Hitl, M., Kladar, N., Gavarić, N., and Božin, B., 2021, Rosmarinic acid–human pharmacokinetics and health benefits. *Planta Medica*, 87(04), 273-282.
- Holopainen, J. K., Kivimäenpää, M., and Julkunen-Tiitto, R., 2018, New light for phytochemicals. *Trends in Biotechnology*, 36(1), 7-10.
- Honda, Y., Fujita, Y., Maruyama, H., Araki, Y., Ichihara, K., Sato, A. and Honda, S., 2011, Lifespan-extending effects of royal jelly and its related substances on the nematode *Caenorhabditis elegans*. *PloS One*, 6(8), e23527.
- Honda, Y., Araki, Y., Hata, T., Ichihara, K., Ito, M., Tanaka, M., and Honda, S., 2015, 10-Hydroxy-2-decenoic acid, the major lipid component of royal jelly, extends the lifespan of *Caenorhabditis elegans* through dietary restriction and target of rapamycin signaling. *Journal of Aging Research*.
- Hossain, M. L., Lim, L. Y., Hammer, K., Hettiarachchi, D., and Locher, C., 2022, A review of commonly used methodologies for assessing the antibacterial activity of honey and honey products. *Antibiotics*, 11(7), 975.
- Hossain, R., Quispe, C., Khan, R. A., Saikat, A. S. M., Ray, P., Ongalbek, D., ... and Cho, W. C. (2022). Propolis: An update on its chemistry and pharmacological applications. *Chinese Medicine*, 17(1), 1-60.
- Hristov, P., Shumkova, R., Palova, N., and Neov, B., 2020, Factors associated with honey bee colony losses: A mini-review. *Veterinary Sciences*, 7(4), 166.
- Hu, F. L., Bíliková, K., Casabianca, H., Daniele, G., Salmen Espindola, F., Feng, M., and Li, L., 2019, Standard methods for *Apis mellifera* royal jelly research. *Journal of Apicultural Research*, 58(2), 1-68.
- Hulea, A., Obiștioiu, D., Cocan, I., Alexa, E., Negrea, M., Neacșu, A. G., ... and Herman, V., 2022, Diversity of monofloral honey based on the antimicrobial and antioxidant potential. *Antibiotics*, 11(5), 595.
- Hýbl, M., Mráz, P., Šipoš, J., Hoštičková, I., Bohatá, A., Čurn, V., and Kopec, T., 2021, Polyphenols as food supplement improved food consumption and longevity of honey bees (*Apis mellifera*) intoxicated by pesticide thiacloprid. *Insects*, 12(7), 572.

- Iliescu, V. N., 1993, Preparation based on medicinal plants, bee product, apilarnil and pollen, *Romanian Apicola*, nr. 1: p 8-8.
- Imai, M., Qin, J., Yamakawa, N., Miyado, K., Umezawa, A., and Takahashi, Y., 2012, Molecular alterations during female reproductive aging: can aged oocytes remind youth? in embryology-updates and highlights on classic topics. *InTech*.
- Imtara, H., Kmail, A., Touzani, S., Khader, M., Hamarshi, H., Saad, B., and Lyoussi, B., 2019, Research article 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*, 1-12.
- Inandiklioglu, N., Doganyigit, Z., Okan, A., Kaymak, E., and Silici, S., 2021, Nephroprotective effect of apilarnil in lipopolysaccharide-induced sepsis through TLR4/NF- κ B signaling pathway. *Life Sciences*, 284, 119875.
- Islam, M. K., Sostaric, T., Lim, L. Y., Hammer, K., and Locher, C., 2020, Development and validation of an HPTLC–DPPH assay and its application to the analysis of honey. *JPC–Journal of Planar Chromatography–Modern Tlc*, 33, 301-311.
- Jayaweera, J. A. A. S., 2023, Current trends and technologies in nutraceutical industry. In *Herbs, spices and their roles in nutraceuticals and functional foods* (pp. 347-360). Academic Press.
- Jibril, F. I., Hilmi, A. B. M., and Manivannan, L., 2019, Isolation and characterization of polyphenols in natural honey for the treatment of human diseases. *Bulletin of The National Research Centre*, 43(1), 4.
- Jovanović, M. M., Čupurdija, M. Đ., Nikodijević, D. D., Milutinović, M. G., Cvetković, D. M., Rakobradović, J. D., and Marković, S. D., 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), 175-192.
- Julianti, E., Rajah, K. K., and Fidrianny, I., 2017, Antibacterial activity of ethanolic extract of cinnamon bark, honey, and their combination effects against acne-causing bacteria. *Scientia Pharmaceutica*, 85(2), 19.
- Kandemir, I., Kence, M., Sheppard, W. S., and Kence, A., 2006, Mitochondrial DNA variation in honey bee (*Apis mellifera* L.) populations from Turkey. *Journal of Apicultural Research*, 45(1), 33-38.
- Karabudak, Ö. ve Yıldız, U.D.H., 2012, Kozmesötikler: Bitkiler ve Bitkisel Ekstreler. *Türkiye Klinikleri Journal of Cosmetic Dermatology Special Topics*, 5(1), 46-53.
- Karadag, A., Ozcelik, B., and Saner, S., 2009, Review of methods to determine antioxidant capacities. *Food Analytical Methods*, 2, 41-60.
- Karademir, S. E., Ozyurek, M., Ercag, E., Guclu, K., and Apak, R., 2006, The cupric ion reducing antioxidant capacity and polyphenolic content of some herbal teas. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 57, 292-304.

- Karagözoğlu, F., and Şahin, S. B., 2022, Apilarnil ve hayvan beslemede kullanımı. *Sağlık Bilimlerinde Güncel Araştırmalar*, 206-221.
- Karami, P., Khaledi, A., Dastan, D., Yaghoobi, M. H., Karami, M., Mashoof, R. Y., and Alikhani, M. Y., 2020, Evaluation of the synergistic effect of cinnamon extract and honey against multidrug-resistant isolates of *Pseudomonas aeruginosa* recovered from burn unit. *Reviews and Research in Medical Microbiology*, 31(2), 104-110.
- Karkar, B., Şahin, S., and Güneş, M. E., 2021, Evaluation of antioxidant properties and determination of phenolic and carotenoid profiles of chestnut bee pollen collected from Turkey. *Journal of Apicultural Research*, 60(5), 765-774.
- Kawatra, A., Gupta, S., Dhankhar, R., Singh, P., and Gulati, P., 2023, Application of phytochemicals in therapeutic, food, flavor, and cosmetic industries. In *Phytochemical Genomics: Plant Metabolomics and Medicinal Plant Genomics*, 85-108.
- Kaygisiz, F., 2023, Factors affecting the choice of marketing channel by beekeepers in Türkiye. *Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 70(2), 165-173.
- Kekeçoğlu, M., Keskin, M., Birinci, C., Birinci, E., and Kolaylı, S., 2021, Effects of honey bee race and season on propolis composition. *Journal of Agricultural Sciences*, 27(3), 292-297.
- Keskin, M., Kaya, G., Bayram, S., Kurek-Górecka, A., and Olczyk, P., 2023, Green synthesis, characterization, antioxidant, antibacterial and enzyme inhibition effects of chestnut (*Castanea sativa*) honey-mediated silver nanoparticles. *Molecules*, 28(6), 2762.
- Khalifa, S. A., Elashal, M., Kieliszek, M., Ghazala, N. E., Farag, M. A., Saeed, A., ... and El-Seedi, H. R., 2020), Recent insights into chemical and pharmacological studies of bee bread. *Trends in Food Science & Technology*, 97, 300-316.
- Khalifa, S. A., Elashal, M. H., Yosri, N., Du, M., Musharraf, S. G., Nahar, L., ... and El-Seedi, H. R., 2021, Bee pollen: Current status and therapeutic potential. *Nutrients*, 13(6), 1876.
- Khan, S. U., Anjum, S. I., Rahman, K., Ansari, M. J., Khan, W. U., Kamal, S. and Khan, H. U., 2018a, Honey: Single food stuff comprises many drugs. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 25(2), 320-325.
- Khan, H., Amin, S., Kamal, M. A., and Patel, S., 2018b, Flavonoids as acetylcholinesterase inhibitors: Current therapeutic standing and future prospects. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 101, 860-870.
- Khan, K. A., Ghramh, H. A., Ahmad, Z., El-Niweiri, M. A., and Ahamed Mohammed, M. E., 2021, Queen cells acceptance rate and royal jelly production in worker honey bees of two *Apis mellifera* races. *PloS One*, 16(4), e0248593.
- Khazaei, M., Ansarian, A., and Ghanbari, E., 2018, New findings on biological actions and clinical applications of royal jelly: a review. *Journal of Dietary Supplements*, 15(5), 757-775.

