T.C.

ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ

BİLİMSEL ARAŞTIRMA PROJELERİ KOORDİNASYON BİRİMİ

COTTON PELLET YÖNTEMİ İLE KRONİK İNFLAMASYON OLUŞTURULAN RATLARDA ARI ÜRÜNLERİNİN ANTİ-İNFLAMATUAR ETKİNLİKLERİNİN KARŞILAŞTIRILMASI

Proje No: TYL-2020/8459

LİSANSÜSTÜ TEZ PROJESİ-BAP PROJESİ

SONUÇ RAPORU

Proje Yürütücüsü:

Mine GÜLABOĞLU (Prof. Dr.)

Atatürk Üniversitesi Eczacılık Fakültesi/Biyokimya Anabilim Dalı

Araştırmacı:

Murat KÖSEDAĞ

Atatürk Üniversitesi Eczacılık Fakültesi/Biyokimya Anabilim Dalı

2021

ERZURUM

ÖNSÖZ

Kronik inflamasyon, inflamatuar uyaranlara karşı devam eden, uzun süreli konak yanıttır. Akut inflamatuar yanıtların aksine, kronik inflamasyon, bazı kronik inflamatuar hastalıklarda haftalar, aylar hatta ömür boyu sürebilir. T hücrelerinin, B hücrelerinin, plazma hücrelerinin veya makrofajların baskınlığı ile farklı tipte kronik inflamatuar reaksiyonlar görülebilir. Uzun süreli kronik inflamasyonda, plazma hücreleri inflamatuar infiltratta sıklıkla belirgindir ve bu tip inflamatuar reaksiyonda lokalize immünoglobulin salgılanması patofizyolojide önemli olabilir.

Apiterapi, arı ürünlerinin tedavi amaçlı olarak kullanıldığı geleneksel ve tamamlayıcı tıp uygulamalarından biridir. Literatürde arı ürünlerinden bal, propolis, arı sütü, polen ve arı ekmeğinin birçok hastalığın tedavisinde etkinliğini araştıran değişik çalışmalar yer almasına rağmen; arı ürünlerinin anti-inflamatuar etkinliğine yönelik kısıtlı sayıda çalışma mevcuttur.

Yaptığımız bu çalışmada kronik inflamasyon oluşturulmuş ratlarda, oral gavaj yöntemi ile arı ürünlerinden bal, propolis, arı sütü, polen ve arı ekmeğinin anti inflamatuar etkinliği araştırılmaktadır. Bu amaçla cotton-pellet yöntemi ile kronik inflamasyon sonrası verilecek arı ürünlerinin anti-inflamatuar etkinlikleri, hem lokal granulom üzerinden; hem de serum pro ve anti-inflamatuar sitokin düzeyleri (IL-1β, TNF-α, IL-6, IL-1ra, IL-4 ve IL-10) ölçülerek, oral gavaj yöntemi ile uygulanan arı ürünlerinin lokal ve sistemik anti-inflamatuar etkinlikleri araştırılmaktadır.

Bu çalışma Atatürk Üniversitesi tarafından desteklenmiştir. (Proje No: 2020/8459).

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

TABLO VE ŞEKİL LİSTESİ 1
Tablo Listesi 1
Şekil Listesi 1
ÖZET 2
ABSTRACT 3
1. GİRİŞ 4
2. GENEL BİLGİLER 5
2.1. Kronik İnflamasyon ve Sitokinler 5
2.1.1 Kronik İnflamasyon 5
2.1.2 Sitokinler 5
2.2. Arı Ürünleri 6
3. MATERYAL VE METOD 8
3.1. Hayvanlar ve Diet 8
3.2. Arı Ürünlerinin Temini 8
3.3. Biyokimyasal Kitlerin Temini 8
3. 4. Anestezi Maddelerinin Temini 8
3.5. Deney Öncesi Yapılan İşlemler 9
3.5.1. Cotton- Pelletlerin Hazırlanması 9
3.5.2. Arı Ürünlerinin Doz Ayarlaması 9
3.5.3. Deney Gruplarının Belirlenmesi 10
3.6. Hayvan Deney Prosedürü 10
3.6.1. Cotton Pelletlerin Yerleştirilmesi 10
3.6.2. Arı Ürünlerinin Uygulanması 11
3.6.3. Deneyin Sonlandırılması 11
3.6.4. Deney Numunelerinin Saklanması 12
3.7. Biyokimyasal Analizler 12
3.7.1 ELISA Testleri 12
4. BULGULAR 13
5. TARTIŞMA VE SONUÇ 22
6. SONUÇ VE ÖNERİLER 25
KAYNAKLAR 26

TABLO VE ŞEKİL LİSTESİ

Tablo Listesi

Tablo 1. Deney Grupları 10
Tablo 2. Çalışma gruplarının IL-4 düzeyleri 13
Tablo 3. Çalışma gruplarının IL-10 düzeyleri 14
Tablo 4. Çalışma gruplarının IL-1 RA düzeyleri 14
Tablo 5. Çalışma gruplarının IL-1 Beta düzeyleri 15
Tablo 6. Çalışma gruplarının IL-6 düzeyleri 16
Tablo 7. Çalışma gruplarının TNF-Alfa düzeyleri 16
Tablo 8. Çalışma gruplarının pro-inflamatuar ve anti-inflamatuar sitokin düzeylerinin istatistiksel karşılaştırılması 17
Tablo 9. Çalışma gruplarının "cotton pellet" kuru ağırlıklarının karşılaştırılması 18

Şekil Listesi

Şekil 1. Arı ürünlerinin IL-4 düzeyleri ve istatistiksel olarak post-hoc analizine göre karşılaştırılması 18
Şekil 2. Arı ürünlerinin IL-10 düzeyleri ve istatistiksel olarak post–hoc analizine göre karşılaştırılması 19
Şekil 3. Arı ürünlerinin IL-1RA düzeyleri ve istatistiksel olarak post–hoc analizine göre karşılaştırılması 19
Şekil 4. Arı ürünlerinin IL-1β düzeyleri ve istatistiksel olarak post–hoc analizine göre karşılaştırılması 20
Şekil 5. Arı ürünlerinin IL-6 düzeyleri ve istatistiksel olarak post–hoc analizine göre karşılaştırılması 20
Şekil 6. Arı ürünlerinin TNF-α düzeyleri ve istatistiksel olarak post–hoc analizine göre karşılaştırılması 21

ÖZET

Amaç: Arı ürünlerinin kronik inflamasyon üzerindeki etkinliğine yönelik literatürde henüz sınırlı sayıda çalışma bulunmaktadır. Bu çalışmada, literatürde ilk defa olmak üzere, kronik inflamasyon oluşturulmuş ratlarda, oral gavaj yöntemi ile uygulanacak arı ürünlerinden bal, propolis, arı sütü, polen ve arı ekmeğinin anti inflamatuar etkinliği araştırılması amaçlanmıştır.

Materyal ve Metot: Çalışmamızda 48 adet *Sprague dawley* cinsi, 200±20 gr dişi albino sıçan kullanılmıştır. Sıçanlardan sağlıklı grup, kontrol grubu, bal, propolis, polen, arı sütü ve arı ekmeği grupları oluşturulup her gruba yedi, sağlıklı gruba altı adet sıçan konulmuştur. Sağlıklı grup hariç diğer gruplarda cotton-pellet yöntemi ile kronik inflamasyon oluşturulmuş ve sadece tedavi gruplarına, grubuna özgü şekilde günde 1 gr/kg bal, 300mg/kg polen, 100 mg/kg propolis, 500 mg/kg arı ekmeği ve 100 mg/kg arı sütü oral gavaj ile verilmiştir. Bir hafta sonra cotton pelletler çıkarılıp, oluşan granülom ile birlikte çıkarılmış ve alınan kan örnekleri pro-inflamatuar ve anti-inflamatuar sitokin düzeyleri ELISA yöntemi ile ölçülmüştür. Sonuçlar istatistiksel olarak karşılaştırılmıştır.

Bulgular: Elde edilen verilere göre, araştırılan arı ürünleri olan bal, propolis, polen, arı ekmeği ve arı sütünün istatistiksel olarak anlamlı anti-inflamatuar etkinliklerinin olduğu saptanmış ve yine pro-inflamatuar sitokin düzeylerini de anlamlı düzeyde düşürdükleri saptanmıştır. ($p<0.001$) Anti inflamatuar sitokinlerden IL-4, IL-10 ve IL-1RA düzeylerini en çok yükselten arı ürünleri sırasıyla polen, arı ekmeği ve propolis olduğu görülmüştür. Pro-inflamatuar sitokinlerden IL-6 ve TNF-α düzeylerini en çok düşürenlerin sırayla polen, arı ekmeği ve propolis olmuşken; IL-1β'yı en fazla düşürenler ise polen, arı ekmeği ve bal olarak bulunmuştur. ($p<0.001$)

Sonuç: Bu çalışma ile tüm arı ürünlerinin anlamlı anti-inflamatuar etkinliklerinin olduğu bulunmuştur. Anti-inflamatuar etkinliği en yüksek arı ürününün polen olduğu, daha sonra ise sırayla arı ekmeği ve propolisin ikinci ve üçüncü sırada yer aldıkları belirlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: Arı ekmeği, arı sütü, bal, cotton-pellet, kronik inflamasyon, polen, propolis

ABSTRACT

Objective: There are limited studies in the literature on the effectiveness of bee products on chronic inflammation. In this study, it was aimed to investigate the anti-inflammatory activity of honey, propolis, royal jelly, pollen and bee bread, which are bee products to be applied by oral gavage method, for the first time in the literature, in rats with chronic inflammation.

