

**T.C.
EGE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**BİTKİSEL GIDA DESTEK ÜRÜNLERİNİN
ENDOKRİN BOZUCU ETKİ POTANSİYELLERİNİN
IN VITRO OLARAK BELİRLENMESİ**

Farmasötik Toksikoloji Anabilim Dalı Programı

Yüksek Lisans Tezi

Biyomühendis Yasemin TOKER

**DANIŞMAN
Doç. Dr. Hande GÜRER ORHAN**

**İZMİR
2011**

DEĞERLENDİRME KURULU ÜYELERİ

(Adı Soyadı)

(İmza)

Başkan : Doç. Dr. Hande GÜRER ORHAN
(Danışman) Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Toksikoloji ABD

Üye : Prof. Dr. Ferzan Lermioğlu
Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Toksikoloji ABD

Üye : Prof. Dr. Erdal BEDİR
Mühendislik Fakültesi Biyomühendislik Bölümü

Yüksek Lisans Tezinin kabul edildiği tarih: 06.10.2011

ÖNSÖZ

Yüksek lisans eğitimim boyunca bana yol gösteren, tez konumun seçilmesinde ve çalışmalarımın her aşamasında beni destekleyen danışman hocam sayın Doç. Dr. Hande Gürer Orhan'a en içten dileklerimle teşekkür ederim. Yüksek lisans eğitimime katkıda bulunan Prof. Dr. Ferzan Lermioğlu ve Prof. Dr. Hilmi Orhan'a teşekkür ederim.

Çalışmalarımda yardımını esirgemeyen mühendislik fakültesi Biyomühendislik bölümünde yer alan, aktif madde izolasyon çalışmalarımızda her zaman yanımda olan Prof. Dr. Erdal Bedir'e çok teşekkür ederim.

Çalışmalarımızda laboratuvarlarındaki Victor³ - Çokluplaka Okuyucu'yu kullanımımıza açtığı için Prof. Dr. Zeliha Kerry'e, His-E-Coli-ER-LBB hücrelerini gönderdiği için Marc Ruffa, ER-LBB saflaştırma ve izolasyonunda laboratuvar imkanlarını kullanmamıza olanak verdikleri için Vrije üniversitesinden Prof. Dr. Nico Vermeulen ve Dr. Jelle Reinen'e de teşekkür ederim.

Çalışma arkadaşım Biyomühendis Duysal Uslu'ya teşekkür ederim. Ayrıca hayatım boyunca her zaman desteklerini arkamda hissettiğim, bugünlere gelebilmemin sebebi olan başta annem, babama ve biricik ablama çok teşekkür ederim.

Bu tez çalışması 108S202 nolu Tübitak projesi ve 11/ECZ/007 nolu E.Ü. Bilimsel Araştırma projesi ile desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER

DEĞERLENDİRME KURULU ÜYELERİ.....	II
ÖNSÖZ.....	III
İÇİNDEKİLER.....	IV
TABLolar DİZİNİ	VI
ŞEKİLLER DİZİNİ	VII
KISALTMALAR.....	IX
BÖLÜM I	1
I. GİRİŞ VE AMAÇ	1
I.1. GENEL BİLGİLER.....	3
I.1.1. ENDOKRİN SİSTEM	3
I.1.1.1. Hormonların Kimyasal Yapıları ve Etki Mekanizmaları	4
I.1.1.2. Hormon Aktivitesinin Düzenlenmesi	5
I.1.2. ENDOKRİN BOZUCULAR	9
I.1.2.1. Endokrin Bozucuların Sınıflandırılması.....	10
I.1.2.2. Endokrin Bozucuların Etki Mekanizmaları.....	12
I.1.2.2.1. Hormon Reseptörleri ile Direkt Etkileşim.....	12
I.1.2.2.2. Endokrin Sistem ile Dolaylı Etkileşim	13
I.1.3. FİTOÖSTROJENLER	14
I.1.3.1. Fitoöstrojenlerin Kimyasal Yapıları ve Sınıflandırılması	15
I.1.3.2. Fitoöstrojenlerin absorpsiyon, dağılım, metabolizma ve atılımları	19
I.1.3.3. Fitoöstrojenlerin Sağlık Üzerine Etkileri	20
I.1.3.3.1. Üreme Sistemi ve Gelişim üzerine Etkileri	20
I.1.3.3.2. Fitoöstrojenler ve Osteoporoz	21
I.1.3.3.3. Fitoöstrojenler ve Menopoz.....	22
I.1.3.3.4. Fitoöstrojenler ve Kardiyovasküler Sistem	23
I.1.3.3.5. Fitoöstrojenler ve Kanser	23
I.1.4. ENDOKRİN BOZUCULARIN SAPTANMASINDA KULLANILAN	25
İN VİTRO ve İN VİVO TARAMA TESTLERİ	25
I.1.4.1. İn Vitro Testler.....	27
I.1.4.2. İn Vivo Testler	37
I.1.4.2.1. Üterotrofik Testler.....	37
I.1.4.2.2. Hershberger Testi	38
I.1.6. KULLANILAN BİTKİSEL DİYET DESTEK ÜRÜNLERİ.....	39
I.1.6.1. <i>Astragalus</i> Root Extract	40
I.1.6.2. Black Cohosh Root Extract (<i>Actaea racemosa</i>).....	44
I.1.6.3. Dong Quai (<i>Angelica sinensis</i>).....	48
I.1.6.4. Grape Seed Extract (<i>Vitis vinifera</i>)	52
I.1.6.5. Green Tea Leaf Extract (<i>Camellia sinensis</i>)	55
I.1.6.6. Gotu Kola (<i>Centella asiatica</i>)	58
I.1.6.7. Isoflavones	60
I.1.6.8. Saw Palmetto Berries (<i>Serenoa repens</i>).....	61
I.1.6.9. <i>Spirulina</i>	63
I.1.6.10. St. John's Wort (<i>Hypericum perforatum</i>).....	64
I.1.6.11. <i>Tribulus terrestris</i>	68
I.1.6.12. Valerian Root Extract (<i>Valeriana officinalis</i>)	70
BÖLÜM II.....	73
II.1 GEREÇ VE YÖNTEM	73
II.1.1. GEREÇ	73
II.1.1.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler	73
II.1.1.2. Kullanılan Gereçler.....	74
II.1.1.3. Kullanılan Bitkisel Diyet Destek Ürünleri.....	75
II.1.1.4. Kullanılan Çözeltiler.....	75
II.1.1.4.1. Bitkisel Diyet Destek Ürünlerinin Ekstraksiyonunda Kullanılan Çözeltiler	75
II.1.1.4.2. Ters Faz Kromatografisi ile Fraksiyonlamada Kullanılan Çözeltiler.....	75
II.1.1.4.3. Reseptör Bağlanma Deneyinde Kullanılan Çözeltiler.....	76