- Khudhayer Oglah, M., and Fakri Mustafa, Y., 2020, Curcumin analogs: synthesis and biological activities. *Medicinal Chemistry Research*, 29, 479-486
- Kieliszek, M., Piwowarek, K., Kot, A. M., Błażej, S., Chlebowska-Śmigiel, A., and Wolska, I., 2018, Pollen and bee bread as new health-oriented products: A review. *Trends in Food Science & Technology*, 71, 170-180.
- Kim, J., Kim, Y., Yun, H., Park, H., Kim, S. Y., Lee, K. G., ... and Cho, Y., 2010, Royal jelly enhances migration of human dermal fibroblasts and alters the levels of cholesterol and sphinganine in an in vitro wound healing model. *Nutrition Research and Practice*, 4(5), 362-368.
- Kirupha, S. D., Elango, S., and Vadodaria, K., 2021, Fabrication of nanofibrous membrane using stingless bee honey and curcumin for wound healing applications. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 63, 102271.
- Kocot, J., Kielczykowska, M., Luchowska-Kocot, D., Kurzepa, J., and Musik, I., 2018, Antioxidant potential of propolis, bee pollen, and royal jelly: possible medical application. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 1-30.
- Kolayli, S., Can, Z., Yildiz, O., Sahin, H., and Karaoglu, S. A., 2016a, 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(3), 96-104.
- Kolayli, S., Sahin, H., Can, Z., Yildiz, O., Malkoc, M., and Asadov, A., 2016b, A member of complementary medicinal food: anatolian royal jellies, their chemical compositions, and antioxidant properties. *Journal of Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 21(4), NP43-NP48.
- Kolayli, S., Can, Z., Çakir, H. E., Okan, O. T., and Yildiz, O., 2018, An investigation on Trakya region Oak (*Quercus* spp.) honeys of Turkey: their physico-chemical, antioxidant and phenolic compounds properties. *Turkish Journal of Biochemistry*.
- Kolayli, S., Palabiyik, I., Atik, D. S., Keskin, M., Bozdeveci, A., and Karaoglu, S. A., 2020, Comparison of antibacterial and antifungal effects of different varieties of honey and propolis samples. *Acta Alimentaria*, 49(4), 515-523.
- Komosinska-Vassev, K., Olczyk, P., Kaźmierczak, J., Mencner, L., and Olczyk, K., 2015, Bee pollen: chemical composition and therapeutic application. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*.
- Koşum, N., Yücel, B., Kandemir, Ç., Taşkın, T., Duru, M. E., Küçükaydın, S., ... and Cornea-Cipcigan, M., 2022, Chemical composition and androgenic effect of bee drone larvae (apilarnil) for goat male kids. *Chemistry and Biodiversity*, 19(8), e202200548.
- Kotha, R. R., and Luthria, D. L., 2019, Curcumin: biological, pharmaceutical, nutraceutical, and analytical aspects. *Molecules*, 24(16), 2930.

- Kourkoutas, Y., Chorianopoulos, N., Lazar, V., and Di Ciccio, P., 2018, Bioactive natural products, *BioMed Research International*.
- Kowalczyk, I., Gębski, J., Stangierska, D., and Szymańska, A., 2023, Determinants of honey and other bee products use for culinary, cosmetic, and medical purposes. *Nutrients*, 15(3), 737.
- Koyuncu, E., Yaşar, A., Arslan, F., and Sari, N., 2019, Synthesis of novel Schiff base derivatives of tacrine and investigation of their acetylcholinesterase inhibition potency. *Macedonian Journal of Chemistry and Chemical Engineering*, 38(1), 75-84.
- Kucuk, M., Kolayli, S., Karaoglu, S., Ulusoy, E., Baltaci, C., and Candan, F., 2007, Biological activities and chemical composition of three honeys of different types from Anatolia. *Food Chemistry*, 100.
- Kurek-Górecka, A., Górecki, M., Rzepecka-Stojko, A., Balwierz, R., and Stojko, J., 2020, Bee products in dermatology and skin care. *Molecules*, 25(3), 556.
- Kurek-Górecka, A., and Olczyk, P., 2022, Bee products and skin therapy. In *Bee Products and Their Applications in the Food and Pharmaceutical Industries* (pp. 25-62). Academic Press.
- Kuruuzum-Uz, A., and Gundogdu, S., 2022, Experimental informational compilation on isolation from herbal sources and biological activity of rosmarinic acid. In *Handbook Of Research on Advanced Phytochemicals and Plant-Based Drug Discovery* (pp. 314-326). IGI Global.
- Lahlou, M., 2013, The success of natural products in drug discovery. *Pharmacol Pharm*, 4(3A), 17-31.
- Lai Shi Min, S., Liew, S. Y., Chear, N. J. Y., Goh, B. H., Tan, W. N., and Khaw, K. Y., 2022, Plant terpenoids as the promising source of cholinesterase inhibitors for anti-AD therapy. *Biology*, 11(2), 307.
- Lao, C. D., Ruffin, M. T., Normolle, D., Heath, D. D., Murray, S. I., Bailey, J. M., ... and Brenner, D. E., 2006, Dose escalation of a curcuminoid formulation. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 6(1), 1-4.
- Lawson, M. K., 2023, Improvement of therapeutic value of quercetin with chitosan nanoparticle delivery systems and potential applications. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(4), 3293.
- Lee, C. W., Chon, H. J., and Yoo, Y. J., 2013, A clinical study of flavonoid quercetin-containing cosmetics on the skin improvement. *Kor J Aesthet Cosmetol*, 11(4), 811-818.
- Lee, S. J., Chandrasekran, P., Mazucanti, C. H., O'Connell, J. F., Egan, J. M., and Kim, Y., 2022, Dietary curcumin restores insulin homeostasis in diet-induced obese aged mice. *Aging (Albany NY)*, 14(1), 225.