Materials and Methods: In our study, 48 ***Sprague dawley*** female albino rats, 200±20 g, were used. Healthy group, control group, honey, propolis, pollen, royal jelly and bee bread groups were randomized and seven rats were placed in each group and six rats in the healthy group. Chronic inflammation was created by cotton-pellet method in other groups except the healthy group; and only for the treatment groups, 1 g/kg of honey, 300 mg/kg of pollen, 100 mg/kg of propolis, 500 mg/kg of bee bread and 100 mg/kg of royal jelly per day were given by oral gavage. One week later, cotton pellets were removed with the formed granuloma, and the pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokine levels of the blood samples were measured by ELISA method. The results were statistically compared.

Results: According to the data obtained, it was determined that honey, propolis, pollen, bee bread and royal jelly, which are the investigated bee products, have statistically significant anti-inflammatory activities and they also significantly reduce pro-inflammatory cytokine levels. ($p<0.001$) Among the anti-inflammatory cytokines, pollen, bee bread and propolis were found to increase the levels of IL-4, IL-10 and IL-1RA the most. Among the pro-inflammatory cytokines, pollen, bee bread and propolis were the ones that decreased IL-6 and TNF-α levels the most; Pollen, bee bread and honey were found to decrease IL-1β the most. ($p<0.001$)

Conclusion: In this study, it was found that all bee products have significant anti-inflammatory activities. It was determined that the bee product with the highest anti-inflammatory activity was pollen, followed by bee bread and propolis, respectively.

Keywords: Bee bread, chronic inflammation, cotton-pellet, honey, pollen, propolis, royal jelly

1. GİRİŞ

Geleneksel ve tamamlayıcı tıp uygulamaları arasında yer alan Apiterapi, apis (bal arısı) ve terapi kelimelerinden türetilmiş ve geçmişi beş bin yıl öncesine dayanan, fakat modern zamanlarda yeniden popüler olan bir tedavi uygulamasıdır. Apiterapi, bal arısı olan *Apis mellifera*'nın ürünleri olarak, bal, propolis, polen, arı sütü, arı ekmeği gibi ürünler muhtelif tedavi veya iyilik hali devamı için kullanılmaktadır.[1]

Arı ürünlerinin kronik inflamasyon üzerindeki etkinliğine yönelik yapılan çalışmalar, literatürde henüz sınırlı sayıda bulunmaktadır. Bu çalışmalar genellikle arı ürünlerinin kronik inflamasyonda etkinliği olduğunu göstermekle birlikte, hem tüm arı ürünlerini kapsamaması, hem de yüzeysel cilt dokusu gibi lokal anti-inflamatuar araştırmaları olması nedeniyle, yeterli kanıt seviyesi oluşturmamaktadır.

Yaptığımız bu çalışmamızda, literatürde ilk defa olmak üzere, kronik inflamasyon oluşturulmuş ratlarda, oral gavaj yöntemi ile uygulanacak arı ürünlerinden bal, propolis, arı sütü, polen ve arı ekmeğinin anti inflamatuar etkinliği araştırılması amaçlanmıştır. Bu amaçla cotton- pellet yöntemi ile oluşturulmuş kronik inflamasyon sonrası verilen arı ürünlerinin anti-inflamatuar etkinlikleri hem lokal granulom üzerinden, hem de serum pro ve anti-inflamatuar sitokin düzeyleri (IL-1β, TNF-α, IL-6, IL-1ra, IL-4 ve IL-10) ölçülerek, oral gavaj yöntemi ile uygulanan arı ürünlerinin lokal ve sistemik anti-inflamatuar etkinlikleri araştırılmış ve karşılaştırılmıştır.

Arı ürünlerinin anti-inflamatuar etkinliklerinin tespit edilmesi ile insan üzerinde yapılacak çalışmalara imkân tanınacak, böylece yıllardan beri geleneksel olarak kullanılmakta olan arı ürünlerinin bilimsel, kanıta dayalı etkinlikleri ortaya konulması amaçlanmaktadır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kronik İnflamasyon ve Sitokinler

2.1.1 Kronik İnflamasyon

Kronik inflamasyon, inflamatuar uyaranlara karşı devam eden, uzun süreli konak yanıtını olarak tanımlanabilmektedir. Genel olarak, üç nedene bağlı olarak kronik inflamatuar yanıt ortaya çıkar: düşük virülanslı mikroorganizmalar, otoimmün hastalıklarda kendi antijenlere karşı ve temizlenmesi zor olan ekzojen maddelere karşı. Karakteristik olarak, kronik inflamasyon, yok edilmesi zor olan patojenlerin kalıcı enfeksiyonlarına yanıt olarak ilerler.[2]

Akut inflamatuar yanıtların aksine, kronik inflamasyon, bazı kronik inflamatuar hastalıklarda haftalar, aylar hatta ömür boyu sürebilir. T hücrelerinin, B hücrelerinin, plazma hücrelerinin veya makrofajların baskınlığı ile farklı tipte kronik inflamatuar reaksiyonlar görülebilir. Uzun süreli kronik inflamasyonda, plazma hücreleri inflamatuar infiltratta sıklıkla belirgindir ve bu tip inflamatuar reaksiyonda lokalize immünoglobulin salgılanması patofizyolojide önemli olabilir.[3]

Makrofajlar, kronik inflamatuar yanıtların temel hücresel unsurlarıdır. Klasik olarak aktive olan makrofajlar, mikrobiyal patojenler gibi zararlı ajanların ortadan kaldırılmasında merkezi bir rol oynar. Klasik olarak aktive edilmiş makrofajlar, kronik inflamasyonda ve gecikmiş aşırı duyarlılık olarak adlandırılan bir tür immün inflamatuar yanıtta ve bunun sonucu olarak temas duyarlılığında gözlenen doku hasarının çoğundan sorumludur. Bu makrofajların özellikleri ve işlevleri arasında artan miktarlarda lizozomal enzimler; bazı reaktif oksijen ara ürünlerinin, özellikle hidrojen peroksitin artan üretimi, reaktif nitrojen ara ürünlerinin artan üretimi ve birçok sitokinin (örneğin, interlökin (IL)-12, tümör nekroz faktörü (TNF)-alfa), büyüme faktörlerinin ve diğer inflamatuar medyatörün üretiminin artması görülebilir.[2]

2.1.2 Sitokinler

Sitokinler başta lenfositler, monositler ve makrofajlar ile bazı somatik hücreler tarafından sentezlenen ve hücreler arası iletişimde sorumlu haberci moleküller olarak görev üstlenen ve vücut savunmasında yer alan peptid veya glikoprotein yapıdaki eriyebilir

moleküllerdir.[4] İlgili hücreler tarafından sentezlenip bağışıklık yanıtının düzenlenmesinde görev alan "hormon benzeri" bu moleküller, hücresel kökenlerine göre lenfokinler ve monokinler olarak ikiye ayrılır. T ve B hücreleri tarafından sentezlenen sitokinler lenfokin olarak; monositler tarafından sentezlenen sitokinler ise monokin olarak adlandırılır.[5]

Th1 kökenli sitokinler pro-inflamatuar; Th2 kökenli sitokinler ise anti-inflamatuar özelliktedir ve üretilen bu sitokinler birçok enfeksiyon, otoimmün ve malign hastalıkların patolojisine etki etmektedir.[6]

Th1 alt grubu hücreleri, makrofajların fagositoz ve mikrop öldürme kapasitelerini artırarak enfeksiyonlara karşı savunma geliştirir. Th2 alt grubu hücreleri ise B hücrelerini, IgM ve komplemanı fiske etmeyen IgG4 ve IgE yapmaya yönetip hem akut hem de kronik inflamasyonu ve geç tipte hücresel duyarlılık reaksiyonunu inhibe ederler. Hümoral bağışıklık cevabın şiddetinin artmasında rol oynarlar.[7]

Th1 alt grubu tarafından sentezlenen sitokinler: IFN-γ, TNF-α ve β, IL-2, IL-3, GM-CSF; Th2 alt grubu tarafından sentezlenen sitokinler: IL-3, IL-4, IL-5, IL-10, IL-13.[8]

Zinsser ve Tamiya 1926 yılında sitokinlerin aktivitelerini ilk kez tanımlayarak, sitokinlerin lökositlerden salgılanan çözünür maddeler olduğunu ve damar duvarı fonksiyonlarını etkilediklerini bildirmişlerdir. Aynı yıllarda enfeksiyon hastalıkları ve antijene bağımlı immun yanıtın üstüne yapılan araştırmalarla sitokinler hakkında bilinenler daha da artmış ve 1980'lerden itibaren moleküler klonlama teknolojisi kullanılarak sitokinlerin karakterizasyonu yapılmıştır. Böylece birçok yeni sitokininin daha keşfi mümkün olabilmiştir. Geçmişten günümüze hızlanarak devam eden araştırmalar sayesinde, sitokinler hakkında bilinenler her geçen gün daha da artmakta ve hastalıkların ortaya çıkış mekanizmasında sitokinlerin rolü daha iyi anlaşılmaktadır.[9]

2.2. Arı Ürünleri

Bal, asidik bir gıdadır ve ortalama olarak asitliği %0.57 (%0.017–1.17); pH'sı ise 3,9 (3,4 – 6,1)'dir. İçerdiği çeşitli organik asitler: başta glukonik asit olmak üzere bütirik, asetik, laktik, formik, süksinik, sitrik, malik ve okzalik asittir.[10]

Çiçekli bitkilerin erkek organlarında meydana gelen üreme ünitelerine **polen** denir. Arı poleni ise, genç işçi arıların bitkilerden topladıkları bu saf poleni bir miktar tükürük sıvısı ile kaplayarak yapışkanlık kazandırıp, pelet (topak) haline getirdikleri halidir. Oluşan bu yeni ürün, "arı ürünü" olarak bilinen arı polenidir.[11]