II.1.1.4.4. Fitoöstrojen Analizinde Kullanılan Çözeltiler	77
II.1.2. YÖNTEMLER	77
II.1.2.1. Bitkisel Diyet Destek Ürünlerinin Ekstraksiyonu.....	77
II.1.2.2. Asit Hidrolizi ve Normal Ekstraksiyon Örneklerinin Ters Faz Kromatografisi İle Fraksiyonlanması	78
II.1.2.3. Floresans Ligand - ER α -LBB Bağlanma Yöntemi	79
II.1.2.3.1. Yöntemin Esası	79
II.1.2.3.2. Floresans Ligand - ER α -LBB Bağlanma Yöntemi ile Örneklerin Bağlanma Afinitelerinin Değerlendirilmesi.....	80
II.1.2.4. Fitoöstrojenlerin HPLC ile Analizi.....	81
II.1.2.5. İstatistiksel Değerlendirme	82
BÖLÜM III	83
III. BULGULAR.....	83
III.1 Yöntemlerin Laboratuvar Koşullarına Uyarlanması İle İlgili Bulgular	83
III.1.1. Floresans Ligand - ER α -LBB Bağlanma Yöntemi.....	83
III.1.1.1. Gün İçi ve Günler Arası Tekrarlanabilirlik	83
III.1.1.2. Standart Maddeler İle Yöntem Performansının Gösterilmesi.....	84
III.1.2. İzoflavon Standartlarının Analizi ve Kalibrasyon Doğrularının Çizimi.....	85
III.1.2.1. Gün içi ve Günler arası Tekrarlanabilirlik.....	87
III.2. DENEYSEL BULGULAR	88
III.2.1. ER α -LBB Bağlanma Afinitelerinin Belirlenmesi	88
III.2.1.1 AH Ekstrelerinin %40 MeOH fraksiyonlarının ER α -LBB'ne bağlanma potansiyeli (1.5 mg/ml)	89
III.2.1.2. N Ekstrelerinin %40 MeOH fraksiyonlarının ER α -LBB'ne bağlanma potansiyeli (1.5 mg/ml)	90
III.2.1.3. AH Ekstrelerinin %100 MeOH fraksiyonlarının ER α -LBB'ne bağlanma potansiyeli (1 mg/ml)	91
III.2.1.4. N Ekstrelerinin %100 MeOH fraksiyonlarının ER α -LBB'ne bağlanma potansiyeli (1 mg/ml)	92
III.2.2. Seçilen Örneklerin Bağlanma Eğrileri ve IC ₅₀ değerleri	93
III.2.3. Örneklerin İzoflavon Analizi	95
III.2.3.1. AH Ekstrelerinin %40 MeOH Fraksiyonlarının İzoflavon Analizi	95
III.2.3.2. N Ekstrelerinin %40 MeOH Fraksiyonlarının İzoflavon Analizi	96
III.2.3.3. AH Ekstrelerinin %100 MeOH Fraksiyonlarının İzoflavon Analizi	97
III.2.3.4. N Ekstrelerinin %100 MeOH Fraksiyonlarının İzoflavon Analizi	99
III.2.4. St. John's Wort (SJW) ile İleri Çalışmalar	101
III.2.4.1. Etkin Madde İzolasyon ve Saflaştırması	101
III.2.4.2. SJW'ün Bilinen Bileşikleri ile İleri Çalışmalar	105
III.2.4.2.1. Hiperisin ve Amentoflavon'un ER α -LBB'ye bağlanma potansiyelleri .	105
III.2.4.2.2. Hiperisin ve Amentoflavon'un HPLC Analizleri	105
III.2.4.3. Farklı Üretim Numaralı SJW Ürünlerinin İzoflavon İçerik Analizi	107
BÖLÜM IV	109
IV. TARTIŞMA VE SONUÇ	109
KAYNAKLAR.....	118
ÖZET.....	143
ABSTRACT	144
ÖZGEÇMİŞ.....	145

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo I.1. Endokrin bezler, hormonlar ve başlıca fonksiyonları	7
Tablo I.2. US-EPA EDSTAC tarafından önerilen endokrin toksisite testleri	26
Tablo I.3. Östrojenik etkinin değerlendirilmesinde kullanılan in vitro testler	36
Tablo II.1. HPLC analizinde gradyan elüsyon mobil faz bileşenlerinin oranları	82
Tablo III.1. Pozitif ve negatif kontrollerin gün içi ve günler arası tekrarlanabilirlik değerleri ve Z' faktörü.	83
Tablo III.2. Fitoöstrojen standartlarının alıkonma zamanları	87
Tablo III.3 Genistein'in gün içi ve günler arası tekrarlanabilirlik değerleri	87

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil I.1. Vücutta hormon üreten başlıca endokrin bezler	3
Şekil I.2. Negatif geri bildirim mekanizmasının şematik gösterimi	5
Şekil I.3. Endokrin bozucuların maruziyet kaynaklarına göre sınıflandırılması	10
Şekil I.4. Kimyasal yapı ve özellikleri bakımından endokrin bozucuların sınıflandırılması	11
Şekil I.5. Östradiol ve genisteinin molekül yapıları	15
Şekil I.6. Fitoöstrojenlerin sınıflandırılması	15
Şekil I.7. Flavonoidlerin genel yapısı	16
Şekil I.8. İzoflavonların genel yapısı	17
Şekil I.9. Kumestrol'ün genel yapısı	17
Şekil I.10. Resveratrol'ün genel yapısı	18
Şekil I.11. Enterolakton 'un genel yapısı	19
Şekil I.12. ER aracılıklı testlerin dayandığı moleküler mekanizmalar	27
Şekil I.13. İnsan östrojen reseptörleri ER- α ve ER- β 'nın şematik gösterimi	28
Şekil I.14. Östrojen reseptörlerinin vücutta dağılımı	29
Şekil I.15. Radyoligand bağlanma deneylerinde toplam bağlanma ve spesifik olmayan bağlanmanın saptanmasının şematik gösterimi	32
Şekil I.16. Amerikan pazarında yer alan farklı şekil ve kalitedeki <i>Astragalus</i> kökleri	40
Şekil I.17. <i>Astragalus</i> bitkisinin çiçekleri	40
Şekil I.18. Black cohosh bitkisi	44
Şekil I.19. <i>Angelica sinensis</i> kökleri	48
Şekil I.20. Saw palmetto bitkisinin yaprakları	61
Şekil I.21. Saw palmetto bitkisinin meyveleri	62
Şekil II.1. Bağlanma tamponu, kumestrol, kumestrol- ER α -LBB kompleksinin 355nm eksitasyonda emisyon spektrumu	79
Şekil III.1. Östradiol, etinilestradiol, genistein ve daidzein için ER α -LBB'ye bağlanma verileri ve IC ₅₀ değerleri	84
Şekil III.2. Fitoöstrojen standartlarının kalibrasyon doğruları	86
Şekil III.3. Fitoöstrojen standartlarının 0.1mg/ml konsantrasyondaki karışımlarının HPLC kromatogramı ve alıkonma zamanları	87
Şekil III.4. Asidik hidroliz (AH) ekstrelerine ait %40 metanol fraksiyonlarının 1.5 mg/ml konsantrasyonda ER α -LBB'ye bağlanma potansiyelleri	89
Şekil III.5. Asidik hidroliz (AH) ekstrelerine ait %40 metanol fraksiyonlarının 1.5 mg/ml konsantrasyonda RBA değerleri	89
Şekil III.6. N ekstrelerine ait %40 metanol fraksiyonlarının 1.5 mg/ml konsantrasyonda ER α -LBB'ye bağlanma potansiyelleri	90
Şekil III.7. N ekstrelerine ait %40 metanol fraksiyonlarının 1.5 mg/ml konsantrasyonda RBA değerleri	90
Şekil III.8. AH ekstrelerine ait %100 metanol fraksiyonlarının 1 mg/ml konsantrasyonda ER α -LBB'ye bağlanma potansiyelleri	91
Şekil III.9. AH ekstrelerine ait %100 metanol fraksiyonlarının 1 mg/ml konsantrasyonda RBA değerleri	91
Şekil III.10. N ekstrelerine ait %100 metanol fraksiyonlarının 1 mg/ml konsantrasyonda	92

ER α -LBB'ye bağlanma potansiyelleri	
Şekil III.11. N ekstrelerine ait %100 metanol fraksiyonlarının 1 mg/ml konsantrasyonda RBA değerleri	92
Şekil III.12. Green Tea Leaf Extract AH ve N ekstrelerine ait %100 MeOH fraksiyonlarının bağlanma eğrileri	93
Şekil III.13. Saw Palmetto Berries AH ve N ekstrelerine ait %100 MeOH fraksiyonlarının bağlanma eğrileri	94
Şekil III.14. St. John's Wort AH ve N ekstrelerine ait %100 MeOH fraksiyonlarının bağlanma eğrileri	94
Şekil III.15. AH ekstrelerinin %40 MeOH fraksiyonlarının HPLC kromatogramları	95
Şekil III.16. N ekstrelerinin %40 MeOH fraksiyonlarının HPLC kromatogramları	96
Şekil III.17. AH ekstrelerinin %100 MeOH fraksiyonlarının HPLC kromatogramları	97
Şekil III.17'in devamı . AH ekstrelerinin %100 MeOH fraksiyonlarının HPLC kromatogramları	98
Şekil III.18. N ekstrelerinin %100 MeOH fraksiyonlarının HPLC kromatogramları	99
Şekil III.18'in devamı. N ekstrelerinin %100 MeOH fraksiyonlarının HPLC kromatogramları	100
Şekil III.19. Etilasetat fraksiyonunun preparatif RP-İTK uygulaması sonucunda elde edilen bantlar (254nm)	102
Şekil III.20. Bant 1, 2, 3' ün 1.5 mg/ml konsantrasyonlarında ER α -LBB'ye bağlanma potansiyelleri.**; p < 0.0001	102
Şekil III.21. Standart, bant 1, bant 2 ve bant 3'ün silika İTK'sı	102
Şekil III.22. Aktif fraksiyonun ¹ H NMR spektrumu (400 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆).	103
Şekil III.23. NMR ve LC/ESI-TOFMS analizi sonrasında saptanan 3',8"-biapigenin'in kimyasal yapısı	104
Şekil III.24. Saf aktif fraksiyonun HPLC analizine ait kromatogram	104
Şekil III.25. Hiperisin ve Amentoflavon'un ER α -LBB'ye bağlanma potansiyelleri	105
Şekil III.26. A: Hiperisin ve B: Amentoflavon'un HPLC analizi sonucunda elde edilen kromatogramlar	106
Şekil III.27. SJW-No:1 ve SJW-No:2 %40MeOH fraksiyonlarının HPLC analizi sonucunda elde edilen kromatogramları	107
Şekil III.28. SJW-No:1 ve SJW-No:2 %100 MeOH fraksiyonlarının HPLC analizi sonucunda elde edilen kromatogramları	108

