

Bingöl'den Toplanan Arı Polenlerinde Malondialdehid Düzeylerinin İki Farklı Yöntemle Belirlenmesi

Naci Ömer ALAYUNT^{1*}, Yusuf KARAGÖZOĞLU², Mehmet Ali KUTLU³

¹Fırat Üniversitesi, Fen Fakültesi, Kimya Bölümü, Elazığ

²Bingöl Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Kimya Bölümü, Bingöl

³Bingöl Üniversitesi, Teknik Bilimler Meslek Yüksek Okulu, Arıcılık Programı, Bingöl

Özet

Polenin lipid peroksidasyonunu engellediği, pek çok serbest oksijen radikallerinin neden olduğu oksidan hasarı önlediği yapılan araştırmalarda belirtilmiştir. Bu çalışmada Bingöl ili merkeze bağlı Gökdere köyü (1565 rakım), Adaklı ilçe merkezi (1500 rakım), Adaklı'ya bağlı Şirnan köyü (1810 rakım), Karlıova ilçe merkezi (1940 rakım) ve Karlıova merkez Kanireş civarı (1940-2000 rakım) olmak üzere Bingöl'ün beş farklı yerinden toplanan arı polenlerindeki MDA düzeylerini HPLC ve TBA yöntemiyle belirlemek ve bu konuda literatür bilgisine katkıda bulunmak amaçlanmıştır. HPLC metoduyla polende MDA düzeyleri Haziran ve Şubat ayı açısından gruplar arası kıyaslandığında, Karlıova ve Kanireş dışında diğer bölgelerde anlamlı olarak istatistiksel farkın ($p>0,05$) olmadığı görüldü. TBA metoduyla polende MDA düzeyleri Haziran ve Şubat ayı açısından gruplar arası kıyaslandığındaysa, Şirnan dışında diğer bölgelerde anlamlı olarak istatistiksel farkın ($p>0,05$) olmadığı görüldü. Sonuç olarak takriben 8 ay kadar serin ve karanlık ortamda kalan polen ekstraktlarının önemli miktarda antioksidan aktivite kaybına uğradığı, bu çevresel şartların da serbest radikal koruyucu aktivite düzeylerini azaltıp lipid peroksidasyon düzeylerini arttırdığı düşünülmektedir.

Anahtar kelimeler: Arı poleni, Malondialdehid, Bingöl, Farklı yöntem

Determination The Levels of Malondialdehyde In Gathered Bee Pollens From Bingol By Different Methods

Abstract

They have been reported that pollen inhibites lipid peroxidation and prevent oxidant damages related to free oxygen radicals. The aim of this study is to evaluate the levels of the MDA in the bee's pollens gathered from five different locations of Bingol; Gökdere Village bounded to the city center (altitude 1565), Adaklı town center (1500), Şirnan village bounded to Adaklı (altitude 1810), Karlıova town center (altitude 1940), the vicinity of Kanireş in the center of Karlıova (altitude 1940-2000) by HPLC and TBA methods and, this investigation will have an important effect on improvement of the knowledge of that area. When the levels of MDA in pollen of June and February were compared with each other by HPLC method, it was found that, there hadn't been the statistically significant difference except for groups of Karlıova and Kanireş, and the levels of MDA in pollen by TBA method, it was found that, there hadn't been the statistically significant difference except for groups of Şirnan. As a result, it can be think that pollen extracts stored by being kept in a cool and dark place about for eight months, may losses of antioxidant activity as these environmental conditions increase the levels of lipid peroxidation by decrease the levels of free radical scavenging activity of these pollens.

Keywords: Bee pollen, Malondialdehyde, Bingol, Different method

*Sorumlu yazar: nacialayunt@hotmail.com

1. Giriş

Polenler çiçekli bitkilerin erkek organlarında meydana gelen üreme üniteleri olduğundan [1], bitki dokularında bulunan major ve minor elementlerin tamamına yakınına ihtiva ederler, proteinler, karbonhidratlar ve lipitler bakımından oldukça zengindirler [2, 3]. Bunlara ilave olarak aminoasit, nükleik asit, enzim, hormon ve vitamin gibi organik maddeleri de yapılarında bulundurlar [1,4-7]. Polenin enfeksiyon hastalıkları, mide kanaması gibi birçok hastalığın tedavisinde kullanıldığı [8] ve yüksek rakıma bağlı kusma sendromunun önlenmesinde tıbben kullanıldığı belirtilmektedir [9].