Polende çeşitli vitaminler, 28 farklı mineral, 11 enzim ya da koenzim, 14 yağ asidi, 11 karbonhidrat bulunur ve kalori açısından düşüktür. Polen, bal arısı larvalarının gelişimi için son derece önemli bir yeri olan B vitaminlerince (B1, B2, B3, B5, B6) zengindir ve polenin, vitamin C, A, E, folik asit, rutin, karotenoidler, biotin, riboflavin, niasin, HGH (insan büyüme hormonu) ve gonadotropin içerdiği de saptanmıştır.[12] Polenin işçi arılar tarafından toplanmasının sebebi, koloninin arı sütü üretimi ve yavru yetiştiriciliğinde protein ihtiyacını karşılamaktır. Polende, arginin, histidin, lösin, isolösin, lisin, metiyonin, fenilalanin, treonin, triptofan ve valin gibi esansiyel aminoasitler bulunur.[13]

Arı ekmeği de polenle benzer bileşime sahiptir ancak polenden farklı olarak özel enzimlerce fermente edilir ve bu sayede içerisindeki mineraller daha yararlı bir duruma gelir. Böylece, polene göre en az üç kat daha yüksek biyoaktif özelliğe sahip olur. Arı ekmeğinin etkileri polene benzer olmasına karşın, sindirimi polene oranla çok daha kolaydır.[14,15]

Propolis, işçi arıların çeşitli bitkilerin yaprak, tomurcuk, kabuk ve benzeri bölgelerinden topladığı, reçineli ve mum kıvamında, yapışkan, güçlü güzel kokuya sahip ve suda erimeyen bir maddedir.[16] Propolis, işçi arıların çeşitli bitkilerin yaprak, tomurcuk, kabuk ve benzeri bölgelerinden topladığı, reçineli ve mum kıvamında, yapışkan, güçlü güzel kokuya sahip ve suda erimeyen bir maddedir. Propolisin içerdiği flavon ve flavonoidler propolise antiviral, antibakteriyel ve antifungal özellikler kazandıran maddelerdir.[17]

Arı sütü, 5-15 günlük genç işçi arıların (*Apis mellifera* L.) boğaz bezleri (hipofarengeal) ve üst çene (mandibular) bezlerinden salgıladığı ve ana arı larvalarının temel besinini oluşturan yapışkan bir maddedir.[18] Genç işçi arılar, topladıkları polen ve nektarı sindirim organlarında hazmettikten sonra, baş kısımlarında bulunan yavru gıdası salgı bezlerinden arı sütü salgılarlar.

Arı sütü henüz salgılanıp ağız boşluğuna verildiğinde süt kıvamındayken; petek gözlerine konulduktan sonra koyulaşır ve krem rengini alır.[19] Rengi normalde sarımtırak olup; depolama süresine göre rengi koyulaşmaktadır. Kokusu keskin, tadı ekşimsi ve tatlıdır. Arı sütü suda kısmen çözünebilen, viskoz, jel kıvamında, yoğunluğu 1.1 g/ml ve pH`sı 3.4-4.5 olan bir maddedir.[20] Arı sütü, su (%50-60), proteinler (%18), karbonhidratlar (%15), lipitler (%3-6), eser mineraller, suda çözünür vitaminler, serbest aminoasitlerden oluşan kompleks bir bileşiktir.[21]

3. MATERYAL VE METOD

3.1. Hayvanlar ve Diet

Çalışmamızda Atatürk Üniversitesi Tıbbi Deneysel Uygulama ve Araştırma Merkezi (ATADEM)'nden temin edilen, ağırlıkları yaklaşık 200-220 gram arasında değişen ***Sprague dawley*** cinsi dişi albino ratlar kullanıldı. Hayvan deneyleri ve bakımları ATADEM' de yapıldı. Sınırsız yem (standart diet) ve içme suyu (musluk suyu) verilen ratlar deney boyunca normal oda sıcaklığında (22 ± 2 ^{o}C), 12 saat aydınlık/karanlık bir ortamda kendilerine ait kafeslerde gruplar halinde barındırıldı. Tüm deney süresince her hayvan sadece bir kez kullanıldı. Yapılan bu çalışmaların tüm aşamaları Atatürk Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu tarafından 03.12.2019 tarih ve 75296309-050.01.04-E.1900348040 sayılı yazısı ile etik kurallara uygun olduğu onaylandı.

3.2. Arı Ürünlerinin Temini

Deneyde kullanılan arı ürünlerinden arı sütü, arı ekmeği(perga), polen ve organik çiçek balı, Eğriçayır® (Çaylı Organik Tarım Limited Şirketi, Erdemli / Mersin); su bazlı propolis ise Beeo Arı Ürünleri® (SBS Bilimsel BIO Çözümler Sanayi ve Ticaret Anonim Şirketi, İstanbul) firmalarından temin edilmiştir.

3.3. Biyokimyasal Kitlerin Temini

Pro-inflamatuar ve anti-inflamatuar sitokin düzeylerinin ölçümleri için BT Lab® (Bioassay Technology Laboratory, Shangai, Çin) ELISA test kitleri kullanılmıştır.

3. 4. Anestezi Maddelerinin Temini

Cerrahi işlemler öncesi gerçekleştirilen anestezide ve deney sonrası ötenazi işlemlerinde Ketamin (Ketalar® Pfizer İlaçları Ltd. Şti. ABD) ve Xylazine (Xylazin Bio® Bioveta Plc. Çek Cumhuriyeti) kullanılmıştır. Deney hayvanlarına, anestezi ve ötenazi işlemleri için Ketamin (90 mg/kg) ve Xylazine (10 mg/kg) oranında intramusküler yoldan verilmiştir.

3.5. Deney Öncesi Yapılan İşlemler

3.5.1. Cotton- Pelletlerin Hazırlanması

Çalışmamızda, Winter ve Porter tarafından sıçanlarda kronik inflamasyon oluşturmak amacıyla uygulanmış olan "cotton pellet" yöntemi kullanılmıştır.[22]

Sıçanların sırt kısmına koyulacak cotton pelletler için %100 saf pamuktan elde edilmiş steril olmayan hidrofil pamuk kullanılmıştır. Cotton pelletler, her sıçana bir adet olacak şekilde hazırlanmıştır. Her bir cotton pellet için 8 ± 0,1 mg ağırlığında pamuk kullanılmıştır. Pamuklar hassas terazide tek tek tartılıp elde yuvarlatılarak küçük topçuklar şeklinde cotton-pelletler haline getirilmiştir.

Hazırlanan pelletler Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Temel Mikrobiyoloji Anabilim Dalı`nda sterilizasyonu gerçekleştirilmiştir. Sterilizasyon işlemi için cam beher kabın içerisine tüm pamuk toplar konularak, beherin ağzı alüminyum folyo ile kapatılarak, otoklavda 80 C°`de iki saat tutularak sterilize edilmiştir.

3.5.2. Arı Ürünlerinin Doz Ayarlaması

Deney öncesi, sıçanlara verilecek her bir arı ürünü için literatür taraması yapılarak tüm arı ürünleri için uygun dozlar belirlenmiş ve doz ayarlaması yapılmıştır.

Literatür taraması yapılarak, bal grubu için: 1 gr/kg bal[23], propolis grubu için:100 mg/kg propolis[24], arı sütü grubu için:100mg/kg arı sütü[25], polen grubu için:300mg/kg polen[26], arı ekmeği grubu için:500mg/kg arı ekmeği[27] verilmesine karar verilmiştir.

Yedi gün sürecek deney süresince tüm arı ürünleri her deney öncesi literatüre bağlı kalınarak günlük taze olacak şekilde hazırlanmıştır. Her gün deney öncesi tüm arı ürünleri, tek tek hassas terazi ölçümleri yapılarak 5 ayrı flakona alınmıştır. Arı ürünlerinin bulunduğu flakonlara yaklaşık 7 cc`lik distile su eklenerek, toplam 8 cc'ye tamamlanmış, böylece her sıçan için 1 cc olacak şekilde, vortex cihazı ile karıştırılarak verilecek dozlar günlük olarak hazırlanmıştır.

3.5.3. Deney Gruplarının Belirlenmesi

Kronik inflamasyon tedavi etkinliğinin araştırılması amacıyla, cilt altı cotton pellet yerleştirme yöntemi kullanılarak kronik inflamasyon oluşturulacak olan ratlar "bal, propolis, arı sütü, polen ve arı ekmeği" verilecek 5 tedavi grubu olarak, randomize edilerek kafeslere alınmıştır. Ayrıca inflamasyon sonrası distile su verilecek bir kontrol grubu ve hiçbir işlem yapılmayacak olan bir sağlıklı grup, yine randomize iki ayrı kafese alınmıştır. Böylece toplam 7 grup oluşturulmuştur (Tablo 1).

Tablo 1. Deney Grupları

Gruplar		Uygulanan İşlem	Verilen Madde
1	Sağlıklı grup	Hiçbir işlem uygulanmadı	-
2	Kontrol grubu	Cotton pellet ile inflamasyon modeli	Distile Su
3	Apiterapi grubu 1	Cotton pellet ile inflamasyon modeli	Bal
4	Apiterapi grubu 2	Cotton pellet ile inflamasyon modeli	Polen
5	Apiterapi grubu 3	Cotton pellet ile inflamasyon modeli	Propolis
6	Apiterapi grubu 4	Cotton pellet ile inflamasyon modeli	Arı Ekmeği
7	Apiterapi grubu 5	Cotton pellet ile inflamasyon modeli	Arı Sütü

3.6. Hayvan Deney Prosedürü

3.6.1. Cotton Pelletlerin Yerleştirilmesi

Hayvanlar üstünde cerrahi işlemler, Atatürk Üniversitesi Tıbbi Deneysel Uygulama ve Araştırma Merkezi (ATADEM) bünyesinde, uygun steril şartlar altında cerrahi işlem odasında gerçekleştirilmiştir.