- Leiva-Vega, J., Villalobos-Carvajal, R., Ferrari, G., Donsi, F., Zúñiga, R. N., Shene, C., and Beldarraín-Iznaga, T., 2020, Influence of interfacial structure on physical stability and antioxidant activity of curcumin multilayer emulsions. *Food and Bioproducts Processing*, 121, 65-75.
- Li, Q. Q., Wang, K., Marcucci, M. C., Sawaya, A. C. H. F., Hu, L., Xue, X. F., and Hu, F. L., 2018, Nutrient-rich bee pollen: A treasure trove of active natural metabolites. *Journal of Functional Foods*, 49, 472-484.
- Liao, V. H. C., Yu, C. W., Chu, Y. J., Li, W. H., Hsieh, Y. C., and Wang, T. T., 2011, Curcumin-mediated lifespan extension in *Caenorhabditis elegans*. *Mechanisms of Ageing and Development*, 132(10), 480-487.
- Limaye, V. S., 2021, Making the climate crisis personal through a focus on human health. *Climatic Change*, 166(3-4), 43.
- Liu, D. M., Xu, B., and Dong, C., 2021, Recent advances in colorimetric strategies for acetylcholinesterase assay and their applications. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 142, 116320.
- Liu, X., Rodeheaver, D. P., White, J. C., Wright, A. M., Walker, L. M., Zhang, F., and Shannon, S., 2018, A comparison of in vitro cytotoxicity assays in medical device regulatory studies. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 97, 24-32.
- Loukas, P., and Maria, T., 2023, The Application of honeybee products in the health sector. *Advances in Biological Chemistry*, 13(1), 1-16.
- Louveaux, J., Maurizio, A., and Vorwohl, G., 1978, Methods of melissopalynology. *Bee World*, 59(4), 139-157.
- Lv, M. G., Chen, W. Q., Weng, S. Q., Chen, H. Y., Cheng, Y. M., and Luo, T., 2018, Rosmarinic acid compromises human sperm functions by an intracellular Ca^{2+} concentration-related mechanism. *Reproductive Toxicology*, 81, 58-63.
- Machado, A. M., Miguel, M. G., Vilas-Boas, M., and Figueiredo, A. C., 2020, Honey volatiles as a fingerprint for botanical origin—a review on their occurrence on monofloral honeys. *Molecules*, 25(2), 374.
- Maghsoudlou, A., Mahoonak, A. S., Mohebodini, H., and Toldra, F., 2019, Royal jelly: chemistry, storage and bioactivities. *Journal of Apicultural Science*.
- Mahmood, K., Zia, K. M., Zuber, M., Salman, M., and Anjum, M. N., 2015, Recent developments in curcumin and curcumin based polymeric materials for biomedical applications: A review. *International Journal of Biological Macromolecules*, 81, 877-890.
- Mansour, G. H., El-Magd, M. A., Mahfouz, D. H., Abdelhamid, I. A., Mohamed, M. F., Ibrahim, N. S., ... and Elzayat, E. M., 2021, Bee venom and its active component Melittin synergistically potentiate the anticancer effect of Sorafenib against HepG2 cells. *Bioorganic Chemistry*, 116, 105329.

- Manzanares, A. B., García, Z. H., Galdón, B. R., Rodríguez, E. R., and Romero, C. D., 2014, Physicochemical characteristics of minor monofloral honeys from Tenerife, Spain. *LWT-Food Science and Technology*, 55(2), 572-578.
- Martinello, Marianna, and Franco Mutinelli., 2021, Antioxidant activity in bee products: A review. *Antioxidants* 10.1: 71.
- Matsuo, M., Sasaki, N., Saga, K., and Kaneko, T., 2005, Cytotoxicity of flavonoids toward cultured normal human cells. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 28(2), 253-259.
- Marucci, G., Buccioni, M., Dal Ben, D., Lambertucci, C., Volpini, R., and Amenta, F., 2021, Efficacy of acetylcholinesterase inhibitors in Alzheimer's disease. *Neuropharmacology*, 190, 108352.
- Medina, R. G., Paxton, R. J., De Luna, E., Fleites-Ayil, F. A., Medina, L. A. M., and Quezada-Euán, J. J. G., 2018, Developmental stability, age at onset of foraging and longevity of Africanized honey bees (*Apis mellifera* L.) under heat stress (Hymenoptera: Apidae). *Journal of Thermal Biology*, 74, 214-225.
- Mekkaoui, M., Assaggaf, H., Qasem, A., El-Shemi, A., Abdallah, E. M., Boudida, E. H., ... and Alaoui, K., 2022, Ethnopharmacological survey and comparative study of the healing activity of moroccan thyme honey and its mixture with selected essential oils on two types of wounds on albino rabbits. *Foods*, 11(1), 28.
- Meléndez-Martínez, A. J., 2022, Nutricosmetics: vanity can help increase the consumption of health-promoting foods in the sustainability era. *ACS Food Science and Technology*, 2(3), 474-475.
- Meteoglu, I., Kavas, N. C., Saricaoglu, M., Ilkaya, F., Guzel, H., Alici, O., and Öztürk, F., 2015, Chestnut honey and sherbet enhance the healing of burn wounds in rat model. *Clinical and Investigative Medicine*, 38(4), E267.
- Mohammadzamani, Z., Khorshidi, A., Khaledi, A., Shakerimoghaddam, A., Moosavi, G. A., and Piroozmand, A., 2020, Inhibitory effects of cinnamaldehyde, carvacrol, and honey on the expression of *exoS* and *ampC* genes in multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolated from burn wound infections. *Microbial Pathogenesis*, 140, 103946.
- Molyneux, P., 2004, The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarin Journal of Science and Technology*, 26, 211-219.
- Moodie, L. W., Sepčić, K., Turk, T., Frangež, R., and Svenson, J., 2019, Natural cholinesterase inhibitors from marine organisms. *Natural Product Reports*, 36(8), 1053-1092.
- Mosmann, T., 1983, Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*, 65: 55-63.
- Mousavi, S. M., Milajerdi, A., Varkaneh, H. K., Gorjipour, M. M., and Esmailzadeh, A., 2020, The effects of curcumin supplementation on body weight, body mass index and

- waist circumference: a systematic review and dose-response meta-analysis of randomized controlled trials. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 60(1), 171-180.
- Moussa, A., Djebli, N., Hammoudi, S.M., Aissat, S., Akila, B., Hemida, H., 2012, Additive potential of ginger starch on antifungal potency of honey against *Candida albicans*. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 2(4): 253-255.
- Moussa, A., Djebli, N., Aissat, S., Khiati, B., Meslem, A., Bacha, S., 2013a, *In vitro* activity of natural honey alone and in combination with curcuma starch against *Rhodotorula mucilaginosa* in correlation with bioactive compounds and diastase activity. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 3(10), 816-821.
- Moussa, A., Djebli, N., Aissat, S., Zerrouki, K., Bourabeh A., 2013b, *In vitro* synergistic antibacterial activity of natural honey combined with curcuma starch and their correlation with diastase number, flavonoid and polyphenol content. *Plant Pathology and Microbiology*, 4, 152.
- Munteanu, I. G., and Apetrei, C., 2021, Analytical methods used in determining antioxidant activity: A review. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(7), 3380.
- Munteanu, I. G., and Apetrei, C., 2022, A review on electrochemical sensors and biosensors used in assessing antioxidant activity. *Antioxidants*, 11(3), 584.
- Muñoz, I., and De la Rúa, P., 2021, Wide genetic diversity in old World honey bees threaten by introgression. *Apidologie*, 52(1), 200-217.
- Murray, A. P., Faraoni, M. B., Castro, M. J., Alza, N. P., and Cavallaro, V., 2013, Natural AChE inhibitors from plants and their contribution to Alzheimer's disease therapy. *Current Neuropharmacology*, 11(4), 388-413.
- Nadeem, M., Imran, M., Aslam Gondal, T., Imran, A., Shahbaz, M., Muhammad Amir, R., ... and Martins, N., 2019, Therapeutic potential of rosmarinic acid: A comprehensive review. *Applied Sciences*, 9(15), 3139.
- Nainu, F., Masyita, A., Bahar, M. A., Raihan, M., Prova, S. R., Mitra, S., ... and Simal-Gandara, J., 2021, Pharmaceutical prospects of bee products: Special focus on anticancer, antibacterial, antiviral, and antiparasitic properties. *Antibiotics*, 10(7), 822.
- Nasuti, C., Gabbianelli, R., Falcioni, G., and Cantalamessa, F., 2006, Antioxidative and gastroprotective activities of anti-inflammatory formulations derived from chestnut honey in rats. *Nutrition Research*, 26(3), 130-137.
- Nearman, A., and VanEngelsdorp, D., 2022, Water provisioning increases caged worker bee lifespan and caged worker bees are living half as long as observed 50 years ago. *Scientific Reports*, 12(1), 18660.
- Nikhat, S., and Fazil, M., 2022, History, phytochemistry, experimental pharmacology and clinical uses of honey: A comprehensive review with special reference to Unani medicine. *Journal of Ethnopharmacology*, 282, 114614.