Almaraz - Abarca vd. yaptıkları çalışmada Meksika florasına ait etanolik polen ekstraktlarının lipidperoksidasyonu inhibe edici ve polen ekstraktlarının HPLC analizinde bir flavanoid türevi olan kalkonlarca zengin olduğunu göstermiştir [10]. Polenin *in vitro* olarak lipid peroksidasyonunu engellediği, oksidan özelliğe sahip ve kanserojen olduğu bilinen pek çok serbest oksijen radikalini temizlediği [11, 12], yapılan araştırmalarda belirtilmiştir. Polen ekstraktlarının yapısında bulunan fenolik asitler ve flavonoidler, potansiyel antioksidan olarak, superoksit anyonları ve lipid peroksit radikallerini temizledikleri ve serbest radikaller ile ilişkili olaylarda hidrojenasyon veya kompleks yapılar oluşturarak okside edici ajanları stabilize edebildikleri gösterilmiştir [11]. Polen, kanser ve çeşitli hastalıkların oluşumunda rol alan oksidan yapıları yok ederek, antioksidan enzimlerin aktivitelerini stimüle ederek, intrasellüler oksidatif stresi azaltarak, nitrik oksit ve peroksit radikalleri de direkt olarak temizleyerek etkili olabilmektedirler [13, 14, 15].

Malondialdehit (MDA), biyolojik sistemde lipitlerin oksidasyonu sonucunda oluşmaktadır. Radikaller hücre membranına zarar vererek oksidatif stres oluştururlar. Radikallerin hücrede oluşturduğu lipit oksidasyonu sonucunda da hücrede MDA oluşmaktadır [16]. Peroksidasyonla oluşan MDA, membran komponentlerinin çapraz bağlanma ve polimerizasyonuna sebep olur. Bu da deformasyon, iyon transportu, enzim aktivitesi ve hücre yüzey bileşenlerinin agregasyonu gibi intrinsik membran özelliklerini değiştirir. Bu etkiler, MDA'nın niçin mutajenik, genotoksik ve karsinojenik olduğunu açıklar. Lipid peroksidasyonu ile meydana gelen membran hasarı geri dönüşümsüzdür. Hem insanlardaki ve hem de doğadaki lipid peroksidasyonunu kontrol etmek ve azaltmak için antioksidanlar kullanılmaktadır [17].

Arı polenlerinin lipid peroksidasyonunun göstergesi olan malondialdehid (MDA) düzeyleriyle ilgili literatürde yapılmış çok az çalışma mevcuttur. Bu nedenle bu çalışmada Bingöl ili merkeze bağlı Gökdere köyü (1565 rakım), Adaklı ilçe merkezi (1500 rakım), Adaklı'ya bağlı Şirnan köyü (1810 rakım), Karlıova ilçe merkezi (1940 rakım) ve Karlıova merkez Kanireş civarı (1940-2000 rakım) olmak üzere Bingöl'ün beş farklı yerinden toplanan arı polenlerindeki MDA düzeylerini HPLC ve TBA yöntemiyle belirlemek ve bu konuda literatür bilgisine katkıda bulunmak amaçlanmıştır.

2. Materyal ve Metod

2.1. Polen Örneklerinin Alınışı: Bu çalışmada polen örnekleri Bingöl'ün Gökdere, Adaklı, Şirnan, Kanireş, Karlıova mevkilerinden toplandı. Her bir bölgeden 3 polen örneği olmak üzere toplam 15 farklı örnekle çalışıldı. Arı kovanlarından steril cam kavanozlara alınan polenler laboratuvara getirilerek ekstraksiyon yapılana kadar serin ve kuru bir yerde (1-2 °C, % 25 nisbi rutubet) muhafaza edildi [18]. İki farklı mevsimde polen örneklerinin MDA düzeyleri araştırıldı; önce 2011 haziran ayında toplanan polenler analize tabi tutuldu. Daha sonra bu polenler oda koşullarında serin ve kapalı oda bir yerde muhafaza edilip tekrar 2012 şubat ayında analiz edildi.