Cerrahi işlem öncesi, sıçanlar tek tek sıraya koyularak Ketamin/Xylazine (90/10 mg/kg) anestezisi altında ilk önce sırt kısmı tıraşlanıp kıllardan arındırılmıştır. Sırtı tıraşlanan hayvan, henüz anestezi altındayken hiç vakit kaybetmeden müdahale odasına alınıp cerrahi işlemlere başlanmıştır. Bir önceki sıçanın cerrahi işlemleri devam ederken bir sonraki sıradaki sıçan aynı şekilde anestezi altına alınarak tıraş edilip cerrahi işleme hazır hale getirilmiştir.

Cerrahi işleme, sıçanın tıraşlanmış sırt derisine aseptik şartlarda, batikon ile cilt temizlenerek, bisturi ile 0,5 cm kadar küçük bir kesi yapılarak başlanmıştır. Yapılan küçük kesi penset ile hafifçe genişletilerek cilt altı bölgeye bir adet cotton-pellet (8±0,1 mg) yerleştirilmiş

ve sonra dikiş atılarak kapatılmıştır. Cerrahi işlem bu şekilde tamamlanmış ve sıçanlar temizlenmiş, havalandırılmış, yem ve suları yenilenmiş kafeslere konularak dinlenmeye alınmıştır.

3.6.2. Arı Ürünlerinin Uygulanması

Cerrahi işlemin yapıldığı gün hayvanlara sadece standart rat yemi ve su verilmiştir. İki saat aralıklarla sağlık durumları kontrol edilmiş, 24 saatin sonunda cotton pellet yerleştirilmiş sıçanların sırt bölgesinde şişlik belirtileri ortaya çıkmaya başlamıştır. Hayvanlara, inflamasyon belirtilerinin ortaya çıktığı günden başlanarak guruplarına göre belirlenmiş olan arı ürünleri verilmeye başlandı. Sağlık gurubuna hiçbir cerrahi müdahale yapılmamış, standart rat yemi ad-libitum beslendi. Kontrol gurubuna, cerrahi işleme tabii tutularak kronik inflamasyon yapıldı. Hayvanlara sadece standart rat yemi ve su verildi.

Birinci deney gurubu**,** cerrahi işleme tabii tutularak kronik inflamasyon yapıldı ve günde 1 gr/kg bal verildi. Ayrıca standart rat yemi ve su ile beslendi.

İkinci deney gurubu**,** cerrahi işleme tabii tutularak kronik inflamasyon yapıldı ve günde 300mg/kg polen verildi. Ayrıca standart rat yemi ve su ile beslendi.

Üçüncü deney gurubu**,** cerrahi işleme tabii tutularak kronik inflamasyon yapıldı ve günde 100 mg/kg propolis verildi. Ayrıca standart rat yemi ve su ile beslendi.

Dördüncü deney gurubu**,** cerrahi işleme tabii tutularak kronik inflamasyon yapıldı ve günde 500mg/kg arı ekmeği (perga) verildi. Ayrıca standart rat yemi ve su ile beslendi.

Beşinci deney gurubu**,** cerrahi işleme tabii tutularak kronik inflamasyon yapıldı ve günde 100mg/kg arı sütü verildi. Ayrıca standart rat yemi ve su ile beslendi.

3.6.3. Deneyin Sonlandırılması

Deney, cerrahi işlem yapılan gün ve sonraki arı ürünlerinin verildiği 6 gün olmak üzere toplam 7 gün sürdü. Yedinci günün sonunda hayvanlar tekrar cerrahi işlem odasına alındı ve Ketamin/Xylazine (90/10 mg/kg) anestezisi altında insülin enjektörü yardımıyla kalplerinden 4± cc kadar kan örneği alındı ve sırtlarına yerleştirilmiş cotton pelletler çıkarılarak, cotton pellet ve etrafında oluşmuş granülom dokusu ayrı poşetlere konuldu ve -20 C°`de bir gece saklanmak üzere dolaba kaldırıldı. Yine tüm sıçanlardan alınan kan örnekleri bir gece boyunca bekletilmek üzere +4 °C`lik buzdolabına konuldu.

3.6.4. Deney Numunelerinin Saklanması

Deney sonlandırıldıktan sonraki gün, kan örnekleri dolaptan çıkarılarak 2000-3000 RPM`de 10 dakika süresince santrifüjü yapıldı ve elde edilen süpernatantların bir bölümü serum sitokin düzeyi ölçümünün yapılacağı güne kadar kısa bir süreliğine -20 °C`de bekletildi. Diğer bölümü de örneklerin yedek bir numunesinin bulunması amacıyla alikodlanarak -80 C°`lik derin dondurucuda bekletildi.

-20 C`de saklanan etrafında oluşmuş granülom dokusu oluşmuş cotton-pellet örnekleri çıkarılarak 70 C°`de 2 saat boyunca kurutuldu ve hassas terazide her biri ayrı ayrı tartıldı ve mg cinsinden sonuçları not edildi.

3.7. Biyokimyasal Analizler

Arı ürünlerinin kronik inflamasyon üstünde anti-inflamatuar etkinliğini gözlemlemek ve karşılaştırmasını yapmak üzere sıçanlar üstünde modellediğimiz bu çalışmada, deney sonunda hayvanlardan alınan kan örnekleri ile serum sitokin düzeyleri ölçülerek, arı ürünlerinin immun sistem üstündeki etkileri gözlemlenmiştir. Aynı zamanda beş arı ürünü karşılaştırılarak içlerinden en etkili anti-inflamatuar özelliğe sahip arı ürününün hangisi olduğu araştırıldı.

Bu amaçla, elde edilmiş tüm serum örnekleri üzerinden, pro-inflamatuar etkiye sahip sitokinler olan serum IL-1β, TNF-α ve IL-6 düzeyleri ile anti-inflamatuar etkiye sahip sitokinler olan IL-1RA, IL-4 ve IL-10 düzeyleri, her bir sitokine özel ELISA test kitleri kullanılarak ölçülmüştür.

3.7.1 ELISA Testleri

Çalışmamızda, sıçanların serum IL-1β, IL-1RA, TNF-α, IL-4, IL-6, ve IL-10 düzeyleri ölçümlerinin tümü, BT Lab (Bioassay Technology Laboratory, Shangai, Çin)'dan temin edilen ELISA test kitler kullanılarak ölçülmüştür.

IL-1β, IL-1RA, IL-4, IL-6 ve IL-10 ELISA test kitlerinin Lot numaraları: 202011017 iken; TNF-alfa ELISA kitinin Lot numarası: 202104006'dır.

IL-1β ELISA kit için katalog numarası: E0119Ra; IL-1RA ELISA kit için katalog numarası: E0122Ra, IL-4 ELISA kit için katalog numarası: E0133Ra; IL-6 ELISA için kit katalog numarası: E0135Ra, IL-10 ELISA kit için katalog numarası: E0108Ra; TNF-alfa ELISA kit için katalog numarası ise E0764Ra'dır.

4. BULGULAR

Çalışmamızda “cotton pellet” yöntemi ile kronik inflamasyon oluşturulan ratlarda, arı ürünlerinin anti-inflamatuar etkinliği araştırılmış, yedi günlük tedavi sonrası sakrifisiye edilen ratlardan kanları alınarak, pro-inflamatuar ve anti-inflamatuar sitokin düzeyleri çalışılmıştır.

Anti-inflamatuar sitokinlerden IL-4 düzeylerine bakıldığında, sağlıklı gruba göre kontrol grubu IL-4 düzeyi azalmışken, tüm arı ürünlerinde sağlıklı gruba ve kontrol grubuna göre belirgin artış olduğu ve istatistiksel olarak anlamlı farklılık olduğu saptanmıştır ($p<0.001$). Çalışma gruplarının IL-4 düzeyleri Tablo 2’de sunulmuştur.

Tablo 2. Çalışma gruplarının IL-4 düzeyleri

	Ortalama	Standart sapma	Ortanca	Interquartile Range	P
Sağlıklı (ng/L)	44.91	2.02	45.25	3.21	<0.001
Kontrol (ng/L)	32.33	5.19	32.66	7.08	
Propolis (ng/L)	63.19	3.10	62.11	6.13	
Bal (ng/L)	55.70	1.53	55.38	2.61	
Arı Sütü (ng/L)	51.92	2.55	52.69	4.31	
Polen (ng/L)	92.05	10.38	90.29	19.51	
Arı Ekmeği (ng/L)	71.92	4.01	71.76	7.28	

Diğer bir anti-inflamatuar sitokin olan IL-10 düzeyine bakıldığında, IL-4 düzey değişimlerine benzer şekilde, sağlıklı gruba göre kontrol grubun IL-10 düzeylerinin düşük olduğu, tam tersi tüm arı ürünleri gruplarının IL-10 düzeyleri sağlıklı gruptan yüksek olduğu ve istatistiksel olarak anlamlı olduğu görülmektedir ($p<0.001$) (Tablo 3).