- Nishimuro, H., Ohnishi, H., Sato, M., Ohnishi-Kameyama, M., Matsunaga, I., Naito, S., ... and Kobori, M., 2015, Estimated daily intake and seasonal food sources of quercetin in Japan. *Nutrients*, 7(4), 2345-2358.
- Noor, S., Mohammad, T., Rub, M. A., Raza, A., Azum, N., Yadav, D. K., ... and Asiri, A. M., 2022, Biomedical features and therapeutic potential of rosmarinic acid. *Archives of Pharmacal Research*, 45(4), 205-228.
- Nordin, A., Omar, N., Sainik, N. Q. A. V., Chowdhury, S. R., Omar, E., Saim, A. B., and Idrus, R. B. H., 2018, Low dose stingless bee honey increases viability of human dermal fibroblasts that could potentially promote wound healing. *Wound Medicine*, 23, 22-27.
- Obeidat, M., Al-Khraisat, I. F., Jaradat, D. S. M., Ghanim, B. Y., Abdallah, Q. M., Arqoub, D. A., ... and Qinna, N. A., 2023, Mellitin peptide quantification in seasonally collected crude bee venom and its anticancer effects on myelogenous K562 human leukaemia cell line. *BMC Complementary Medicine and Therapies*, 23(1), 132.
- Okan, A., Kaymak, E., Üner, A. K., Silici, S., and Doğanyigit, Z., 2022, Apilarnil protects the LPS induced endotoxemic heart. *Turkish Bulletin of Hygiene and Experimental Biology*, 79(4), 720-729.
- Olas, B., 2020, Honey and its phenolic compounds as an effective natural medicine for cardiovascular diseases in humans?. *Nutrients*, 12(2), 283.
- Oliveira, J. J., and Ribeiro, H., 2020, Food market trends: The cases of spirulina and bee pollen. *Economic and Social Development: Book Of Proceedings*, 246-258.
- Olszowy-Tomczyk, M., 2020, Synergistic, antagonistic and additive antioxidant effects in the binary mixtures. *Phytochemistry Reviews*, 19, 63-103.
- Omar, W. A. W., Azhar, N. A., Fadzilah, N. H., and Kamal, N. N. S. N. M., 2016, Bee pollen extract of Malaysian stingless bee enhances the effect of cisplatin on breast cancer cell lines. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 6(3), 265-269.
- Oo, W. M., 2018, Pharmacological effects of royal jelly on human skin. *Pharmacological and Pharmaceutical Reports*, 1(2), 20-23.
- Oršolić, N., Jazvinščak Jembrek, M., and Terzić, S., 2017, Honey and quercetin reduce ochratoxin A-induced DNA damage in the liver and the kidney through the modulation of intestinal microflora. *Food and Agricultural Immunology*, 28(5), 812-833.
- Oskay, D., 2021, Effects of diet composition on consumption, live body weight and life span of worker honey bees (*Apis mellifera* L.). *Applied Ecology and Environmental Research*, 19(6), 4421-4430.
- Ozkok, A., Ozenirler, C., Canli, D., Mayda, N., and Sorkun, K., 2018, Monofloral features of turkish honeys according to melissopalynologic, total phenolic and total flavonoid content. *Gazi University Journal of Science*, 31(3).

- Ożarowski, M., and Karpiński, T. M., 2023, The Effects of propolis on viral respiratory diseases. *Molecules*, 28(1), 359.
- Öztürk, A. A., Başaran, E., Şenel, B., Demirel, M., and Sarıca, Ş., 2023, Synthesis, characterization, antioxidant activity of quercetin, rutin and quercetin-rutin incorporated β -cyclodextrin inclusion complexes and determination of their activity in NIH-3T3, MDA-MB-231 and A549 cell lines. *Journal of Molecular Structure*, 1282, 135169.
- Özyürek, M., Güçlü, K., and Apak, R., 2011, The main and modified CUPRAC methods of antioxidant measurement. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 30(4), 652-664.
- Pan, S., Yan, J., Xu, X., Chen, Y., Chen, X., Li, F., and Xing, H., 2022, Current development and future application prospects of plants-derived polyphenol bioactive substance curcumin as a novel feed additive in livestock and poultry. *International Journal of Molecular sciences*, 23(19), 11905.
- Pandey, A., Jatana, G. K., and Sonthalia, S., 2019, Cosmeceuticals. StatPearls Publishing. PMID: 31334943.
- Pang, L., Wang, Y., Zheng, M., Wang, Q., Lin, H., Zhang, L., and Wu, L., 2016, Transcriptomic study of high-glucose effects on human skin fibroblast cells. *Molecular Medicine Reports*, 13(3), 2627-2634.
- Park, H. M., Cho, M. H., Cho, Y., and Kim, S. Y., 2012, Royal jelly increases collagen production in rat skin after ovariectomy. *Journal of Medicinal Food*, 15(6), 568-575.
- Pathak, S., Valladares, A., Nguyen, R., and Perez, A., 2018, Antioxidant nutraceuticals: present market and future trends. In *Antioxidant Nutraceuticals* (pp. 25-35). CRC Press.
- Pauliuc, D., Dranca, F., and Oroian, M., 2020, Antioxidant activity, total phenolic content, individual phenolics and physicochemical parameters suitability for Romanian honey authentication. *Foods*, 9(3), 306.
- Pérez-Fons, L., Garzón, M. T., and Micol, V., 2010, Relationship between the antioxidant capacity and effect of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) polyphenols on membrane phospholipid order. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(1), 161-171.
- Pérez-Sánchez, A., Barrajón-Catalán, E., Herranz-López, M., Castillo, J., and Micol, V., 2016, Lemon balm extract (*Melissa officinalis*, L.) promotes melanogenesis and prevents UVB-induced oxidative stress and DNA damage in a skin cell model. *Journal of Dermatological Science*, 84(2), 169-177.
- Petersen, M., 2013, Rosmarinic acid: new aspects. *Phytochemistry Reviews*, 12, 207-227.
- Petruța, G. P., 2010, Phytotherapy and apitherapy in attention of the present day teacher of Biology. *Scientific Papers, Agronomy Series*, 2(53), 374-379.
- Phuna, Z. X., Yu, J. K. E., Tee, J. Y., Chuah, S. Q., Tan, N. W. H., Vijayabalan, S., ... and Madhavan, P., 2020, *In vitro* evaluation of nanoemulsions of curcumin, piperine, and