2.1. Polen Ekstraktının Hazırlanması: Polenden 20 g tartılmış ve 200 ml % 95'lik etil alkol ilave edilerek oda sıcaklığında 3 gün süreyle bekletildi [13]. Örneğin ara ara elle çalkalanarak homojen hale gelmesi sağlandı. Etanolik ekstrakt Whatman # 1 numaralı filtre kağıdı ile süzülde, altta kalan sıvı kısım döner buharlaştıncıda kuruyuncaya kadar buharlaştırdıldı [19].

2.1.1. HPLC Metoduyla Malondialdehid (MDA) Analizi: Polen ekstraktından 1gr alınıp üzerine 0.5 ml 0.5 M HClO₄ ilave edilip bu karışım vortekslendikten sonra üzerine 4.5 ml saf su eklendi. Karışım 4500 devir 5 dakika santrifüjlendikten sonra örneklerin üzerindeki berrak kısımdan dikkatlice 20µl alınarak MDA Karatepe'ye [20] göre HPLC 'de analiz edildi. Analizler hareketli faz olarak 30 mM

KH_2PO_4 - metanol (% 82.5 – 17.5; pH: 4) karışımında 250 nm'de İnertsil 5µ C-18 (15 cm x 4.6 mm) kolonu kullanılarak akış hızı 1 ml/dk yapıldı.

2.1.2. TBA Methoduyla Malondialdehid (MDA) Analizi: Polen ekstraktından alınan 0.5gr numune, 2.5 ml %10'luk TCA (Triklorik Asit) ile deney tüpünde karıştırılarak 95 °C'de 15 dk. kaynatıldı. Daha sonra hemen soğutulmuş 4 °C'de 5000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi. Oluşan süpernatandan 1 ml alındı ve üzerine % 67'lik TBA'dan (Tiyobarbitürik Asit) 0.5 ml eklenerek 15 dakika kaynatılıp hemen soğutuldu. Pembe renkli kromojen çözeltisi soğutmaya takiben en geç 45 dakika içerisinde UV spektrofotometresinde, 532 nm dalga boyunda distile suya karşı absorpsiyon değeri okunarak, elde edilen değerler dilüsyon katsayısı ile çarpıldı ve nanomol / ml biriminde MDA miktarı Drapper ve Hadley [21] tarafından modifiye edilen metoda göre belirlendi.

2.1.3. İstatistiksel Analiz: İncelenen parametrelerin istatistik farklılıkları SPSS 15.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) istatistik programıyla ortalama ve standart sapma kullanılarak bulunmuştur. Farklı grupların ortalamalarının karşılaştırılmasında Mann Whitney-U testi kullanılmıştır. Sonuçlar ortalama \pm standart sapma olarak gösterildi ve $p < 0.05$ anlamlılık düzeyi olarak kabul edilmiştir.

3. Bulgular ve Tartışma

Bingöl'den toplanan arı polenlerinin iki farklı yöntemle belirlenmiş MDA düzeyleri Tablo I ve Tablo II'de sunulmuştur. Tablo I'de HPLC metoduyla belirlenmiş polende MDA düzeyleri grup içi kıyaslandığında, hem haziran hem de şubat aylarında istatistiksel olarak anlamlı artışta ($p > 0,05$) Şirnan bölgesinin ilk sırada, Adaklı bölgesinin ikinci sırada olduğu görülürken, en anlamlı azalışın Gökdere bölgesinde olduğu görüldü. Haziran ve şubat ayı açısından gruplar arası kıyaslandığında, Karlıova ve Kanireş dışında diğer bölgelerde anlamlı istatistiksel farkın ($p > 0,05$) olmadığı belirlendi. Tablo II'de TBA metoduyla belirlenmiş polende MDA düzeyleri haziran ayı açısından grup içi kontrole göre kıyaslandığında, istatistiksel olarak ($p > 0,05$) sadece Gökdere bölgesinin MDA düzeyinin kontrole göre anlamlı olarak arttığı, diğerlerininse kontrole göre anlamlı olarak azaldığı görülürken; şubat ayında Kanireş ve Karlıova bölgesinin yer değiştirerek istatistiksel olarak ($p > 0,05$) anlamlı artışta Kanireş bölgesinin 1.sırada, Karlıova bölgesinin 2.sırada olduğu görüldü. Haziran ve şubat ayı açısından gruplar arası kıyaslandığında, Şirnan bölgesi dışında diğer bölgelerde anlamlı istatistiksel farkın ($p > 0,05$) olmadığı belirlendi.