Tablo 3. Çalışma gruplarının IL-10 düzeyleri

	Ortalama	Standart sapma	Ortanca	Interquartile Range	P
Sağlıklı (pg/ml)	56.76	6.04	57.40	8.69	<0.001
Kontrol (pg/ml)	41.28	4.91	42.72	10.16	
Propolis (pg/ml)	73.09	1.59	73.54	2.59	
Bal (pg/ml)	71.02	2.56	71.95	3.93	
Arı Sütü (pg/ml)	68.06	1.89	68.35	3.94	
Polen (pg/ml)	92.23	7.33	93.22	11.21	
Arı Ekmeği (pg/ml)	76.24	0.82	76.28	1.35	

Çalışmamızda bakılan diğer bir önemli anti-inflamatuar sitokin olan IL-1RA düzeyi incelendiğinde, kontrol grubun IL-1 RA düzeyi sağlıklı gruba göre daha düşük iken, tüm arı ürünleri gruplarında IL-1 RA düzeylerinde kontrol grubuna göre yüksek olduğu tespit edilmiş ve istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmıştır ($p<0.001$) (Tablo 4).

Tablo 4. Çalışma gruplarının IL-1 RA düzeyleri

	Ortalama	Standart sapma	Ortanca	Interquartile Range	P
Sağlıklı (ng/L)	12.68	0.57	12.63	0.98	<0.001
Kontrol (ng/L)	8.40	0.33	8.41	0.53	
Propolis (ng/L)	17.84	1.88	17.93	3.67	
Bal (ng/L)	14.25	0.34	14.23	0.63	
Arı Sütü (ng/L)	11.36	0.65	11.25	1.29	
Polen (ng/L)	34.17	6.82	31.28	9.54	
Arı Ekmeği (ng/L)	22.00	3.03	20.66	3.68	

Çalışma kapsamında kan düzeyi bakılan pro-inflamatuar sitokinlerden IL-1 Beta düzeyleri incelendiğinde, kontrol grup IL-1 Beta düzeyinin sağlıklı gruba göre arttığı, tüm arı ürünlerinde ise IL-1 Beta düzeylerinin ise hem kontrol hem de sağlıklı gruba göre düşük oldukları ve istatistiksel olarak anlamlı farklılık olduğu tespit edilmiştir ($p<0.001$) (Tablo 5).

Tablo 5. Çalışma gruplarının IL-1 Beta düzeyleri

	Ortalama	Standart sapma	Ortanca	Interquartile Range	P
Sağlıklı (pg/ml)	90.55	7.08	90.54	10.62	<0.001
Kontrol (pg/ml)	103.63	13.35	100.31	24.48	
Propolis (pg/ml)	49.19	8.26	48.62	17.28	
Bal (pg/ml)	45.14	30.13	60.21	61.51	
Arı Sütü (pg/ml)	73.60	2.28	73.61	3.66	
Polen (pg/ml)	23.18	4.06	22.60	7.81	
Arı Ekmeği (pg/ml)	34.16	2.83	34.73	4.34	

Çalışmamızda bakılan diğer bir pro-inflamatuar sitokin olan IL-6 açısından benzer bir görüntü saptanmış, sağlıklı gruba göre kontrol grubunda IL-6 düzeyi yüksek olduğu, tüm arı ürünleri gruplarında ise IL-6 düzeyleri hem kontrol grubundan hem de sağlıklı gruptan belirgin düşük oldukları, istatistiksel olarak anlamlı olduğu saptanmıştır ($p<0.001$) (Tablo 6).

Tablo 6. Çalışma gruplarının IL-6 düzeyleri

	Ortalama	Standart sapma	Ortanca	Interquartile Range	P
Sağlıklı (ng/L)	8.23	0.15	8.25	0.25	<0.001
Kontrol (ng/L)	10.29	1.24	10.11	2.61	
Propolis (ng/L)	6.98	0.18	7.01	0.35	
Bal (ng/L)	7.36	0.23	7.36	0.36	
Arı Sütü (ng/L)	7.79	0.21	7.71	0.38	
Polen (ng/L)	6.00	0.12	6.02	0.21	
Arı Ekmeği (ng/L)	6.42	0.26	6.40	0.37	

Çalışmamızda bakılan son pro-inflamatuar sitokin olan TNF-alfa düzeylerinde ise, kontrol grup TNF-alfa düzeyi sağlıklı gruptan yüksek olduğu saptanmış, ancak tüm arı ürünleri gruplarının TNF-alfa düzeyleri ise hem kontrol grubundan hem de sağlıklı gruptan belirgin düşük olduğu ve istatistiksel olarak anlamlı olduğu tespit edilmiştir ($p<0.001$) (Tablo 7).

Tablo 7. Çalışma gruplarının TNF-Alfa düzeyleri

	Ortalama	Standart sapma	Ortanca	Interquartile Range	P
Sağlıklı (ng/L)	117.07	7.25	115.19	11.99	<0.001
Kontrol (ng/L)	129.33	5.76	130.53	9.58	
Propolis (ng/L)	63.32	5.35	62.51	9.42	
Bal (ng/L)	87.66	7.87	90.46	13.49	
Arı Sütü (ng/L)	108.95	7.75	107.29	15.05	
Polen (ng/L)	17.94	2.01	17.93	3.81	
Arı Ekmeği (ng/L)	42.52	3.57	40.64	7.17	

Çalışmamızda, pro-inflamatuar ve anti-inflamatuar sitokinlerin gruplar arasındaki istatistiksel farklılığı tek yönlü ANOVA analizi ile araştırıldığında, tüm sitokinlerde anlamlı farklılık olduğu tespit edilmiştir ($p<0.001$) (Tablo 8).

Tablo 8. Çalışma gruplarının pro-inflamatuar ve anti-inflamatuar sitokin düzeylerinin istatistiksel karşılaştırılması

	P*
IL-4	<0.001
IL-6	<0.001
IL-10	<0.001
IL-1beta	<0.001
IL-1RA	<0.001
TNF-alfa	<0.001

*One-way ANOVA

Çalışma gruplarının pro-inflamatuar ve anti-inflamatuar sitokin düzeylerinin anlamlı bulunması üzerine post–hoc analiz yapılarak gruplar arası anlamlı farklılık olup olmadığı araştırılmıştır. Bu kapsamda ilk olarak bakılan IL-4 düzeyi tüm gruplar arası anlamlı farklılık bulunmuş ($p<0.05$), sadece arı sütü ile bal grupları arası anlamlı farklılık bulunmamıştır ($p=0.174$) (Tablo 4.7).

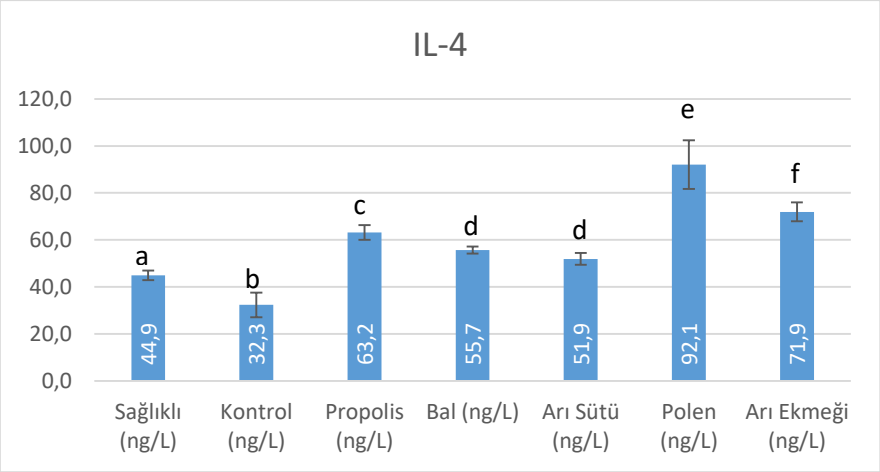
Çalışma sonrasında yerleştirilmiş tüm “cotton pelletler” etraflarındaki granülasyon dokuları ile birlikte çıkarılmışlar ve 60^0 derecede iki saat boyunca etüvde kurutulmuş ve sonrasında tartılmışlardır. Grupların cotton pellet ağırlıkları ve istatistiksel analizi Tablo 9’da sunulmuştur.

Tablo 9. Çalışma gruplarının "cotton pellet" kuru ağırlıklarının karşılaştırılması

	Ortalama	Standart sapma	P*
Kontrol	154.37	20.39	0.668
Propolis	183.60	47.71	
Bal	180.57	47.56	
Arı Sütü	176.74	47.69	
Polen	134.97	33.77	
Arı Ekmeği	172.73	61.73	

*One-way ANOVA test

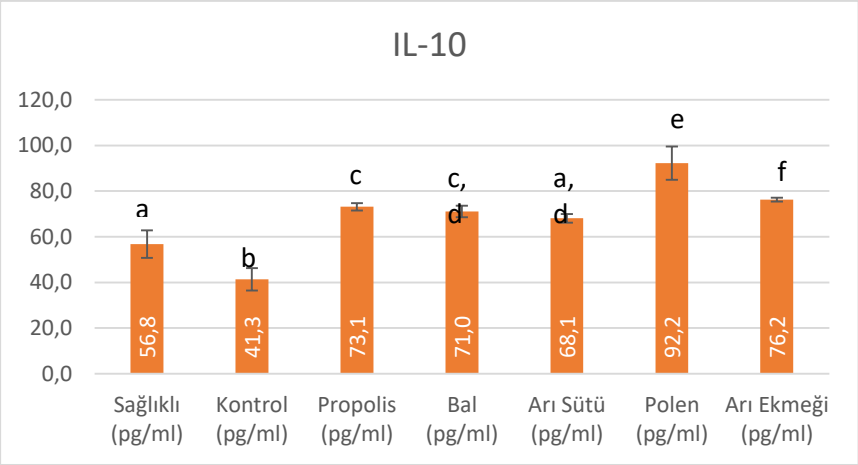
Çalışmamızda kullanılan arı ürünlerinin IL-4 düzeyleri ve birbirleriyle olan istatistiksel post–hoc analizi grafiği Şekil 1'de sunulmuştur.