KISALTMALAR

EB	Endokrin bozucu
ER	Östrojen reseptörü
US EPA	ABD Çevre Koruma Ajansı
EDSTAC	Endokrin Bozucu Tarama ve Test Danışma Kurulu
OECD	Ekonomik İşbirliği ve Kalkınma Örgütü
E2	Östradiol
EE	Etinilöstradiol
ERE	Östrojen duyarlı eleman
ERα-LBB	Östrojen reseptörü ligand bağlanma bölgesi
C	Kumestrol
AH	Asit hidrolizi
N	Normal ekstraksiyon
COT	İngiltere toksisite komitesi
ARE	Astragalus Root Extract
BC	Black Cohosh Root Extract
DQ	Dong Quai
GSE	Grape Seed Extract
GTLE	Green Tea Leaf Extract
GK	Gotu Kola
Iso	Isoflavones
SPB	Saw Palmetto Berries
SP	Spirulina
SJW	St. John's Wort
TT	Tribulus Terrestris
VRE	Valerian Root Extract
CRH	Kortikotropin salgılatıcı hormon
ACTH	Adrenokortikotropik hormon
GnRH	Gonadotropin salgılatıcı hormon
LH	Lüteinize edici hormon
FSH	Folikül stimüle edici hormon
TSH	Tiroid stimüle edici hormon
GHRH	Büyüme hormonu salgılatıcı hormon
GH	Büyüme hormonu
T₄	Tiroidin
T₃	Triiyodotironin
PTH	Paratiroid hormon
COT	İngiltere toksisite komitesi
HPLC	Yüksek basınçlı sıvı kromatografi
R_t	Alınma zamanı
LDL	Düşük dansiteli lipoprotein
SERM	Seçici östrojen reseptörü düzenleyicileri
KVH	Kardiyovasküler hastalıklar
NMR	Nükleer manyetik rezonans
İTK	İnce tabaka kromatografi
LC/ESI-TOFMS	Sıvı kromatografisi / Kütle spektrometresi

BÖLÜM I

I. GİRİŞ VE AMAÇ

Endokrin sistem ve sinir sistemi vücudun iki ana iletişim sistemidir. Sinir sisteminde sinir hücresi boyunca elektriksel impulslar iletilirken, endokrin sistemde kimyasal ajanlar ya da hormonlar ile bir dokudan diğerine sinyaller iletilmektedir. Endokrin sistem hormonların sekresyonunu sağlayan salgı bezlerinden oluşmaktadır. Ana endokrin bezler hipofiz, hipotalamus, pankreas, tiroid bezi, adrenal bezler, overler ve testistir. Endokrin sistem doğumdan önce cinsel farklılaşma, ergenlik, yetişkinlik, üreme dönemindeki cinsel olgunlaşma, büyüme, metabolizma, sindirim, kardiyovasküler fonksiyonlar ve boşaltım gibi organizmanın hemen hemen tüm önemli fonksiyonları ile ilişkilidir. Bu nedenle, endokrin bozukluklar potansiyel olarak vücutta yaygın etkiler üretebilmektedirler.

Endokrin bozukluk, çevresel kimyasalların endokrin sistem fonksiyonlarına müdahalesi anlamına gelmektedir. Son yıllarda yapılan birçok bilimsel çalışmada çevresel kimyasalların endokrin bozukluklara yol açtığı gösterilmiştir. İstenmeyen etki hangi salgı bezi ya da ilişkili yollar üzerinde gerçekleşiyorsa endokrin bozukluk da o yönde olmaktadır; tiroid fonksiyon bozukluğu ya da östrojenik/androjenik etki gibi. Endokrin sistem bileşenlerinden herhangi birinde gözlenen olumsuz bir etki ‘endokrin bozukluk’, buna neden olan madde ‘endokrin bozucu’ (EB) olarak isimlendirilmekteyken, bugün EB kavramının en çok anti/östrojenik ya da anti/androjenik etkileri ifade etmek için kullanıldığını görmekteyiz.

Endüstriyel kimyasallar [poliklorlubifeniller (PCBler), polibromlubifeniller (PBBler), dioksin, alkilfenol vb.], bitki koruma kimyasalları (herbisitler, fungisitler, insektisiler), farmasötikler (dietilstilbestrol, tamoksifen vb.), fitoöstrojenler gibi

sentetik ve doğal birçok bileşik östrojenik aktivite göstermektedir. Bu bileşikler etkilerini gerek östrojen reseptörü ile etkileşerek, gerekse östrojen reseptöründen bağımsız mekanizmalar ile gerçekleştirmektedirler.

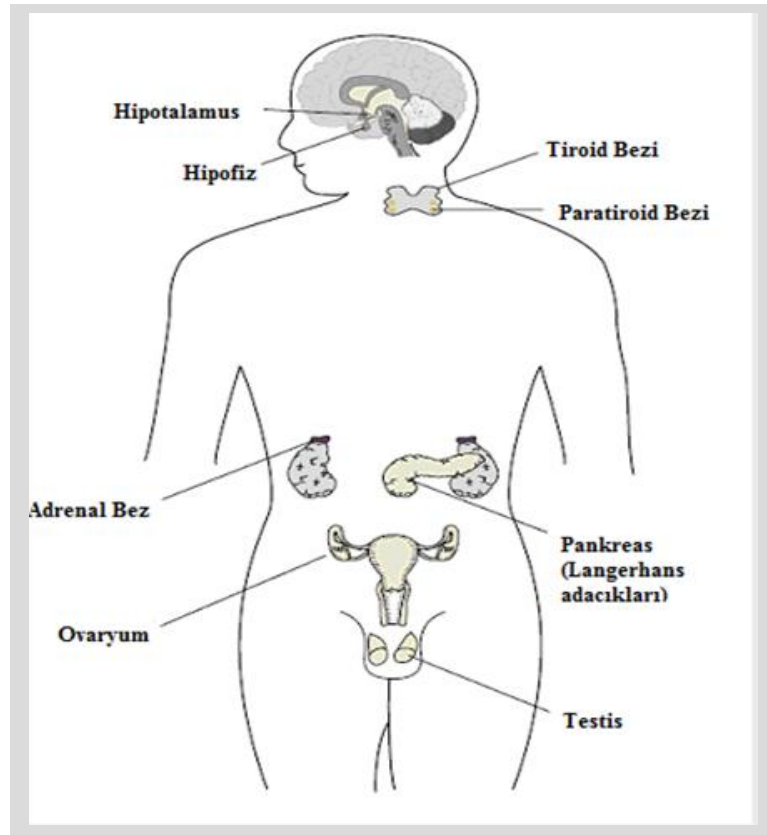
EBlar arasında yer alan fitoöstrojenler, bitkilerde bulunan östrojenik etkili doğal bileşiklerdir. Bildirilen yararlı etkileri nedeniyle son yıllarda fitoöstrojenlerin batıda kullanımı dramatik olarak artmıştır. Birçok çalışmada diyetle fitoöstrojen alımının yararlı etkileri gösterilmesine rağmen, potansiyel EB etkileri üzerinde çok durulmamıştır.