Tablo.1. HPLC Metoduyla Polendeki MDA (nmol / ml) Düzeyleri

Polenler (n=3)	Haziran Ayı	Şubat Ayı
Gökdere	0,602 \pm 0,020 ^e	0,839 \pm 0,072 ^e
Adaklı	1,309 \pm 0,173 ^b	1,618 \pm 0,234 ^b
Şirnan	1,589 \pm 0,209 ^{ab}	1,820 \pm 0,386 ^{ab}
Karlıova	1,130 \pm 0,102 ^{bd}	1,415 \pm 0,127 ^{abd}
Kanireş	2,000 \pm 0,150 ^c	2,209 \pm 0,153 ^{abc}

Tablo.2. TBA Metoduyla Polenlerdeki MDA (nmol / ml) Düzeyleri

Polenler (n=3)	Haziran Ayı	Şubat Ayı
Kontrol	2,515±0,010	2,522±0,009
Gökdere	2,544±0,026 ^a	2,654±0,025 ^a
Adaklı	2,258±0,0241 ^c	2,314±0,200 ^d
Şirnan	2,476±0,043 ^a	2,696±0,041 ^a
Karlıova	2,189±0,023 ^{cd}	2,353±0,0209 ^{cd}
Kanireş	2,325±0,046 ^a	2,651±0,112 ^a

a-e: Aynı satırda farklı harfi taşıyan gruplar arası fark anlamlıdır. (P<0,05)

İstatistiksel farklılık Mann Whitney -U testi ile belirlenmiştir

4. Sonuç ve Öneriler

Oksijen molekülü lipidlere karşı yüksek afiniteye sahiptir. Bu molekül hemoglobinden ayrıldıktan sonra plazmadaki lipoproteinler ile eritrosit zarındaki lipidlere çözünmekte ve daha sonra dokularda kullanılmaktadır. Bu sırada dokularda bulunan doymamış yağ asitlerindeki çift bağlara oksijen bağlanması sonucu lipid peroksidasyonu kimyasal reaksiyonu meydana gelmektedir. Lipid peroksidasyonunun zar yapısı ve bütünlüğünün bozulması, oluşan serbest radikallerin çeşitli hücre bileşenleri üzerine zararlı etkileri ve son ürünlerin sitotoksik etkileri gibi farklı yollarla hücre hasarına neden oldukları düşünülmektedir [22]. Antioksidanlar, peroksidasyon zincir reaksiyonlarını baskılayarak veya serbest radikalleri toplayarak lipid peroksidasyonunu ve hücre zararını engellerler[23].

Haščik ve arkadaşları yaptıkları bir araştırmada, I. gruba 400 mg ve II. gruba 800 mg olmak üzere iki ayrı dozda polenle besledikleri tavukların göğüs ve uyluk kaslarındaki MDA düzeylerini tespit etmişlerdir. Bu araştırmada kontrol, I. ve II. grubun göğüs kası MDA düzeylerinin sırasıyla ilk gün 0.065- 0.061- 0.075 mg / kg iken 6 ay sonra 0.137- 0.111- 0.099 mg / kg olarak ölçüldüğünü, uyluk kası MDA düzeyleri ise ilk gün 0.105 – 0.083 – 0.114 mg / kg iken 6 ay sonra 0.137 – 0.111 – 0.120 mg / kg olarak ölçüldüğünü bildirmişlerdir[24]. Bir başka çalışmadaysa Eraslan ve arkadaşları, kontrol grubu ile 1 ml saf ve 1ml mısırözü yağında çözdükleri polenleri ratlara verdiklerinde kontrole göre uygulama grubunun plazmada ve karaciğer, böbrek, beyin ve kalp dokularındaki MDA düzeylerinin azaldığını bildirmişlerdir [25]. Başak ve Candan sıçan karaciğer homojenatında *Lallemantiacanescens*'in metanol özütü ile kallus doku kültürü metanol özütünün MDA düzeylerine baktıkları bir çalışmada, *Lallemantiacanescens*'in ve kallus doku kültürünün metanol özütleri ile pozitif kontrollerin lipid peroksidasyonunu %50 inhibe eden derişimleri sırasıyla 682 – 1200 µg / mL olarak bulmuşlardır[26].