- tualang honey as antifungal agents for candida species. *Journal of Applied Biotechnology Reports*, 7(3), 189-197.
- Platzer, M., Kiese, S., Herfellner, T., Schweiggert-Weisz, U., and Eisner, P., 2021, How does the phenol structure influence the results of the Folin-Ciocalteu assay?. *Antioxidants*, 10(5), 811.
- Plikus, M. V., Wang, X., Sinha, S., Forte, E., Thompson, S. M., Herzog, E. L., ... and Horsley, V., 2021, Fibroblasts: origins, definitions, and functions in health and disease. *Cell*, 184(15), 3852-3872.
- Pohanka, M., 2011, Cholinesterases, a target of pharmacology and toxicology. *Biomedical Papers of the Medical Faculty of Palacky University in Olomouc*, 155(3).
- Polumbryk, M., Ivanov, S., and Polumbryk, O., 2013, Antioxidants in food systems. Mechanism of action. *Ukrainian Journal of Food Science*, (1),1.
- Porcza, L. M., Simms, C., and Chopra, M., 2016, Honey and cancer: current status and future directions. *Diseases*, 4(4), 30.
- Qiao, J., Feng, Z., Zhang, Y., Xiao, X., Dong, J., Haubruge, E., and Zhang, H., 2023, Phenolamide and flavonoid glycoside profiles of 20 types of monofloral bee pollen. *Food Chemistry*, 405, 134800.
- Qiu, L. Q., Lai, W. S., Stumpo, D. J., and Blackshear, P. J., 2016, Mouse embryonic fibroblast cell culture and stimulation. *Bio-Protocol*, 6(13), e1859-e1859.
- Prasad, S., Gupta, S. C., Tyagi, A. K., and Aggarwal, B. B., 2014, Curcumin, a component of golden spice: from bedside to bench and back. *Biotechnology Advances*, 32(6), 1053-1064.
- Prasasty, V., Radifar, M., and Istyastono, E., 2018, Natural peptides in drug discovery targeting acetylcholinesterase. *Molecules*, 23(9), 2344.
- Rădoi, I., Șapcaliu, A., Căuia, E., and Tudoran, C., 2007, Researches regarding the obtaining and testing of a new api-phyto-therapeutic product anti-diarrhea in farm animals. *Bulletin of University of Agricultural Sciences and Veterinary Medicine Cluj-Napoca. Veterinary Medicine*, 64(1/2), 269-271.
- Rahimov, E. E., and Ahmedova, Z. A., 2021a, An example of Apiphytotherapy studies in azerbaijan: herbal. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 9, 28-33.
- Rahimov, E. E., and Ahmedova, Z. A., 2021b, Immunostimulator Api-phytotherapy for the treatment of upper respiratory tract infection and chronic bronchitis. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 9, 313-319.
- Rahul, C., and Sreedhar, D., 2022, Nutraceuticals and cosmeceuticals—A brief overview. *Pharma Times*, 54(6), 12-14.

- Ramanathan, A. N. K. G., Nair, A. J., and Sugunan, V. S., 2018, A review on royal jelly proteins and peptides. *Journal of Functional Foods*, 44, 255-264.
- Ramanauskienė, K., Stelmakienė, A., Briedis, V., Ivanauskas, L., and Jakštas, V., 2012, The quantitative analysis of biologically active compounds in Lithuanian honey. *Food Chemistry*, 132(3), 1544-1548.
- Ramsay, E. I., Rao, S., Madathil, L., Hegde, S. K., Baliga-Rao, M. P., George, T., and Baliga, M. S., 2019, Honey in oral health and care: A mini review. *Journal of Oral Biosciences*, 61(1), 32-36.
- Rao, P. V., Krishnan, K. T., Salleh, N., and Gan, S. H., 2016, Biological and therapeutic effects of honey produced by honey bees and stingless bees: a comparative review. *Revista Brasileira De Farmacognosia*, 26(5), 657-664.
- Rascón, B., Hubbard, B. P., Sinclair, D. A., and Amdam, G. V., 2012, The lifespan extension effects of resveratrol are conserved in the honey bee and may be driven by a mechanism related to caloric restriction. *Aging (Albany NY)*, 4(7), 499.
- Rasmussen, E. M., Seier, K. L., Pedersen, I. K., Kreibich, C., Amdam, G. V., Münch, D., and Dahl, J. A., 2021, Screening bioactive food compounds in honey bees suggests curcumin blocks alcohol-induced damage to longevity and DNA methylation. *Scientific Reports*, 11(1), 19156.
- Remolina, S. C., Hafez, D. M., Robinson, G. E., and Hughes, K. A., 2007, Senescence in the worker honey bee *Apis mellifera*. *Journal of Insect Physiology*, 53(10), 1027-1033.
- Riaz, N., Iftikhar, M., Saleem, M., Hussain, S., Rehmat, F., Afzal, Z., ... and al-Rashida, M., 2020, New synthetic 1, 2, 4-triazole derivatives: cholinesterase inhibition and molecular docking studies. *Results in Chemistry*, 2, 100041.
- Rienda, B., Elexpe, A., Tolentino-Cortez, T., Gulak, M., Bruzos-Cidón, C., Torrecilla, M., ... and Barreda-Gómez, G., 2021, Analysis of acetylcholinesterase activity in cell membrane microarrays of brain areas as a screening tool to identify tissue specific inhibitors. *Analytica*, 2(1), 25-36.
- Rizqi, J., and Amestiasih, T., 2020, Evaluation of cytotoxic activity of combination honey and aloe vera in nih3t3 fibroblast cell lines and its effect on cell viability. In *Proceedings of the International Conference on Nursing and Health Sciences*, 1(1), 81-86.
- Roy, M., Datta, A., Roy, M., and Datta, A., 2019, Fundamentals of phytochemicals. *Cancer Genetics and Therapeutics: Focus on Phytochemicals*, 49-81.
- Ruz, C., Alcantud, J. L., Vives Montero, F., Duran, R., and Bandres-Ciga, S., 2020, Proteotoxicity and neurodegenerative diseases. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(16), 5646.
- Sagnia, B., Fedeli, D., Casetti, R., Montesano, C., Falcioni, G., Colizzi, V., 2014, Antioxidant and anti-inflammatory activities of extracts from *cassia alata*, *eleusine indica*,

eremomastax speciosa, *carica papaya* and *polyscia fulva* medicinal plants collected in cameroon, *Plos One*, 9(8), 1-10.

- Salah, A. S., Ahmed-Farid, O. A., Nassan, M. A., and El-Tarabany, M. S., 2021, Dietary curcumin improves energy metabolism, brain monoamines, carcass traits, muscle oxidative stability and fatty acid profile in heat-stressed broiler chickens. *Antioxidants*, 10(8), 1265.
- Sánchez-Rangel, J. C., Benavides, J., Heredia, J. B., Cisneros-Zevallos, L., and Jacobo-Velázquez, D. A., 2013, The Folin–Ciocalteu assay revisited: improvement of its specificity for total phenolic content determination. *Analytical Methods*, 5(21), 5990-5999.
- Sani, A., Fathiah, N., Belani, L. K., Pui Sin, C., Abdul Rahman, S. N. A., Das, S., and Yusof, Y. A. M., 2014, Effect of the combination of gelam honey and ginger on oxidative stress and metabolic profile in streptozotocin-induced diabetic Sprague-Dawley rats. *Biomed Research International*, 1-10.
- Santos, M. J., Pinto, T., and Vilela, A. (2022). Sweet Chestnut (*Castanea sativa* Mill.) Nutritional and Phenolic Composition Interactions with Chestnut Flavor Physiology. *Foods*, 11(24), 4052.
- Saral, Ö., 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., Tuncel, M., and Kolayli, S., 2009, Antioxidant activity and phenolic acid constituents of chestnut (*Castania sativa* Mill.) honey and propolis. *Journal of Food Biochemistry*, 33(4), 470-481.
- Sateriale, D., Facchiano, S., Colicchio, R., Pagliuca, C., Varricchio, E., Paolucci, M., ... and Pagliarulo, C., 2020, *In vitro* synergy of polyphenolic extracts from honey, myrtle and pomegranate against oral pathogens, *S. mutans* and *R. dentocariosa*. *Frontiers in Microbiology*, 11, 1465.
- Sato, T., and Miyata, G., 2000, The nutraceutical benefit, part iii: honey. *Nutrition* (Burbank, Los Angeles County, Calif.), 16(6), 468-469.
- Sato, S., and Mukai, Y., 2020, Modulation of chronic inflammation by quercetin: The beneficial effects on obesity. *Journal of Inflammation Research*, 421-431.
- Savu, V., Sapcaliu, A., Radoi, I., Mateescu, C., Cauia, E., Pavel, C., and Siceanu, A., 2011. Apiphytotherapeutic product used for nutritional therapy in dogs with liver diseases. *Economics, Management, and Financial Markets*, 6(1), 1175-1179.
- Sazhina, N. N., 2017, Determination of antioxidant activity of various bioantioxidants and their mixtures by the amperometric method. *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 43, 771-775.
- Schmidt, J. O., 1997, Bee products. In *Bee Products* (pp. 15-26). Springer, Boston, MA.