Bu tez kapsamında ülkemiz piyasasında yer alan bazı bitkisel gıda destek ürünlerinin potansiyel EB etkinliği araştırılmıştır. EB etkinin belirlenmesi amacıyla ürünlerin östrojen reseptörüne (ER) bağlanma aktiviteleri belirlenmiştir. Yöntem olarak *in vitro* “floresans ligand - reseptör bağlanma yöntemi” kullanılmıştır. Bu yöntem test bileşiklerinin östrojenik ya da antiöstrojenik etkileri olduğu yönünde bilgi vermemekle birlikte, ER’ye olan afinitelerinin belirlenmesini sağlayıp EB potansiyelleri hakkında fikir vermektedir. Hızlı ve kolay uygulanabilir olması nedeniyle yüksek hızlı taramaya da uygundur. Tez çalışmasında bir diğer amacımız EB potansiyeli olduğunu gördüğümüz diyet destek ürünlerinin olası izoflavon içeriğinin saptanmasıdır. Bu amaçla; bağlanma afinitesi yüksek bulunan ürünlerin bilinen fitoöstrojenler olan izoflavon içerikleri, yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (HPLC) – UV dedektör sistemi ile araştırılmıştır. EB etkiden sorumlu etken maddenin bilinen standartlar dışında olması durumunda yapısının aydınlatılması da amaçlanmıştır.

I.1. GENEL BİLGİLER

I.1.1. ENDOKRİN SİSTEM

Hormonlar hipotalamus, hipofiz bezi, adrenal bezler, gonadlar (testisler ve yumurtalıklar), tiroid bezi, paratiroid bezi ve pankreas da dahil olmak üzere endokrin bezler tarafından salgılanan moleküllerdir (**Şekil I.1**). "Endokrin" terimi, belirli uyarılara yanıt olarak, bu bezlerden salgılanan hormonların doğrudan kan dolaşımına salınmasını ifade etmektedir (1). Salgılanan hormonlar kan yoluyla hedef hücrelere taşınır. Bazı hormonlar sadece birkaç belirli hedef hücre ile, bazı hormonlar ise vücutta çok sayıda hücre tipi ile etkileşimde bulunabilmektedir. Her hormon için hedef hücreler, hücre yüzeyinde veya hücre içinde bulunan reseptörler ile karakterizedir. Hormon ve reseptör arasındaki etkileşim, hedef hücre fonksiyonu ya da aktivitesini değiştirebilen biyokimyasal reaksiyonlar zincirini tetikler (1).



Şekil I.1: Vücutta hormon üreten başlıca endokrin bezler

I.1.1.1. Hormonların Kimyasal Yapıları ve Etki Mekanizmaları

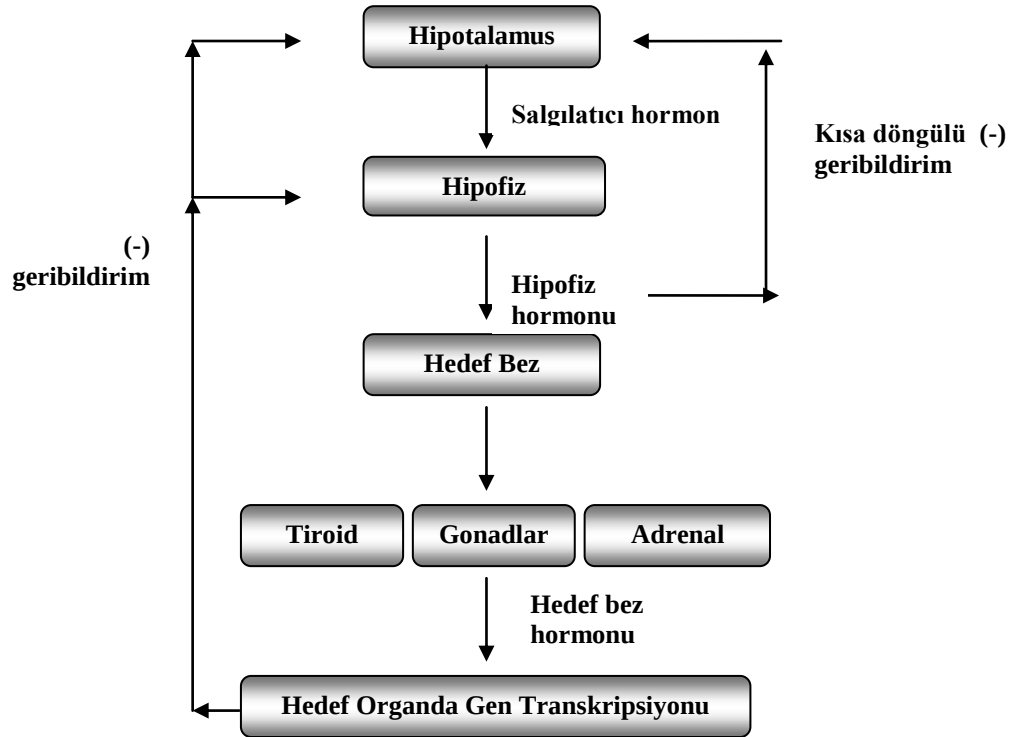
Hormonlar, steroidler, amino asit türevleri, polipeptidler ve proteinler olmak üzere çeşitli kimyasal yapılarda bulunmaktadır. Farklı kimyasal yapılardaki moleküllerin etki mekanizması (hedef hücreye girebilme veya hücre aktivitesini modüle etme gibi) da farklıdır. Gonadlar ve adrenal korteks tarafından üretilen steroidler, moleküler yapı olarak kolesterole benzemektedirler. Steroid yapıdaki hormonlar hedef hücrelerin içine girerek sitoplazma veya nükleus içindeki reseptörler ile etkileşirler. Hormon-reseptör kompleksi hücrenin genetik materyali olan DNA'nın spesifik bölgesine bağlanır ve spesifik hormon duyarlı genlerin regülasyonunu sağlar.

Amino asit türevi hormonlar bazı yapısal proteinlerin değişikliğe uğramış halleridir. Tiroid bezi ve adrenal medulla tarafından üretilmektedirler. Steroidler gibi amino asit türevleri de hücre içine girebilmekte ve spesifik DNA bölgeleri ile ilişkili reseptörler ile etkileşimde bulunarak etkiye neden olmaktadır.

Polipeptid ve protein yapıdaki hormonlar çeşitli uzunluklardaki aminoasit zincirleridir. Bu hormonlar çoğunlukla hipotalamus, hipofiz ve pankreasta bulunurlar. Bazı durumlarda daha aktif hormonlara dönüşebilen inaktif prekürsörlerden veya pro-hormonlardan türetilirler. Kimyasal yapılarından dolayı polipeptid ve protein yapıdaki hormonlar hücre içine giremezler. Hücre yüzeyinde yer alan reseptörler ile etkileşimde bulunurlar. Etkileşim sonunda hücre membranında veya hücre içinde biyokimyasal değişiklikler başlamakta ve nihai olarak hücre aktivitesi ve fonksiyonlarında değişiklikler meydana gelmektedir (1).

I.1.1.2. Hormon Aktivitesinin Düzenlenmesi

Vücut homeostazını sağlamak ve çevre değişikliklerine uygun bir şekilde yanıt vermek için, hormon üretim ve salgılanması sıkı bir şekilde kontrol edilmelidir. Bu kontrolü sağlamak için, birçok vücut fonksiyonu tek bir hormon tarafından değil, birbirleri ile etkileşim içinde olan çeşitli hormonlar tarafından düzenlenir (**Tablo I.1**). Örneğin birçok hormon sisteminde hipotalamus ‘salgılatıcı hormon’ adı verilen hormonları salgılar. Bu hormonlar kan dolaşımı yoluyla hipofiz bezine taşınır. Hipofiz bezine gelen salgılatıcı hormonlar, hipofiz bezinin hormon üretim ve salgılamasını indükler. Salgılanan hormonlar adrenal bez, gonadlar ve tiroid gibi hedef bezlere kan dolaşımı ile taşınır. Hedef bezlerde hipofiz hormonlarının hedef hücreler ile etkileşimi hedef organları etkileyen hormonların salınmasına neden olur. Hipotalamus ve hipofiz bezi hedef bezlerden gelen geri bildirimler ile hormon sisteminin aktivitesinin uygun sınırlar içinde kalması ve böylece vücudun iç dengesinin korunması sağlanır (**Şekil I.2**) (1, 2).



Şekil I.2. Negatif geri bildirim mekanizmasının şematik gösterimi
(* 1 ve 2’den modifiye edilmiştir.)