Sonuç olarak takriben 8 ay kadar serin ve karanlık ortamda kalan polen ekstraktlarının önemli miktarda antioksidan aktivite kaybına uğradığı, bu çevre şartlarınsa[27], serbest radikal koruyucu aktiviteyi azaltıp lipid peroksidasyon düzeyini arttırdığı düşünülmektedir. Çünkü serbest radikal koruyucu aktivitesi oda şartlarında kurutulmuş polende azalır ve polen 1 yıl saklandıktan sonra % 50 oranında antioksidan aktivitesini kaybedebilir [28]. MDA düzeylerindeki artışın polenlerin toplandıkları bitkiden bitkiye, iklim şartlarına, havadaki nispi nem miktarına, tuzaklandıkları kovanın bulunduğu yere, toprağa yakınlığına, mevsimine, toplanan polenlerin saklandıkları yere göre farklılık göstermesinden kaynaklanabileceği söylenebilir.

5. Kaynaklar

1. Krell, R. 1996. Value-added products from beekeeping. FAO Agricultural Services Bulletin, 124: 409p, Rome.
2. Orzáez Villanueva, M. T., Díaz Marquina, A., Bravo Serrano, R., Blazquez Abellán, G. 2002. The importance of bee-collected pollen in the diet: a study of its composition. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 53(3): 217-224.
3. Standifer, L. N. 2003. Honeybee nutrition supplemental feeding. [http:// maarec. cas. psu. edu/ bkCD/ HBBiology/ nutrition-supplements. htm](http://maarec.cas.psu.edu/bkCD/HBBiology/nutrition-supplements.htm).
4. Stanley, R. G., Linskens, H. F. 1985. Pollen Biologie, Biochemie Gewinnungund. Verwendung. Urs Freund Verlag Greifenberg-Ammersee. 344s.
5. Karataş, F., Munzuroğlu, Ö., Gür, N. 2000. Arı polenlerindeki A, E ve C vitaminleri ile selenyum düzeylerinin araştırılması. *F.Ü. Fen ve Müh. Bilimleri Dergisi*, 12(1): 219-224.
6. McNally, J.B., McCaughey, W. F., Standifer, L. N., Todd, F. E. 1965. Partition of excreted nitrogen from honeybees fed various proteins. *J Nutr*, 85: 113-116.
7. Karataş, F., Şerbetçi, Z. 2008. Arı polenlerindeki adrenalin ve noradrenalin miktarlarının HPLC ile belirlenmesi. *F.Ü. Fen ve Müh. Bilimleri Dergisi*, 20 (3): 419-422.
8. Williams, M. H. 1994. The use of nutrition ergogenic aids in sports: Is it an ethical issue?, *International Journal of Sport Nutrition*, 4: 120- 131.
9. Linskens, H. F., Jorde, W. 1997. Pollen as food and medicine – A review. *Economic Botany*, 51(1): 78-86.
10. Almaraz-Abarca, N., Campos, M.G., Ávila-Reyes, J.A., Naranjo-Jiménez, N., Corral, J.H. 2007. Antioxidant Activity of Polyphenolic Extract of Monofloral Honeybee-collected Pollen from mesquite (*Prosopis juliflora*, *Leguminosae*), *J. Food Compos Anal.*, 20: 119-124.
11. Silva, T.M.S., Camara, C.A., Silva Lins A.C., Barbosa-Filho, J.M. 2006. Chemical composition and free radical scavenging activity of pollen loads from stingless bee *Meliponinae* subtribe *Ducke*, *J Food Compos Anal*, 19: 507-511.
12. Šarić, A. Balog, T., Soboc̃anec, S., Kušić, B., Šverko, V., Rusak, G., Likic, S. 2009. Antioxidant effects of flavonoid from Croatian *Cystus incanus* L. rich bee pollen. *Food Chem Toxicol.*, 47: 547-554.