Şekil 1. Arı ürünlerinin IL-4 düzeyleri ve istatistiksel olarak post-hoc analizine göre karşılaştırılması

(Grafikteki kutucukların üstünde aynı harfler bulunanlar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık yokken ($p>0.05$), farklı harf içeren kutucuklar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık ($p<0.05$) bulunmaktadır)

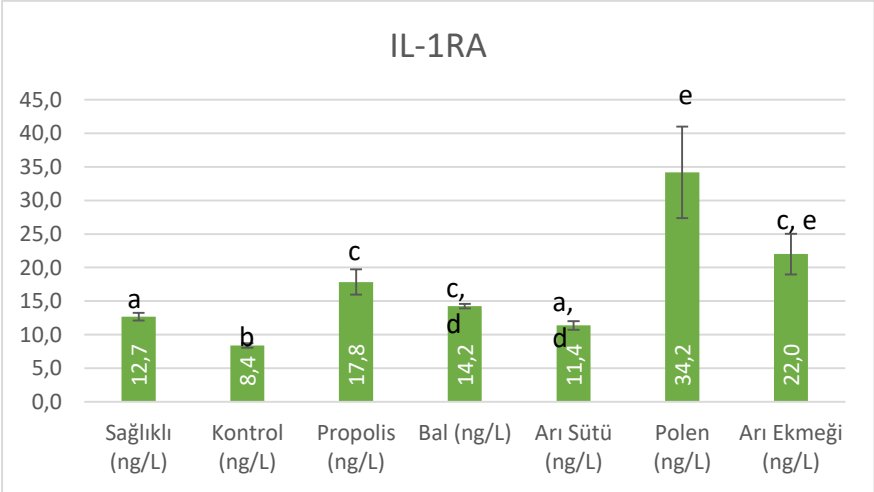
Arı ürünlerinin IL-10 düzeylerinin grafiksel gösterimi ve istatistiksel olarak post–hoc analizine göre karşılaştırılması Şekil 2'de sunulmuştur.



Şekil 2. Arı ürünlerinin IL-10 düzeyleri ve istatistiksel olarak post–hoc analizine göre karşılaştırılması

(Grafikteki kutucukların üstünde aynı harfler bulunanlar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık yokken ($p>0.05$), farklı harf içeren kutucuklar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık ($p<0.05$) bulunmaktadır)

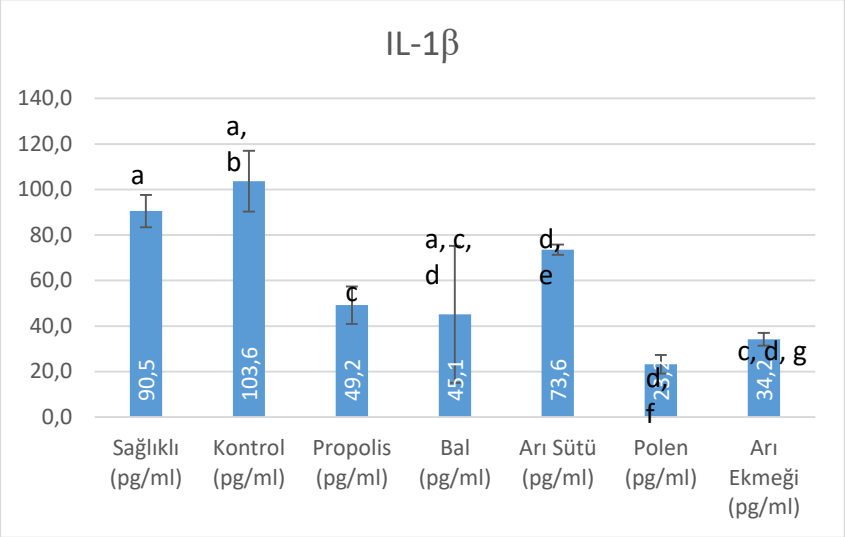
Arı ürünlerinin IL-1RA düzeylerinin grafiksel olarak gösterimi ve istatistiksel olarak post–hoc analizine göre karşılaştırılması Şekil 3'de sunulmuştur.



Şekil 3. Arı ürünlerinin IL-1RA düzeyleri ve istatistiksel olarak post–hoc analizine göre karşılaştırılması

(Grafikteki kutucukların üstünde aynı harfler bulunanlar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık yokken ($p>0.05$), farklı harf içeren kutucuklar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık ($p<0.05$) bulunmaktadır)

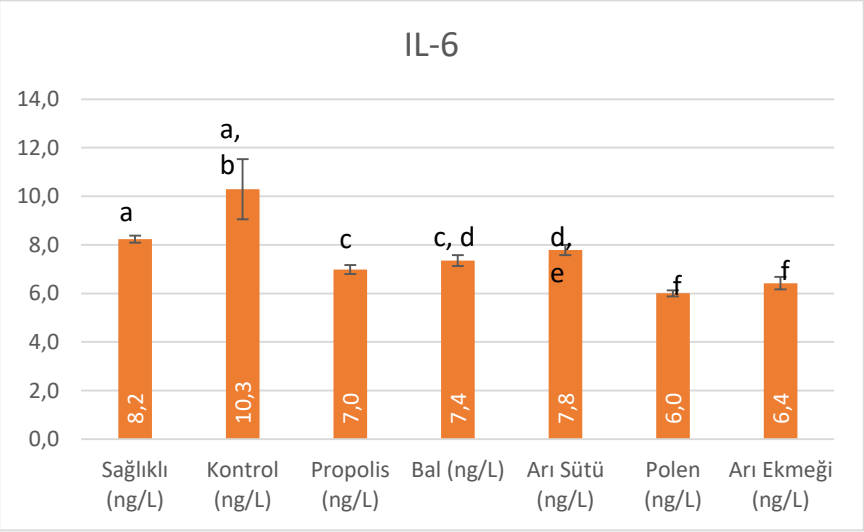
Arı ürünlerinin pro-inflamatuar IL-1β düzeylerinin grafiksel olarak gösterimi ve istatistiksel olarak post–hoc analizine göre karşılaştırılması Şekil 4'de sunulmuştur.



Şekil 4. Arı ürünlerinin IL-1β düzeyleri ve istatistiksel olarak post–hoc analizine göre karşılaştırılması

(Grafikteki kutucukların üstünde aynı harfler bulunanlar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık yokken ($p>0.05$), farklı harf içeren kutucuklar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık ($p<0.05$) bulunmaktadır)

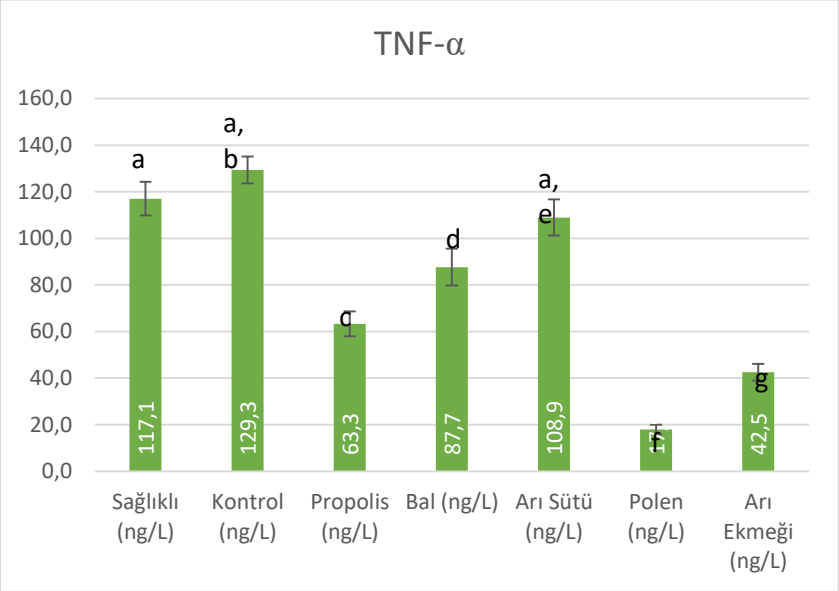
Arı ürünlerinin pro-inflamatuar IL-6 düzeylerinin grafiksel olarak gösterimi ve istatistiksel olarak post–hoc analizine göre karşılaştırılması Şekil 5'de sunulmuştur.



Şekil 5. Arı ürünlerinin IL-6 düzeyleri ve istatistiksel olarak post–hoc analizine göre karşılaştırılması

(Grafikteki kutucukların üstünde aynı harfler bulunanlar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık yokken (p>0.05), farklı harf içeren kutucuklar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık (p<0.05) bulunmaktadır)

Arı ürünlerinin pro-inflamatuar TNF-α düzeylerinin grafiksel olarak gösterimi ve istatistiksel olarak post–hoc analizine göre karşılaştırılması Şekil 6'da sunulmuştur.



Şekil 6. Arı ürünlerinin TNF-α düzeyleri ve istatistiksel olarak post–hoc analizine göre karşılaştırılması

(Grafikteki kutucukların üstünde aynı harfler bulunanlar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık yokken (p>0.05), farklı harf içeren kutucuklar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık (p<0.05) bulunmaktadır.