Kanda hormonlar belirli bir seviyeye ulaştığında hipotalamus ve/veya hipofiz hormonu salınımı durdurulur ve böylece kaskad sona erer. Bazı durumlarda, hipofiz hormonları direkt hipotalamus üzerine etki ederek kısa-döngülü negatif geri bildirim meydana getirir (**şekil 1.2**). Bu negatif geri bildirim sistemlerinin hassasiyeti farklı fizyolojik durumlar veya yaşam evrelerinde değişebilmektedir. Örneğin hipotalamus ve hipofiz duyarlılığının azalması ile gonadal steroid hormonların negatif geri bildirimi cinsel olgunlaşmada önemli rol oynamaktadır. Negatif geri bildirim daha yaygın olmakla birlikte, bazı hormon sistemleri, pozitif geri bildirim mekanizmaları tarafından kontrol edilir. Böyle bir mekanizma kadınların menstural dönemi sırasında meydana gelmektedir (1).

Genellikle sinyal kaskadlarının nihai hormonları steroid kökenli iken, peptid hormonlar ara habercidirler. Peptid hormonlar ara haberciler olarak hızla sentezlenme ve yıkılma gibi avantajlara sahiptirler. Peptid hormonlar hücre içine girmeye gerek olmaksızın, hücre yüzeyindeki reseptörlere bağlanarak hızlı bir fizyolojik yanıt oluştururlar. Steroid hormonlar ve diğer peptid yapıda olmayan hormonlar tipik olarak daha stabil, dolaşımda kararlı/değişmez ve fizyolojik olarak yeterli düzeyde bulunurlar. Prekürsör moleküller veya apolar konjugatlar şeklinde depolanırlar. Reseptör ile etkileşime girmek ve bir yanıt ortaya çıkarmak için hücreye girmeleri gerekir. Peptid yapıda olmayan hormonlar sürekli var olma/bulunma avantajına sahip olsalar da hızlı modülasyon avantajlarından yoksundurlar (1, 2).

Tablo I.1: Endokrin bezler, hormonlar ve başlıca fonksiyonları (1)

Endokrin Bez	Hormon	Fonksiyonları
Hipotalamus	Kortikotropin salgılatıcı hormon (CRH)	Hipofizden adrenokortikotropik hormon (ACTH) salınımı stimülasyonu
	Gonadotropin salgılatıcı hormon (GnRH)	Hipofizden lüteinize edici hormon (LH) ve folikül stimüle edici hormon (FSH) salınımı stimülasyonu
	Tirotropin salgılatıcı hormon	Hipofizden tiroid stimüle edici hormon (TSH) salınımı stimülasyonu
	Büyüme hormonu salgılatıcı hormon (GHRH)	Hipofizden büyüme hormonu (GH) salınımı stimülasyonu
	Somatostatin	Hipofizden GH salınımı inhibisyonu
	Dopamin	Hipofizden prolaktin salınımı inhibisyonu
Anteriör Hipofiz	ACTH	Adrenal Korteksten hormon salınımı stimülasyonu
	LH	Kadınlarda yumurtalıklarda ovülasyon boyunca östrojen üretimi; erkeklerde testislerde testosteron üretimi
	FSH	Tiroid hormon salınımı stimülasyonu
	GH	Büyüme ve gelişme
	Prolaktin	Süt üretimi kontrolü
Posteriyör Hipofiz *	Vazopresin	Vücudun su ve elektrolit düzeyinin kontrolü
	Oksitosin	Üterus kontraksiyonlarını destekleme ve emziren annelerde süt ejeksiyonu sağlama
Adrenal Korteks	Kortizol	Karbonhidrat, protein ve lipid metabolizmasına yardım etme ve strese karşı koruma
Testisler	Testosteron	Erkek üreme organlarının gelişiminin stimülasyonu, sperm üretimi ve protein metabolizması
Overler	Östrojen	Kadın üreme organları gelişiminin stimülasyonu
	Progesteron	Uterusu gebeliğe, meme bezlerini laktasyona hazırlama
Tiroid bezi	Tiroid hormonu (ör: tiroksin [T ₄] ve triiyodotironin [T ₃])	Tüm hücrelerde metabolik süreçleri kontrol etme
	Kalsitonin	Kalsiyum metabolizmasının kontrolü (kanda kalsiyum düzeyini düşürme)
Paratiroid bezi	Paratiroid hormon (PTH)	Kalsiyum metabolizmasının kontrolü (kanda kalsiyum düzeyini yükseltme)
Pankreas	İnsülin	Karbonhidrat metabolizmasının kontrolü (kanda şeker düzeyini düşürme)
	Glukagon	Karbonhidrat metabolizmasının kontrolü (kanda şeker düzeyini yükseltme)

* Bu hormonlar hipotalamusta üretilirler fakat posteriyör hipofiz bezinde depolanır ve salınırlar.

Endokrin bozucuların potansiyel etkisinin oluşmasında kritik noktalar bulunmaktadır. Bunlar:

- Yaşamın farklı dönemlerinde aynı düzeyde endokrin bozucu bileşenlere maruz kalınması farklı fizyolojik etkilerin oluşmasına neden olabilir.
- Endokrin sistemin programlanması sırasında maruziyet kalıcı fonksiyon değişikliklerine ve stimulator/inhibitor sinyallere duyarlılıkta değişikliğe neden olabilir.
- Yetişkinlik döneminde maruziyet normal homeostatik mekanizmalar ile dengelenebilir; dolayısıyla belirgin ve ölçülebilir bir etki oluşumu söz konusu olmayabilir.
- Farklı endokrin sistemler arasında meydana gelebilecek etkileşimler, olası beklenen etkiler dışında beklenmeyen bir etkiye de neden olabilir. Dolayısıyla in vitro elde edilen hormonal aktivite sonuçlarının in vivo modellere ekstrapolasyonu sırasında çok dikkatli olunmalıdır (3).

I.1.2. ENDOKRİN BOZUCULAR

Endokrin bozucular (EB), 1962’de biyolog Rachel Carson’un ‘Silent Spring’ isimli, pestisitlerin kuşlar üzerindeki zararlı etkilerini konu edinen bir kitap yayınlamasıyla gündeme gelmiştir (4). 1979’da Sullivan ve Barlow, çevredeki kimyasal maddelerin fötüs ve insanlar üzerindeki zararlı etkilerini bildirmişlerdir (5). 1988’de Finkelstein ve ark.’nın ‘Bir cenaze hazırlayıcısının gizemi’ başlıklı makalelerinde, 50 yaşındaki bir cenaze hazırlayıcısı erkekte; tedrici libido kaybı, testislerde küçülme, sakal uzamasında yavaşlama, jinekomasti şikâyetlerinin endokrin bozucu kimyasallar ile ilişkili olabileceği düşünülmüştür. Hasta serumunda, bilinmeyen bir maddenin radyoaktif işaretlenmiş östrojen ile yer değiştirdiği ve maddenin kaynağının devamlı kullanılan mumya kremi olduğu saptanmıştır. Kremle temas kesilince şikâyetler düzelmiştir (6).

EB terimi için çeşitli tanımlamalar olsa da ilk olarak 1996 yılında Weybridge konferansında aşağıdaki tanımlama yapılmıştır (7) :

“**Endokrin Bozucular**, sağlıklı bir organizmada veya yeni nesil kuşaklarda endokrin fonksiyon değişiklikleri sonucu advers sağlık etkilerine neden olan dış kaynaklı maddelerdir ”

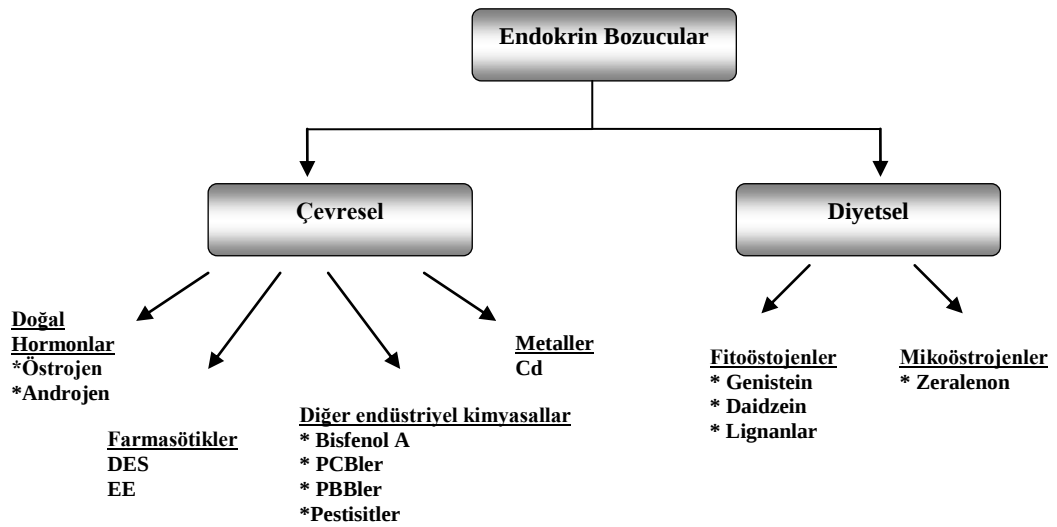
Aynı yıl ABD Çevre Koruma Ajansı (US EPA) bünyesinde EB tarama ve test etme programlarını geliştirmek için tavsiyede bulunacak Endokrin Bozucu Tarama ve Test Danışma Kurulu (EDSTAC) oluşturulmuştur.