- Schramm, D. D., Karim, M., Schrader, H. R., Holt, R. R., Cardetti, M., and Keen, C. L., 2003, Honey with high levels of antioxidants can provide protection to healthy human subjects. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(6), 1732-1735.
- Sedláčková, V. H., Grygorieva, O., and Gurnenko, I., 2021b Study of morphological characters of pollen grains sweet chestnut (*Castanea sativa* Mill.) by scanning electron microscopy. *Agrobiodiversity for Improving Nutrition, Health and Life Quality*, 5(1).
- Sedláčková, V. H., Grygorieva, O., Šramková, K. F., Shelepova, O., Goncharovska, I., and Mňahončáková, E., 2021a. The chemical composition of pollen, staminate catkins, and honey of *Castanea sativa* Mill. *Slovak Journal of Food Sciences*, 15.
- Segueni, N., Boutaghane, N., Asma, S. T., Tas, N., Acaroz, U., Arslan-Acaroz, D., ... and Nieto, G., 2023. Review on propolis applications in food preservation and active packaging. *Plants*, 12(8), 1654.
- Selamoglu, Z., 2018, The Using of Honeybee products in Fishery and Apitherapy: A mini review. *Iranian Journal of Aquatic Animal Health*, 4(1), 124-128.
- Sentkowska, A., and Pyrzyńska, K., 2019, Investigation of antioxidant activity of selenium compounds and their mixtures with tea polyphenols. *Molecular Biology Reports*, 46, 3019-3024.
- Seres, A. B., Ducza, E., Báthori, M., Hunyadi, A., Béni, Z., Dékány, M., and Gáspár, R., 2014, Androgenic effect of honeybee drone milk in castrated rats: Roles of methyl palmitate and methyl oleate. *Journal of Ethnopharmacology*, 153(2), 446-453.
- Seres, A. B., Ducza, E., Báthori, M., Hunyadi, A., Béni, Z., Dékány, M., and Gáspár, R., 2013, Raw drone milk of honeybees elicits uterotrophic effect in rats: evidence for estrogenic activity. *Journal of medicinal food*, 16(5), 404-409.
- Sevin, S., Deveci Ozkan, A., Tutun, H., Kivrak, I., Turna, O., and Guney Eskiler, G., 2023, Determination of the effects of bee venom on triple negative breast cancer cells in vitro. *Chemistry & Biodiversity*, 20(3), e202201263.
- Sevin, S., and Yarsan, E., 2022, Investigation of the effects of Pine and Chestnut Honey on wound healing. *Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 69, 319-328.
- Shahid, M. A., Ali, A., Uddin, M. N., Miah, S., Islam, S. M., Mohebbullah, M., and Jamal, M. S. I., 2021, Antibacterial wound dressing electrospun nanofibrous material from polyvinyl alcohol, honey and *Curcumin longa* extract. *Journal of Industrial Textiles*, 51(3), 455-469.
- Shen, L. R., Parnell, L. D., Ordovas, J. M., and Lai, C. Q., 2013, Curcumin and aging. *Biofactors*, 39(1), 133-140.
- Shih, S. R., Bach, D. M., Rondeau, N. C., Sam, J., Lovinger, N. L., Lopatkin, A. J., and Snow, J. W., 2021, Honey bee sHSP are responsive to diverse proteostatic stresses and potentially promising biomarkers of honey bee stress. *Scientific Reports*, 11(1), 22087.

- Shraim, A. M., Ahmed, T. A., Rahman, M. M., and Hijji, Y. M., 2021, Determination of total flavonoid content by aluminum chloride assay: A critical evaluation. *LWT*, 150, 111932.
- Siceanu, A., Sapcaliu, A., Radoi, I., Condur, D., Cauia, E., and Pavel, C., 2008, The apiphytotherapy with proactivator in the veterinary dermatology and surgery. *Lucrări Științifice-Zootehnie Și Biotehnologii, Universitatea De Științe Agricole Și Medicină Veterinară A Banatului Timișoara*, 41(2), 339-344.
- Siddeeg, A., AlKehayez, N. M., Abu-Hiamed, H. A., Al-Sanea, E. A., and Al-Farga, A. M., 2021, Mode of action and determination of antioxidant activity in the dietary sources: An overview. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 28(3), 1633-1644.
- Silici, S., 2018, Antioxidant and physicochemical properties of chestnut honeys from Turkey. *Communications Faculty of Sciences University of Ankara Series, C. Biology*, 27(2), 104-114.
- Singleton, V. L., Orthofer, R., and Lamuela-Raventós, R. M., 1999, Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. In *Methods in Enzymology* (Vol. 299, pp. 152-178). Academic press.
- Sonmez, E., Kekecoglu, M., Sahin, H., Bozdeveci, A., and Alpay Karaoglu, S., 2023, An evaluation of the chemical composition and biological properties of Anatolian Royal Jelly, drone brood and queen bee larvae. *European Food Research and Technology*, 1-11.
- Sotiropoulou, G., Zingkou, E., and Pampalakis, G., 2021, Redirecting drug repositioning to discover innovative cosmeceuticals. *Experimental Dermatology*, 30(5), 628-644.
- Stangaciu S., 1999, Apiteraphy course notes, Constanta, *Apiteraphy Research Hospital Bucuresti*, P:286.
- Stavropoulou, E., Ieronymaki, E., Dimitroulia, E., Constantinidis, T. C., Vrioni, G., Tsatsanis, C., and Tsakris, A., 2022, Anti-Inflammatory and antibacterial effects and mode of action of Greek arbutus, chestnut, and fir honey in mouse models of inflammation and sepsis. *Microorganisms*, 10(12), 2374.
- Stępień, K., Wojdyła, D., Nowak, K., and Mołoń, M., 2020, Impact of curcumin on replicative and chronological aging in the *Saccharomyces cerevisiae* yeast. *Biogerontology*, 21, 109-123.
- Strachecka, A. J., Olszewski, K., and Paleolog, J., 2015, Curcumin stimulates biochemical mechanisms of *Apis mellifera* resistance and extends the apian life-span. *Journal of Apicultural Science*, 59(1), 129-141.
- Suerdem, T. B., Akyalcın, H., Altan, S., and Tosun, M. N., 2018, Screening of antimicrobial and antioxidant activity of different types of honey samples obtained from Geyikli (Çanakkale) province. *Communications Faculty of Sciences University of Ankara Series C Biology*, 27(2), 69-78.