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Yaptığımız bu çalışmada arı ürünlerinin anti-inflamatuar ve pro-inflamatuar etkinlikleri, "cotton pellet" yöntemi ile deneysel olarak ratlarda oluşturulan kronik inflamasyon modelinde araştırılmıştır. Elde edilen verilere göre, araştırılan arı ürünleri olan bal, propolis, polen, arı ekmeği ve arı sütünün istatistiksel olarak anlamlı anti-inflamatuar etkinliklerinin olduğu saptanmıştır. Benzer şekilde, çalışmamızda kullanılan tüm arı ürünlerinin, pro-inflamatuar sitokin düzeylerini istatistiksel olarak anlamlı düzeyde düşürdükleri saptanmıştır.

Arı ürünlerinin pro-inflamatuar ve anti-inflamatuar etkinlikleri karşılaştırıldığında, anti inflamatuar olan IL-4, IL-10 ve IL-1RA sitokin düzeylerini en fazla yükselten arı ürünleri sırasıyla polen, arı ekmeği ve propolis olarak ilk üç sırada yer aldıkları görülmektedir (tümünde $p<0.001$). Diğer taraftan pro-inflamatuar sitokinlerden IL-6 ve TNF-α düzeylerini en fazla düşüren arı ürünleri sırayla, polen, arı ekmeği ve propolis olarak saptanmışken, IL-1β'yı en fazla düşüren arı ürünleri ise polen, arı ekmeği ve bal olarak bulunmuştur (tümünde $p<0.001$). Elde ettiğimiz bu sonuçlara göre, en etkili anti-inflamatuar arı ürününün polen olduğu, ikinci sırada arı ekmeği ve üçüncü sırada ise propolis'in etkin anti-inflamatuar etkinliklerinin olduğu (tümünde $p<0.001$) saptanmıştır.

Literatürde farklı arı ürünlerinin anti-inflamatuar etkinliklerini araştıran çalışmalar bulunmaktadır. Bal arısının (***Apis mellifera***) ürünlerinden olan "bal, propolis, arı sütü, polen ve arı ekmeği" hakkında tıbbi kullanımlarına yönelik değişik çalışmalar bulunmaktadır. Arı ürünlerinin anti-inflamatuar etkinliklerini araştıran muhtelif çalışmalar da mevcuttur.[1] Bu çalışmalar arasında, Candiracci ve arkadaşlarının 2012 yılında yaptığı bir hücre kültürü çalışmasında, balın içerisindeki flavonoidlerin, inflamasyon sonucu oluşan sinir dejenerasyonunda koruyucu olup olmadığını araştırmıştır. Balın, TNF-α ve IL-1β pro-inflamatuar sitokinlerin düzeylerini istatistiksel olarak düşürdüğünü tespit etmişlerdir.[28]

Almasaudi ve arkadaşları 2017 yılında yaptıkları bir çalışmada, sıçanlarda oluşturdukları gastrik ülser üzerinde manuka balının etkinliğini araştırmışlardır. Bu çalışmada, manuka balının anti-inflamatuar etkinliği tespit edilmiş; TNF-α, IL-1β ve IL-6 sitokin düzeylerinin azaldığı, anti-inflamatuar sitokin olan IL-10 düzeyinde ise artış olduğu saptanmıştır.[25] Bu sonuçlar ile bizim bal ile elde ettiğimiz sonuçların tamamen benzer olduğu görülmektedir.

Cotton-pellet yöntemi ile yapılan bir çalışmada, balın, inflamasyon sonucu oluşan granülom ağırlığını istatistiksel olarak azalttığı tespit edilmiştir.[29] Ancak bu çalışmada, anti-inflamatuar ve pro-inflamatuar sitokin düzeyi ölçülmemiştir. Bizim çalışmamızda cotton pellet'lerin ağırlıkları ölçülmüş, ancak gruplar arası istatistiksel olarak anlamlı farklılık olmadığı saptanmıştır. Cotton pellet'ler her ne kadar etrafındaki granülasyon dokusu ile çıkarılmaya gayret edilse de, çıkarılma esnasında insan faktörü öne çıkmış, kimi doku tam ve büyük, kimisi ise kısmen, küçük olarak çıkarılmışlar ve bu durum dolayısıyla ağırlıklarını da etkilemiştir. Bu sebeple bizim çalışmamızda cotton pellet ağırlıkları arası farklılık saptanamamıştır.

Al-Hariri ve arkadaşlarının, 2019 Eylül ayında yayımladıkları bir çalışmada, sıçanlarda oluşturdukları akut pankreatitte, propolisin pro-inflamatuar sitokin düzeyini azalttığı, anti-inflamatuar IL-22 düzeyini artırdığı yer almaktadır.[30] Bizim çalışmamızda da propolis anti-inflamatuar sitokin düzeylerini artırmış, pro-inflamatuar sitokin düzeylerini ise anlamlı olarak azalttığı saptanmıştır.

Yangı ve arkadaşlarının 2018 yılı çalışmalarında, intraperitoneal lipopolisakkarit enjekte edilen ratlarda serbest oksijen radikal düzeyi üzerine propolisin etkinliğini araştırmışlardır.[31] Bu çalışmada araştırmacılar propolis etkinliğini inflamasyon üzerinde araştırmışlar, sonuç olarak propolisin etkin bir anti-inflamatuar madde olduğunu tespit etmişlerdir. Ancak literatürde, cotton pellet yöntemi kullanılarak cilt altı oluşturulmuş kronik inflamasyon üzerinde propolisin etkinliğini araştıran bir çalışma bulunmamaktadır. Bizim çalışmamızda, literatürde ilk defa, cotton pellet yöntemi ile kronik inflamasyon oluşturulmuş ve propolisin anti-inflamatuvar etkinliği ortaya konulmuştur.

Arı sütü ile ilgili yapılmış çalışmalardan, Chen ve arkadaşlarının yaptıkları bir in-vitro çalışmada, arı sütü yağ asidi içeriklerinden olan üç yağ asit bileşenin anti-inflamatuar etkinliği araştırılmış ve bu üç bileşenin de nitrik oksit, TNF-alfa ve IL-10 sitokin düzeylerini azalttığı bulunmuştur.[19] Bu çalışma, arı sütünün bileşenlerinin anti-inflamatuar etkinliğini göstermesi açısından önemli olmakla birlikte, sadece hücre kültürü ortamında in-vitro olarak yapılmıştır. Yine bu çalışmada, zıt bir sonuç olarak anti-inflamatuar sitokin olan IL-10 düzeyinin azaldığı saptanmıştır. Bizim çalışmamızda ise, arı sütünün anti-inflamatuar sitokinleri (IL-4, IL-10 ve IL-1RA) arttırdığı, pro-inflamatuar sitokinleri (IL-1β, IL-6 ve TNF-α) azalttığı belirlenmiştir.

Arzi ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışma ile formalin ile sıçanın arka ayağında oluşturulan inflamasyonda, arı sütünün 50 ve 100 mg/kg dozlarının istatistiksel olarak tedavide etkin olduğu tespit edilmiştir.[27] Araştırmacılar bu çalışmada inflamasyon derecesi için ödem

alanı ölçümü yapmışlar; ama biyokimyasal veya histolojik bir analiz yapmamışlardır. Bizim çalışmada 100 mg/kg dozunda arı sütü kullanılmış ve etkin bir anti-inflamatuar sitokin cevabı saptanmıştır.

Arı sütü ile ilgili yapılan başka bir çalışmada ise, etilen glikol ile oluşturulan urolitiaz ve buna bağlı renal inflamasyonda, anti-inflamatuar sitokin düzeyinde artış olduğu tespit edilmiştir.[32]

Diğer arı ürünlerinden polen ve arı ekmeğinin anti-inflamatuar etkinliğine yönelik çalışmalar ise sınırlı sayıdadır. Polenin biyolojik ve tedavi amaçlı kullanımını konu alan bir derlemede, anti-inflamatuar etkinliğinin olduğu; ancak genel bir problem olarak her polenin sahip olduğu içeriğin farklı olması sebebiyle farklı sonuçlar doğabileceği belirtilmiştir.[33]

Polen bileşenlerinin, yapılan güncel bir hücre kültürü çalışmasında anti-inflamatuar etkinliğinin olduğu tespit edilmiştir.[34] Diğer bir çalışmada Maruyama ve arkadaşları, sıçan ayağında oluşturdukları ödem hacmini azaltmak için etanol ve su ekstraktlı iki farklı hazırlanmış polen örneğinin anti-inflamasyon rolünün olup olmadığını araştırmışlar, sonuç olarak ise etanol esktratının hafif anti-inflamatuar etkinliğin olduğu; ancak su ekstratlı polenin hiç anti-inflamatuar etkinliğinin olmadığını tespit etmişlerdir.[24] Araştırmacılar sıçanlarda sitokin ölçümü yapmamışlar, sadece nitrik oksit düzeyi ölçümü ile ödem kontrolü ile sonuca varmışlardır. Bizim çalışmamızda, su bazlı olarak hazırlanan polen kullanılmış ve elde ettiğimiz sonuçlara göre en etkili arı ürününün polen olduğu tespit edilmiştir.

Bizim çalışmamızda polen hem anti-inflamatuar sitokinleri en fazla artıran, hem de pro-inflamatuar sitokin düzeylerini en fazla azaltan, en etkin arı ürünü olarak belirlenmiştir.

Arı ekmeğinin anti-inflamatuar etkinliğini inceleyen literatürdeki tek araştırmada, alüminyum sonrası oluşan inflamasyon ve hepatorenal toksisiteye yönelik etkinlik araştırılmış ve antioksidan etkinlik ile alüminyum etkilerini düzelttiğini saptamışlardır.[35]

Bizim yaptığımız bu çalışma, arı ekmeğinin anti-inflamatuar etkinliğini araştıran literatürdeki tek çalışma olarak dikkat çekmektedir. Diğer bir önemli nokta ise, arı ekmeğinin polenden sonra en etkin anti-inflamatuar özellik gösteren arı ürünü olduğunu saptamamızdır. Arı ekmeği, hem pro-inflamatuar, hem de anti-inflamatuar sitokin düzeylerinin tümünde en iyi ikinci arı ürünü olmuştur.