US EPA endokrin bozucu bileşikleri organizmanın normal iç dengesinden, üreme ve gelişme süreçlerinden sorumlu olan hormonların sentezini, sekresyonunu,

dolaşımını, metabolizmasını, bağlanma yeteneğini veya eliminasyonunu etkileyen dış kaynaklı ajanlar olarak tanımlamıştır (8).

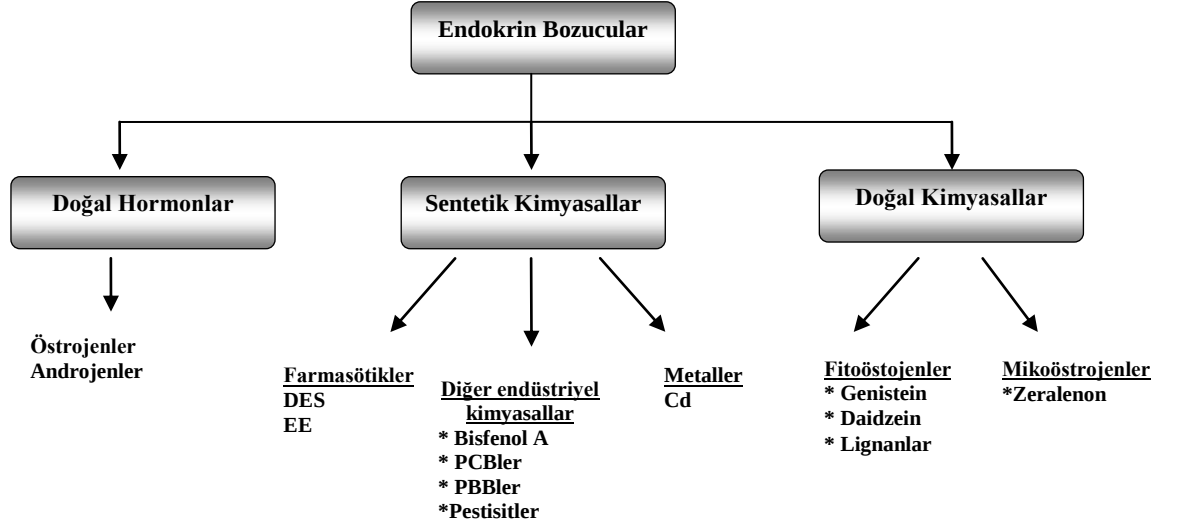
I.1.2.1. Endokrin Bozucuların Sınıflandırılması

EBları insanlar ve diğer canlıların maruziyet kaynakları bakımından çevresel ve diyetisel kaynaklar olarak sınıflandırabiliriz. Çevresel EBlar da kendi aralarında doğal hormonlar, farmasötikler, diğer endüstriyel kimyasallar ve metaller olarak gruplandırılabilir (Şekil I.3) (9).



Şekil I.3: Endokrin bozucuların maruziyet kaynaklarına göre sınıflandırılması (9)

Kimyasal yapı ve özellikleri bakımından EBların sınıflandırılması ise **Şekil I.4**'de görüldüğü gibi yapılabilir.



Şekil I.4. Kimyasal yapı ve özellikleri bakımından endokrin bozucuların sınıflandırılması

Doğal Hormonlar: Doğal hormonlar gonadal steroid yapısında olup dişi ve erkek canlılarda üretilen östrojenler, androjenler ve progestinlerdir. Dişi ve erkek canlılarda üretilen steroid hormonları lipofilik yapıdadır, yağda çözünürler ve çoğunlukla suda çözünebilen glukuronotlar ve sülfat konjugatları şeklinde sentezlenirler. Çevresel koşullarda bu konjugatlar kolaylıkla hidrolize olurlar ve serbest hormonların/metabolitlerin oluşmasını sağlarlar. Kanalizasyon yolu ile doğal hormonlar veya metabolitleri atık sulardan yer altı sularına karışmakta ve başta kara hayvanları ve sucul canlılar olmak üzere insanlara da ulaşabilmektedirler (10,11).

Sentetik Kimyasallar: Sentetik kimyasallar farmasötikler, diğer endüstriyel kimyasallar (pestisitler, PCBler, PBBler, fitalatlar, bisfenol A, dioksin, benzopiren) ve metaller olarak gruplandırılabilirler. Farmasötikler endokrin sistemi düzenlemek amacıyla üretilen sentetik hormonlardır. Doğum kontrol ilaçları, hormon yerine koyma tedavi bileşenleri ve bazı hayvan besin katkı maddeleri, bu grupta yer

almaktadır. Farmasötiklere örnek olarak dietilstilbestrol (DES), etinilestradiol (EE) ya da tamoksifen verilebilir. Endüstriyel temizlik maddeleri, tarım ilaçları ve plastik katkılı tüketim maddeleri ise endüstriyel kimyasal grubunda değerlendirilirler. Kurşun, civa, kadmiyum, arsenik, uranyum gibi ağır metaller ve endüstriyel işlemler sonrası oluşan dioksin gibi maddeler de bu grupta yer almaktadır.

Doğal Kimyasallar: Fitoöstrojenler ve mikoöstrojenler bu grupta sınıflandırılırlar. Fitoöstrojenler bitkilerde bulunan doğal östrojenlerdir. Mikoöstrojenler ise tahıllar üzerinde mantarların ürettiği bileşiklerdir.

I.1.2.2. Endokrin Bozucuların Etki Mekanizmaları

EBların etkilerinin incelendiği çalışmaların çoğu endokrin bozucuların etki mekanizmalarını aydınlatmaya yönelik çalışmalar olmuştur. Geçtiğimiz yıllarda farklı etki mekanizmaları ortaya çıkarılmışsa da en önemlileri hormonlar üzerinden oluşturdukları etkilerdir.

I.1.2.2.1. Hormon Reseptörleri ile Direkt Etkileşim

Agonist Etki

Agonist etki gösteren bileşikler hücre reseptörlerine reseptörlerin doğal ligandı gibi bağlanarak bir etki oluştururlar. Hormon reseptörünün aktivasyonu ile benzer endojen hormon etkisi oluşur. Agonistler genelde doğal ligandların davranışlarını taklit ederler. Agonist etki reseptöre bağlanma affinitesine bağlı olduğu gibi, reseptörü aktive etme yeteneğine de bağlıdır. Bu nedenle bir reseptöre ligand bağlanması bileşiğin aynı etkiyi göstereceği anlamına gelmemektedir. Sentetik östrojenlerden dietilstilbestrol ve etinilestradiol östrojen agonisti bileşiklerdir. Çoğu endokrin bozucu sentetik bileşik hormon reseptörleri üzerinde agonist etkilidir (12).

Antagonist Etki

Agonist bileşikler bir etki oluştururken antagonist bileşikler bu etkinin oluşumunu engellerler. Böylece reseptörün normal aktivasyonu gerçekleştirilemez. Reseptörün inhibisyonu yarışmalı (endojen agonist ile egzogen antagonist aktif bağlanma bölgesine bağlanmak için yarışır) veya yarışmasız (inhibitör, reseptör veya reseptör-hormon kompleksinin aktif olmayan bölgesine bağlanarak allosterik inhibisyona neden olur) olabilir. Yarışmalı inhibisyon sonucunda reseptörün deaktivasyonu meydana gelirken, yarışmasız inhibisyonla reseptörün sebep olduğu reaksiyonların azalması veya yavaşlaması söz konusu olmaktadır (12).