13. Moreira, L., Dias, L.G., Pereira, J.A. ve Estevinho, L. 2008. Antioxidant properties, total phenols and pollen analysis of propolis samples from Portugal, *Food Chem Toxicol.*, 46: 3482-3485.
14. Eraslan, G., Kanbur, M. ve Silici, S. 2008. Effect of carbaryl on some biochemical changes in rats: The ameliorative effect of bee pollen, *Food Chem Toxicol.*, 47: 86 - 91.
15. Jo Bright Simon J., Hiscock, Philip E. ve James, John T. 2009. Hancock Pollen generates nitric oxide and nitrite: a possible link to pollen-induced allergic responses, *Plant Physiol Biochem.*, 47: 1, 49.
16. Surapaneni, K.M., Venkataramana, G. 2007. Status of lipid peroxidation, glutathione, ascorbic acid, vitamin E and antioxidant enzymes in patients with osteoarthritis, *Indian J. Med. Sci.*, 61: 9-14.
17. Dawn, B.M., Allan, D.M., Colleen, M.S., Lippincott Williams & Wilkins. 1996. Basic Medical Biochemistry a Clinical Approach. Baltimore, Maryland.
18. Kutlu, M.A. 2010. Organik Bal Üreticisinin El Kitabı, Genç ilçesi - Bingöl, 77-78s.
19. Morais, M., Moreira, L., Feas, X., Estevinho, L.M. 2011. Honeybee-collected pollen from five Portuguese Natural Parks: Palynological origin, phenolic content, antioxidant properties and antimicrobial activity, *Food and Chemical Toxicology* 49: 1096-1101
20. Karatas F, Karatepe M, Baysar A. 2002. Determination of free malondialdehyde in human serum by high performance liquid chromatography. *Anal Biochem.*, 311: 76-79.
21. Draper HH, Hadley MA., Squires EJ, Mahmoodi H, Wu J, Agarwal S. 1993. Comparative evaluation of thiobarbituric acid methods for the determination of malondialdehyde in biological materials. *Free Radic Biol Med.*, 15: 353-63.
22. Tamer, L., Polat, G., Eskandari, G., Ercan, B., Atik, U. 2000. Serbest Radikaller, Mersin Üniv. Tıp Fak. Dergisi, 1: 52-58.
23. Dündar, Y., Aslan, R. 2000. Hekimlikte Oksidatif Stres ve Antioksidanlar, A.K.Ü. Yayın no: 29. Uyum Ajans Ankara, 1. Basım.
24. Haščík, P., Bobko, M., Kačániová, M., Pochop, J., et al. 2011. Oxidative Stability of Chicken Meat After Pollen Extract Application In Their Diet, *Journal of Microbiology Biotechnology and Food Sciences*, 1: 70 – 82.
25. Eraslan, G., Kanbur, M., Silici, S., Liman, B.C., Altınordulu, S., Sarıca, Z.S. 2009. Evaluation of protective effect of bee pollen against propoxur toxicity in rat, *Ecotoxicology and Environmental Safety* 72: 931-937
26. Başak, S.Ş., Candan, F. 2008. İtü Fen Bilimleri Dergisi, Cilt:6, Sayı:1: 14-26.
27. Arora, A., Sairam, R.K. and Srivastava, G.C. 2002. Oxidative stress and antioxidative systems in plants, *Curr. Sci.*, 82: 1227-1238.
28. Campos, M.G., Webby, R.F., Markham, K.R. 2003. Age-Induced Diminution of free radical scavenging capacity in bee pollen and the contribution of consistent flavonoids. *J Agr Food Chem.*, (3): 742-745.