- Sutkowska, J., Hupert, N., Gawron, K., Strawa, J. W., Tomczyk, M., Forlino, A., and Galicka, A., 2021, The stimulating effect of rosmarinic acid and extracts from rosemary and lemon balm on collagen type I biosynthesis in osteogenesis imperfecta type I skin fibroblasts. *Pharmaceutics*, 13(7), 938.
- Sentkowska, A., and Pyrżyńska, K., 2019, Investigation of antioxidant activity of selenium compounds and their mixtures with tea polyphenols. *Molecular Biology Reports*, 46, 3019-3024.
- Szwajgier, D., Baranowska-Wójcik, E., Winiarska-Mieczan, A., and Gajowniczek-Ałasa, D., 2022, Honeys as possible sources of cholinesterase inhibitors. *Nutrients*, 14(14), 2969.
- Şahin, G., and Şanlıer, N., 2018, Arı ürünleri ve sağlıklı beslenme. *Türkiye Klinikleri Animal Nutrition and Nutritional Diseases-Special Topics*, 4(3), 42-48.
- Şahin, S., and Karkar, B., 2019, The antioxidant properties of the chestnut bee pollen extract and its preventive action against oxidatively induced damage in DNA bases. *Journal of Food Biochemistry*, 43(7), E12888.
- Taeymans, J., Clarys, P., and Barel, A. O., 2014, 55 use of food supplements as nutricosmetics in health and fitness. *Handbook of Cosmetic Science and Technology*, 583-596.
- Takzaree, A., Goodarzi, M., Rastegar, T., Shahbabae, S., and Takzaree, N., 2019, Investigating histopathologic the synergistic effect of topical use of *Mentha pulegium* essential oil and honey in healing of cutaneous ulcers. *Journal of Medicinal Plants*, 18(72), 274-287.
- Tang, S. M., Deng, X. T., Zhou, J., Li, Q. P., Ge, X. X., and Miao, L., 2020, Pharmacological basis and new insights of quercetin action in respect to its anti-cancer effects. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 121, 109604.
- Tanuğur Samancı, A. E., and Kekeçoğlu, M., 2022, Development of a cream formulation containing bee venom and other bee products. *Journal of Cosmetic Dermatology*, 21(10), 4913-4920.
- Taqi, R., Debnath, M., Ahmed, S., and Ghosh, A., 2022, Advances on plant extracts and phytocompounds with acetylcholinesterase inhibition activity for possible treatment of Alzheimer's disease. *Phytomedicine Plus*, 2(1), 100184.
- Taş-Küçükaydın, M., Tel-Çayan, G., Çayan, F., Küçükaydın, S., Çiftçi, B. H., Ceylan, Ö., and Duru, M. E., 2023, Chemometric classification of chestnut honeys from different regions in Turkey based on their phenolic compositions and biological activities. *Food Chemistry*, 135727.
- Terzo, S., Calvi, P., Nuzzo, D., Picone, P., Galizzi, G., Caruana, L., ... and Amato, A., 2022, Preventive impact of long-term ingestion of chestnut honey on glucose disorders and neurodegeneration in obese mice. *Nutrients*, 14(4), 756.

- Terzo, S., Calvi, P., Nuzzo, D., Picone, P., Allegra, M., Mulè, F., and Amato, A., 2023, Long-term ingestion of sicilian black bee chestnut honey and/or d-limonene counteracts brain damage induced by high fat-diet in obese mice. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(4), 3467.
- Topal, E., Mărgăoan, R., Bay, V., Takma, Ç., Yücel, B., Oskay, D., ... and Kösoğlu, M., 2022, The effect of supplementary feeding with different pollens in autumn on colony development under natural environment and *in vitro* lifespan of honey bees. *Insects*, 13(7), 588.
- Topaloğlu, E. (2015). Determination of phytochemical and antioxidant properties of water extracts of various herbal products (Master thesis). Tokat, Turkey: Gaziosmanpaşa University.
- Tsiaka, T., Kritsi, E., Tsiantas, K., Christodoulou, P., Sinanoglou, V. J., and Zoumpoulakis, P., 2022, Design and development of novel nutraceuticals: Current trends and methodologies. *Nutraceuticals*, 2(2), 71-90.
- Turska, M., Paluszkiewicz, P., Turski, W. A., and Parada-Turska, J., 2022, A Review of the health benefits of food enriched with kynurenic acid. *Nutrients*, 14(19), 4182.
- Uduwana, S., Abeynayake, N., and Wickramasinghe, I., 2023, Synergistic, antagonistic, and additive effects on the resultant antioxidant activity in infusions of green tea with bee honey and Citrus limonum extract as additives. *Journal of Agriculture and Food Research*, 12, 100571.
- Ullah, H., Hussain, A., Asif, M., Nawaz, F., and Rasool, M., 2023, Natural products as bioactive agents in the prevention of dementia. *CNS and Neurological Disorders-Drug Targets (formerly current drug targets-cns and neurological disorders)*.
- Vanderplanck, M., Martinet, B., Carvalheiro, L. G., Rasmont, P., Barraud, A., Renaudeau, C., and Michez, D., 2019, Ensuring access to high-quality resources reduces the impacts of heat stress on bees. *Scientific Reports*, 9(1), 12596.
- Varol, A., Sezen, S., Evcimen, D., Zarepour, A., Ulus, G., Zarrabi, A., ... and Varol, M. (2022). Cellular targets and molecular activity mechanisms of bee venom in cancer: recent trends and developments. *Toxin Reviews*, 41(4), 1382-1395.
- Viuda-Martos, M., Ruiz-Navajas, Y., Fernández-López, J., Pérez-Álvarez, J.A., 2008, Functional properties of honey, propolis, and royal jelly. *Journal of Food Science*, 73, 117–124.
- Waghela, B. N., Sharma, A., Dhumale, S., Pandey, S. M., and Pathak, C., 2015, Curcumin conjugated with PLGA potentiates sustainability, anti-proliferative activity and apoptosis in human colon carcinoma cells. *PloS One*, 10(2), e0117526.
- Waheed, M., Hussain, M. B., Javed, A., Mushtaq, Z., Hassan, S., Shariati, M. A., ... and Heydari, M., 2019, Honey and cancer: A mechanistic review. *Clinical Nutrition*, 38(6), 2499-2503.

- Walczak-Nowicka, Ł. J., and Herbet, M., 2021, Acetylcholinesterase inhibitors in the treatment of neurodegenerative diseases and the role of acetylcholinesterase in their pathogenesis. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(17), 9290.
- Wang, M., 2017, Effects of fresh royal jelly on the proliferation of human hepatoma cell line SMMC-7721. *Proceedings of Anticancer Research*, 1(2).
- Wang, S., and Zhu, F., 2017, Dietary antioxidant synergy in chemical and biological systems. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 57(11), 2343–2357.
- Wasilah, K., and Handini, M., 2023, Protective effect of combination black seed oil (*Nigella sativa*) and honey on the duodenum of rats exposed to cisplatin. *Muhammadiyah Medical Journal*, 4(1), 8-14.
- Wheeler, M. M., and Robinson, G. E., 2014, Diet-dependent gene expression in honey bees: honey vs. sucrose or high fructose corn syrup. *Scientific Reports*, 4(1), 1-5.
- Wieczorek, P. P., Hudz, N., Yezerska, O., Horčinová-Sedláčková, V., Shanaida, M., Korytniuk, O., & Jasicka-Misiak, I., 2022, Chemical variability and pharmacological potential of propolis as a source for the development of new pharmaceutical products. *Molecules*, 27(5), 1600.
- Williams, G. R., Alaux, C., Costa, C., Csaki, T., Doublet, V., Eisenhardt, D., ... and Brodschneider, R., 2013, Standard methods for maintaining adult *Apis mellifera* in cages under in vitro laboratory conditions. *Journal of Apicultural Research*, 52(1), 1-36.
- Xi, X., Li, J., Guo, S., Li, Y., Xu, F., Zheng, M., ... and Han, C., 2018, The potential of using bee pollen in cosmetics: a review. *Journal of Oleo Science*, 67(9), 1071-1082.
- Xiao, J., Sarker, S. D., Nahar, L., and Cao, H., 2019, Report on the 2nd international symposium on phytochemicals in medicine and food (4–7 April 2017, FuZhou, China). *Food Chemistry*, 272, 182-184.
- Xu, D., Hu, M. J., Wang, Y. Q., and Cui, Y. L., 2019, Antioxidant activities of quercetin and its complexes for medicinal application. *Molecules*, 24(6), 1123.
- Yang, Y., Battesti, M. J., Djabou, N., Muselli, A., Paolini, J., Tomi, P., and Costa, J., 2012, Melissopalynological origin determination and volatile composition analysis of Corsican “chestnut grove” honeys. *Food Chemistry*, 132(4), 2144-2154.
- Yang, D., Wang, T., Long, M., and Li, P., 2020, Quercetin: its main pharmacological activity and potential application in clinical medicine. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*.
- Yıldız, O., Can, Z., Saral, Ö., Yuluğ, E., Öztürk, F., Aliyazıcıoğlu, R., ... and Kolaylı, S., 2013, Hepatoprotective potential of chestnut bee pollen on carbon tetrachloride-induced hepatic damages in rats. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*.