Hormon reseptörlerinin tipik antagonistleri olan herbisitlerden linuron, vinklozolin, farmasötik ajanlardan tamoksifen ve bu bileşiklerin metabolitleri androjen ve/veya östrojen reseptörlerine bağlanırlar (13, 14). Egzogen ligand ve hormon reseptörü arasındaki reaksiyon ve ligandın konsantrasyonu agonistik ve antagonistik etki oluşumunda önemli rol oynamaktadır.

I.1.2.2.2. Endokrin Sistem ile Dolaylı Etkileşim

Hormon Konsantrasyonu

Kimyasallar hormon metabolizmasını farklı yollar ile etkilemektedirler. Önemli enzimatik reaksiyonların inhibisyonu ile hormon sentezi bozulabilmektedir. Hormon metabolizması karaciğerde bulunan sitokrom P450'nin indüksiyonundan etkilenir. Steroid hormonların sentezi ve degradasyonunda anahtar rol oynayan bu enzimlerin aktivitesi çeşitli ksenobiyotikler (ör: PCB türevleri, dioksin) tarafından etkilenmektedir (15, 16).

CYP 19 sitokromundan aromataz enzimi sentezlenmekte ve bu enzim testosteronun östrojene dönüştürülmesini gerçekleştirmektedir. Aromataz inhibitörü ksenobiyotikler yüksek testosteron ve düşük östrojen konsantrasyonlarının oluşmasına neden olurlar. Bu etki antiöstrojenik olarak yorumlanabilir. Tribütülin'in deniz canlılarından neogastropodlarda oluşturduğu etki buna örnek olarak verilebilir. Aromataz enziminin inhibisyonu ile dişilerde testosteron seviyesi yükselmekte ve imposeks (tipik erkek seks karakteristiklerine sahip dişi) oluşumu gözlenmektedir (17,18).

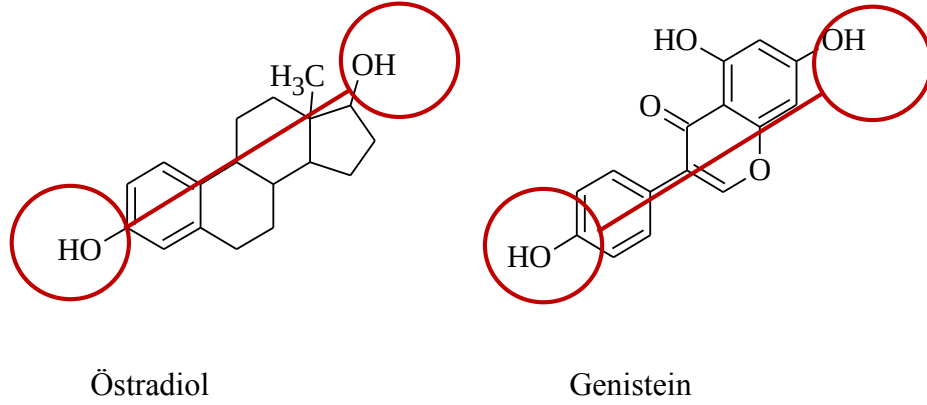
Hormon Reseptörü Konsantrasyonu

Reseptör aracılıklı süreçlerde, endojen ligand ve hormon reseptörünün her ikisinin de fonksiyonu bulunmaktadır. 2,3,7,8-tetraklorodibenzo-*p*-dioksin (TCDD) arilhidrokarbon reseptörünün ekzojen agonistidir. Bu reseptör hormon metabolizması ile direkt ilişkili değildir fakat reseptörün aktivasyonu ile endokrin sistemde farklı etkiler oluşmaktadır. Bu etkiler östrojen reseptörlerinin degradasyon hızının artması, östradiol metabolize eden enzimlerin indüksiyonunun artması ve östradiol veya promotörlerce kontrol edilen gen ekspresyonunun inhibisyonu şeklinde olabilmektedir (18).

I.1.3. FİTOÖSTROJENLER

Fitoöstrojenler, biyolojik olarak aktif ve endojen bir östrojen olan östradiole (E2) benzer kimyasal yapıya sahip bitkisel kaynaklı doğal bileşiklerdir. Fitoöstrojenlerin en bilinen örneklerinden biri olan genistein ile E2'nin moleküler yapıları birçok açıdan benzerdir. İki molekülün de her iki ucunda bulunan hidroksil grupları arasındaki intramoleküler uzaklık hemen hemen aynıdır (**Şekil I.5**). Bu

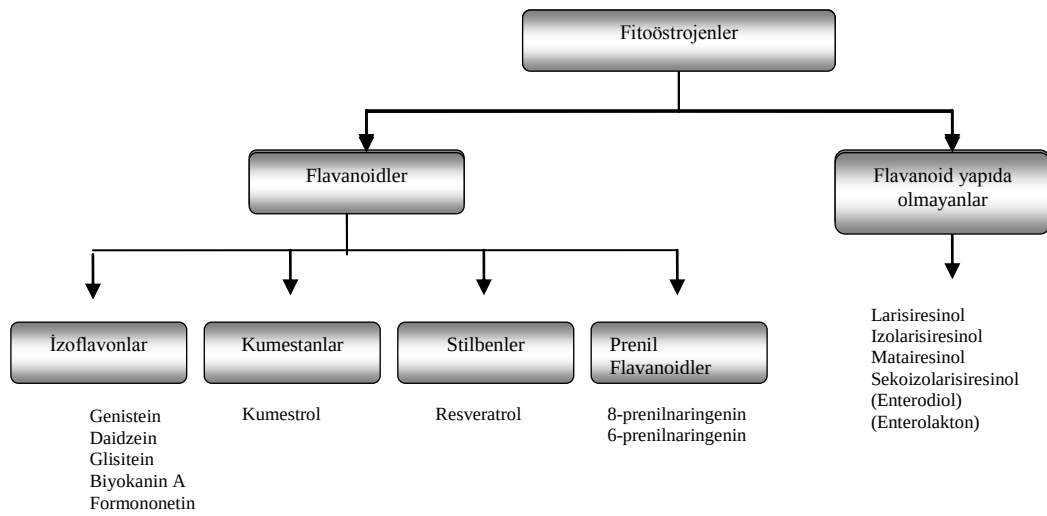
yapı benzerliği nedeniyle çeşitli hücrelerde ER'ye bağlanma yeteneğine sahiptirler ve bu şekilde östrojenik ya da antiöstrojenik etki gösterirler (19).



Şekil I.5. Östradiol ve genisteinin molekül yapıları

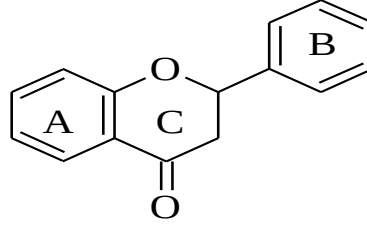
I.1.3.1. Fitoöstrojenlerin Kimyasal Yapıları ve Sınıflandırılması

İngiltere toksisite komitesi (COT) hazırladığı raporda fitoöstrojenleri flavonoidler ve flavonoid olmayanlar olmak üzere iki ana sınıfa ayırmıştır. Fitoöstrojenlerin büyük kısmı difenilpropan yapısında olan ve “flavonoid” olarak bilinen fenolik bileşiklerdir (20).



Şekil I.6. Fitoöstrojenlerin sınıflandırılması

Flavonoidler oksijenle heterosiklik halka (C halkası) oluşturan, üç karbon atomuyla birbirine bağlı iki aromatik halkadan (A ve B halkaları) oluşurlar (**Şekil I.7**).



Şekil I.7: Flavonoidlerin genel yapısı

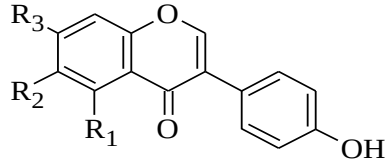
Flavanoidler yapısındaki bileşikler içerdikleri heterosiklik halka yapısına göre farklı sınıflara ayrılabilirler (21,22). Flavonlar, flavanlar, flavanonlar, flavonoller, lignanlar, kumestanlar, stilbenler gibi.