Farklı arı ürünlerinin aynı anda kullanılıp karşılaştırıldığı çalışma sayısı da sınırlıdır. El-Aidy ve arkadaşlarının yaptıkları bir çalışmada, astım modeli ve akciğer inflamasyonu oluşturdukları sıçanlarda propolis, bal ve arı sütünün anti-inflamatuar etkinliğini araştırmışlardır (22). Araştırmacılar, çalışma sonucunda propolisin anti-inflamatuar etkinliği

olduğunu tespit etmişler; ancak bal ve arı sütünün, astım ataklarını artırdığını bulmuşlardır. Bu durum, bal ve arı sütünün immun-stimulan etkinliğine dayandırmışlardır.

Bizim çalışmamızda, literatürde ilk defa olarak, cotton pellet yöntemi ile kronik inflamasyon oluşturulmuş sıçanlarda beş farklı arı ürününün anti-inflamatuar etkinlikleri araştırılmış ve polen, arı ekmeği, propolis, bal ve arı sütünün istatistiksel olarak anlamlı etkinlikleri olduğu saptanmıştır (tümünde $p<0.001$).

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Yapılan bu çalışmada arı ürünlerinin anti-inflamatuvar etkinlikleri araştırılarak karşılaştırılmıştır. Literatürde bazı arı ürünlerinin anti-inflamatuvar etkinliklerini araştıran çalışmalar bulunmaktadır. Ancak bu çalışmalar genellikle tek bir arı ürününün etkinliğini araştıran çalışmalar olduğu dikkat çekmektedir. Bu bağlamda, yaptığımız literatür taramasına göre, ilk kez arı ürünlerinin anti-inflamatuvar etkinliklerinin karşılaştırılması, yaptığımız bu çalışma ile ortaya konulmuştur.

Elde ettiğimiz verilere göre, tüm arı ürünlerinin anlamlı anti-inflamatuvar etkinleri bulunmuştur. Anti-inflamatuvar etkinliği en yüksek arı ürününün polen olduğu, daha sonra ise sırayla arı ekmeği ve propolisin ikinci ve üçüncü sırada yer aldıkları belirlenmiştir.

Yaptığımız bu çalışma ile arı ürünlerinin anti-inflamatuvar etkinliklerinin hayvan deneyi ile tespit edilmesi ile tıbbi kullanımına yönelik insan deneylerinin yapılmasının yolu açılmış olmaktadır. Arı ürünlerinin bilinen alerjik reaksiyon dışında önemli yan etkilerinin olmaması ve maliyet etkin olmaları nedeniyle, bilimsel kanıta dayalı olarak anti-inflamatuvar olarak kullanımının ülkemiz açısından önemli bir kazanım olacağını düşünmekteyiz. Arı ürünleri üretiminde dünyada sayılı ülkeler arasında yer alan ülkemizde, arı ürünlerinin sağlık sektöründe ilaç ve ürün olarak üretilmesi ile dışa bağımlılığı azaltacak, ucuz, kolay ve ulaşılabilir tedavi alternatiflerinin ülkemize kazandırılması sağlanabilecektir.

KAYNAKLAR

1. Cornara L, Biagi M, Xiao J, Burlando BJFip. Therapeutic properties of bioactive compounds from different honeybee products. 2017;8:412.
2. Mcmanus LM, Mitchell R. Pathobiology of human disease: a dynamic encyclopedia of disease mechanisms. Elsevier; 2014.
3. King T. Inflammation, Inflammatory Mediators, and Immune-Mediated Disease-ScienceDirect. In: Elsevier's Integrated Pathology; 2007.
4. Saçu D. Deneysel olarak fibrosarkoma oluşturulan ratların serumlarında interlökin-6 ve tümör nekrosis faktör alfa düzeylerinin belirlenmesi, Adnan Menderes Üniversitesi; 2008.
5. YALÇIN SY, SÖYLEMEZOĞLU TTD. IL-6 polimorfizminin doku metal düzeylerine etkisi, Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Disiplinlerarası Adli Tıp ….
6. Bidwell J, Keen L, Gallagher G, et al. Cytokine gene polymorphism in human disease: on-line databases. 1999;1(1):3-19.
7. Salgame P, Abrams JS, Clayberger C, et al. Differing lymphokine profiles of functional subsets of human CD4 and CD8 T cell clones. 1991;254(5029):279-282.
8. Özgönen Ö. Malign ve tüberküloz plörezi ayırıcı tanısında T helper 1 ve T helper 2 sitokinlerden IFN-y, IL-12, IL-18 ve IL-10'un tanısal değeri, SDÜ Tıp Fakültesi; 2006.
9. Dinarello CAJEjoi. Historical insights into cytokines. 2007;37(S1):S34-S45.
10. ÖZMEN N, ALKIN EJUAD. Balın antimikrobiyel özellikleri ve insan sağlığı üzerine etkileri. 2006;6(4):155-160.
11. Silici SJUAD. Arı poleni ve arı ekmeği. 2014;14(2):99-105.
12. Çelik K, Aşgun HJAP. Apiterapi El Kitabı. 2014.
13. Karaman M, Artık N, Küçükersan K. Perga (bee bread) composition and health benefit. Paper presented at: The 2nd International Turkic World Conference on Chemical Sciences and Technologies, Skopje, Macedonia on October2016.
14. Loglio G, Formato G, Pietropaoli M, Jannoni-Sebastianini R, Carreck N, van der Steen JJBW. An innovative home-made beebread collector as a tool for sampling and harvesting. 2019;96(1):16-18.
15. Gilliam M, Prest D, Lorenz BJA. Microbiology of pollen and bee bread: taxonomy and enzymology of molds. 1989;20(1):53-68.

16. Sforcin JMJPr. Biological properties and therapeutic applications of propolis. 2016;30(6):894-905.
17. Azize A, Gümüş TJAG. Propolisin gıda endüstrisinde kullanım olanakları. 2017;15(1):60-65.
18. Steele R. Understanding and measuring the shelf-life of food. Woodhead Publishing; 2004.
19. AKYOL E, BARAN YJUBJ. ARI SÜTÜNÜN YAPISI, İNSANLAR VE ARILAR İÇİN ÖNEMİ. 2015;15(1).
20. Meltem UJGÜSBD. Arı Sütünün Büyüme, Yaşlanma ve Üreme Sağlığına Etkisi. 2018;7(1):193-202.
21. Nagai T, Inoue RJFc. Preparation and the functional properties of water extract and alkaline extract of royal jelly. 2004;84(2):181-186.
22. Winter CA, Porter CCJJotAPA. Effect of alterations in side chain upon anti-inflammatory and liver glycogen activities of hydrocortisone esters. 1957;46(9):515-519.
23. El-Aidy WK, Ebeid AA, Sallam AE-RM, et al. Evaluation of propolis, honey, and royal jelly in amelioration of peripheral blood leukocytes and lung inflammation in mouse conalbumin-induced asthma model. 2015;22(6):780-788.
24. Maruyama H, Sakamoto T, Araki Y, Hara HJBC, Medicine A. Anti-inflammatory effect of bee pollen ethanol extract from Cistus sp. of Spanish on carrageenan-induced rat hind paw edema. 2010;10(1):1-11.
25. Almasaudi SB, Abbas AT, Al-Hindi RR, et al. Manuka honey exerts antioxidant and anti-inflammatory activities that promote healing of acetic acid-induced gastric ulcer in rats. 2017;2017.
26. Chen Y-F, Wang K, Zhang Y-Z, Zheng Y-F, Hu F-LJMoi. In vitro anti-inflammatory effects of three fatty acids from royal jelly. 2016;2016.
27. Arzi A, Olapour S, Yaghooti H, Karampour NSJJjonpp. Effect of royal jelly on formalin induced-inflammation in rat hind paw. 2015;10(1).
28. Candiracci M, Piatti E, Dominguez-Barragán M, et al. Anti-inflammatory activity of a honey flavonoid extract on lipopolysaccharide-activated N13 microglial cells. 2012;60(50):12304-12311.
29. Owoyele BV, Adenekan OT, Soladoye AOJZxyjhxbJoCim. Effects of honey on inflammation and nitric oxide production in Wistar rats. 2011;9(4):447-452.

30. Al-Hariri MT, Eldin TG, Hashim T, Chathoth S, Alswied AJSQUMJ. Propolis modulates inflammatory mediators and improves histopathology in male rats with L-arginine-induced acute pancreatitis. 2019;19(2):e103.
31. Yangi B, Cengiz Ustuner M, Dincer M, et al. Propolis protects endotoxin induced acute lung and liver inflammation through attenuating inflammatory responses and oxidative stress. 2018;21(11):1096-1105.
32. Aslan Z, Aksoy LJIbju. Anti-inflammatory effects of royal jelly on ethylene glycol induced renal inflammation in rats. 2015;41:1008-1013.
33. Denisow B, Denisow-Pietrzyk MJJotSoF, Agriculture. Biological and therapeutic properties of bee pollen: a review. 2016;96(13):4303-4309.
34. Li Q, Sun M, Wan Z, et al. Bee pollen extracts modulate serum metabolism in lipopolysaccharide-induced acute lung injury mice with anti-inflammatory effects. 2019;67(28):7855-7868.
35. Bakour M, Al-Waili NS, El Menyiy N, et al. Antioxidant activity and protective effect of bee bread (honey and pollen) in aluminum-induced anemia, elevation of inflammatory makers and hepato-renal toxicity. 2017;54(13):4205-4212.