- Yildiz, O., Karahalil, F., Can, Z., Sahin, H., and Kolayli, S., 2014, Total monoamine oxidase (MAO) inhibition by chestnut honey, pollen and propolis. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 29(5), 690-694.
- Yılmaz, K., Ceylan, E., and Derelioğlu, G., 2022, Determination of chestnut honey consumption characteristics as a traditional treatment method and its effect on protection from covid-19. *Complementary Medicine Research*, 29(3), 205-212.
- You, M., Wang, K., Pan, Y., Tao, L., Ma, Q., Zhang, G., and Hu, F., 2022, Combined royal jelly 10-hydroxydecanoic acid and aspirin has a synergistic effect against memory deficit and neuroinflammation. *Food and Function*, 13(4), 2336-2353.
- Young, G. W. Z., and Blundell, R., 2023, A review on the phytochemical composition and health applications of honey. *Heliyon*, e12507.
- Yucel, B., Topal, E., and Kosoglu, M., 2017, Bee products as functional food. In superfood and functional food-an overview of their processing and utilization. *InTech*.
- Yucel, B., Acikgoz, Z., Bayraktar, H., and Seremet, C., 2011, The effects of Apilarnil (Drone bee larvae) administration on growth performance and secondary sex characteristics of male broilers. *Journal of Animal and Veterinary Advances*, 10(17), 2263-2266.
- Zaki, A. G., El-Sayed, E. S. R., Abd Elkodous, M., and El-Sayyad, G. S., 2020, Microbial acetylcholinesterase inhibitors for Alzheimer's therapy: recent trends on extraction, detection, irradiation-assisted production improvement and nano-structured drug delivery. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 104(11), 4717-4735.
- Zbucheá, A., 2021, The contribution of Apiphytotherapy in the management of open fracture of the right leg—case report. *Journal of Medical and Dental Science Research*, 8(8), 21-26.
- Zhao, H., Li, G., Guo, D., Li, H., Liu, Q., Xu, B., and Guo, X., 2021, Response mechanisms to heat stress in bees. *Apidologie*, 52, 388-399.
- Zheng, H., and Hu, F., 2009, Honeybee: a newly emerged model organism. *Acta Entomologica Sinica*, 52(2), 210-215.
- Zi Yun, C., Mohd Nor, N. H., Berahim, Z., and Thirumulu Ponnuraj, K., 2021, Cytotoxic evaluation of malaysian kelulut honey on human gingival fibroblast cell line using MTT Assay. *Journal of Dentistry Indonesia*, 28(2), 88-93.
- Zielińska, A., Alves, H., Marques, V., Durazzo, A., Lucarini, M., Alves, T. F., ... and Souto, E. B., 2020, Properties, extraction methods, and delivery systems for curcumin as a natural source of beneficial health effects. *Medicina*, 56(7), 336.

EKLER

EK-1 Kestane Balının İçerik Analizi

Özellikler	Kestane Balının Değerleri	Minimum-maksimum değerleri
Renk (mm)	87	Min. 60
Nem (%)	17	Maks. 20
HMF (mg/kg)	22.4	Maks. 40
Diyastaz sayısı	19.2	Min. 8
Prolin (mg/kg)	715	Min. 300
Asit (meq/kg)	28.2	Maks. 50
pH	4.5	-
İletkenlik (μS/cm)	1.05	Min. 0.8
Fruktoz (%)	32	-
Glikoz (%)	25.1	-
Sakaroz (%)	0.1	Maks. 5
Fruktoz/Glikoz	1.27	1.0-1.4
Fruktoz+Glikoz (%)	57.1	Min. 45

EK-2 Kestane Balının (KB) Polen Analizi

POLLEN YORUMU	TOPLAM POLLEN SAYISI/ADET/10G	AYÇİÇEK %	PAPATYAGİLLER FAM. %	DİKEN %	BAKLAGİLLER FAM. %	BALLIBABAGİLLER FAM. %	BEYAZ ÜÇGÜL %	CEHRİLER %	CİSTUS %	ÇAN ÇİÇEĞİGİLLER %	GEVEN %	GÜLGİLLER FAM. %	KESTANE %	KIRMIZI ÜÇGÜL %	KORUNGA %	LAHANAGİLLER FAM. %	MAYDANOZGİLLER FAM. %	MISIR %	ORMAN SARMAŞIĞI %	PEYGAMBER ÇİÇEĞİ %	PITRAK %	SIGIR KUYRUĞU %	SİNGİROTUGİLLER %	SÖĞÜT %	SÜPÜRGE ÇALISI %	ZAMBAKGİLLER FAM. %	ZEYTİNLER %	KIZILCIK %	GELİNCİKGİLLER %	SUMAK %	KEÇİ SAKALI %
Kestane	165.312	1.1	0.6	0.9	0.2	1.1	1.5	0.4	0.7	0.2	1.1	1.0	78.0	0.9	0.7	1.3	1.0	0.2	0.2	0.2	0.6	0.2	0.2	2.1	1.3	0.2	0.4	0.4	2.2	0.6	0.2

EK-3 Kestane Polenini (KP) Polen Analizi

Numune Kodu	Cinsi	Polen İçeriği	
R23.020152	Polen	%93 <i>Castanea sativa</i>	% 93 Kestane
		% 3 <i>Rhamnaceae</i>	% 3 Cehrigiller
		% 2 <i>Rosaceae</i>	% 2 Gülgiller
		% 1 <i>Fabaceae</i>	% 1 Baklagiller

EK-4 Arı Sütü 10-HDA Analizi

Numune Kodu	Cinsi	10-HDA (%)
R23.020151	Liyofilize Arı sütü	5.1

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler	
Adı Soyadı	Gizem SÖNMEZ OSKAY
Doğum Yeri	
Doğum Tarihi	Tarih girmek için tıklayın veya dokununuz.
Uyruğu	☒ T.C. ☐ Diğer:
Telefon	
E-Posta Adresi	
Web Adresi	

Eğitim Bilgileri	
Lisans	
Üniversite	Trakya Üniversitesi
Fakülte	Ziraat Fakültesi
Bölümü	Ziraat Mühendisliği/Zootekni
Mezuniyet Yılı	24.06.2010

Yüksek Lisans	
Üniversite	Yıldız Teknik Üniversitesi
Enstitü Adı	Fen Bilimleri Enstitüsü
Anabilim Dalı	Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı
Programı	Moleküler Biyoloji ve Genetik Programı

Doktora	
Üniversite	İstanbul Üniversitesi
Enstitü Adı	Fen Bilimleri Enstitüsü
Anabilim Dalı	Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı
Programı	Moleküler Biyoloji ve Genetik Programı

Makale ve Bildiriler	