İzoflavonlar

Üzerinde en çok çalışılmış olan izoflavon yapısındaki başlıca fitoöstrojenler baklagillerde bulunan genistein ve daidzeindir. Bu izoflavonlar glikozit veya aglikon halinde bulunabilirler. Glikozit yapıdaki izoflavonlar barsakta hidrolize edilerek aglikonlara dönüştürülürler. Aglikonlar da barsak epitelyum hücrelerince kolayca absorbe edilirler.

İzoflavonların diyetteki temel kaynağı soya bazlı gıdalardır. Yüksek miktarda soya tüketilen Asya'da soya alımı günlük 30-50 g ve genistein plazma konsantrasyonu ise 0.1-10 mM olarak bildirilmektedir. Soya ürünlerinin fermentasyonu izoflavon miktarını azaltsa da, fermente ürünlerde izoflavonlardan biyoyararlanım daha yüksek olmaktadır. Dolayısıyla idrarda daha yüksek miktarlarda saptanmaktadırlar. Genistein östrodiol nazaran daha düşük etkili olsa

da, plazmadaki yüksek konsantrasyonları çeşitli fizyolojik etkilerin ortaya çıkmasına neden olabilir (23).

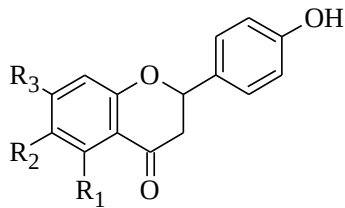


R ₁	R ₂	R ₃	Bileşik
H	H	OH	Daidzein
OH	H	OH	Genistein
H	OCH ₃	OH	Glisitein
H	H	O-Glukoz	Daidzin
OH	H	O-Glukoz	Genistin
H	OCH ₂	O-Glukoz	Glisitin

Şekil I.8: İzoflavonların genel yapısı

Kumestanlar

Kumestanlar çok sayıda olmasına rağmen sadece az bir bölümü östrojenik aktiviteye sahiptir. Özellikle kumestrol ve 4-metoksi kumestrol'ün östrojenik aktiviteye sahip olduğu gösterilmiştir. Kumestrol'ün diyetteki temel kaynağı baklagiller olduğu gibi, brüksel lahanası ve ıspanakta da düşük seviyelerde bulunduğu bildirilmiştir. Yonca ve soya fasulyesi filizlerinde sırasıyla 28 ve 7mg/100 g kuru ağırlıkta bildirilmişken, olgun soya fasulyesinde sadece 0,12mg/100g kuru ağırlıkta olduğu bildirilmiştir (23).



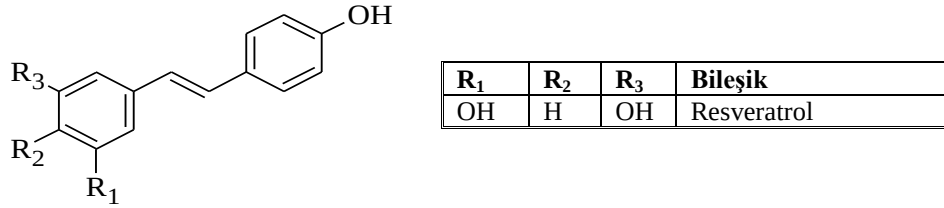
R ₁	R ₂	R ₃	Bileşik
H	H	OH	Kumestrol

Şekil I.9: Kumestrol'ün genel yapısı

Stilbenler

Stilbenler, flavanoidler gibi fenilpropanoid-asetat metabolik yolağı ile üretilirler. Fitoöstrojenik stilbenlerin temel kaynağı olan yer fıstığı ve kırmızı

şaraptır. Bu ürünlerde bulunan stilben türü resveratroidir. Resveratrolun cis ve trans olmak üzere iki izomeri bulunmakta olup sadece trans (E-stilben) izomeri östrojenik olarak bildirilmiştir. Beyaz şarapta düşük miktarlarda trans-resveratrol bulunmuştur. Şaraptaki resveratrol içeriği birçok faktöre (fermentasyon süresi, mevsim, coğrafik bölge vb.) bağlıdır (23).



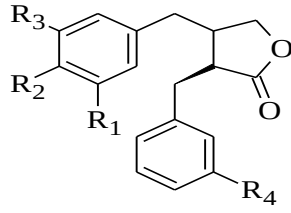
Şekil I.10. Resveratrol'un genel yapısı

Prenil Flavanoidler

8-prenilnaringenin, 6-prenilnaringenin, ksantohumol, isoksantohumol gibi prenil flavanoidler östrojenik özellikleri tanımlanmış bileşiklerdir (24, 25, 26). 8-prenil naringenin biranın içinde yer alan şerbetçiotunda (*Hummulus lupulus*) bulunmaktadır. Yapısal olarak bu bileşikler izoflavonlara benzer olsa da kimyasal yapıları nedeniyle suda daha az çözünmektedirler.

Flavanoid Yapıda Olmayanlar

Flavanoid yapıda olmayan fitoöstrojenlerden lignanlar bu grupta yer alabilmektedir. Lignan terimi fenilpropanoid dimerleri ve oligomerlerinin farklı sınıfları için kullanılır. Sekoizolarisiresinol ve metairesinol aslında östrojenik olmayan iki lignan türüdür, fakat barsak florasında östrojenik aktivite gösteren enterodiol ve enterolaktone dönüştürülür. Lignanlar keten tohumunda, tam buğday tanesinde, sebzelerde ve çayda yüksek miktarda bulunur.



R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	Bileşik
H	H	OH	OH	Enterolakton

Şekil I.11. Enterolakton'un genel yapısı

I.1.3.2. Fitoöstrojenlerin absorpsiyon, dağılım, metabolizma ve atılımları

Fitoöstrojenler bitkilerde genel olarak genistin, daidzin ve glisitin gibi şeker moleküllerine bağlı olarak (glikozitleri halinde) bulunur. Bu halde hormonal olarak aktif değildirler, biyolojik etki göstermezler. Barsak bakterileri fitoöstrojenlerin absorpsiyon ve metabolizmaları için esastır. Vücuda alındıktan sonra barsaklarda bakteriyal β -glikozidazlar tarafından hidroliz edilirler ve şeker grupları ayrılır. Böylece biyoaktif formları olan aglikonlarına (genistein, daidzein gibi) dönüştürülürler. Bu formda fitoöstrojenler barsaklardan hızla emilir. Bazen de ileri biyotransformasyona uğrayarak daha güçlü östrojenik etkiye sahip metabolitlere dönüşebilirler. Aglikonlar barsaktan absorbe olduktan sonra karaciğerde glukuronat konjugatı oluşturur. Konjugatlar safraya atılabilir; enterohepatik sıklusle reabsorbe olabilir ya da değişmeden idrarla atılabilir (20, 27, 28).

Fitoöstrojenlerin metabolizmasında barsak mikroflorasının önemi antibiyotik alımında metabolizmalarının bloke olması, yenidoğanlarda barsakta bakteriyal enzim aktiviteleri yetişkinlere göre daha düşük olduğu için emilimin yetişkinlere kıyasla daha az oluşu ve yaşamın ilk 4 ayında ileri metabolitlerin yetişkinlerde olduğu kadar oluşmadığının gözlenmesi ile saptanmıştır (29, 30). Sabit bir plazma düzeyi sağlayabilmek için tek bir yüksek doz alım yerine gün içinde bölünmüş birkaç doz soyalı besin ya da gıda desteği alınması önerilmektedir (31).

Fitoöstrojenler hızlı bir şekilde yıkılarak vücuttan kısa sürede uzaklaştırıldıkları için uzun yarılanma ömrüne sahip ve vücutta birikebilen, bu nedenle de endokrin sistem toksisitesine neden olan çevresel östrojenik kimyasallardan farklılık göstermektedirler (32).

I.1.3.3. Fitoöstrojenlerin Sağlık Üzerine Etkileri

I.1.3.3.1. Üreme Sistemi ve Gelişim üzerine Etkileri

Fitoöstrojenlerin üreme ve gelişim üzerinde advers etkileri ilk olarak fitoöstrojen bakımından zengin bitkiler tüketen hayvanlarda gözlenmiştir. 1946 yılında batı Avusturalya’da, izoflavonca zengin bir çeşit yonca (*Trifolium subterraneum*) ile beslenen koyunlarda üreme bozukluğu geliştiği fark edilmiştir (33). Fertilite üzerindeki advers etkilerden yoncada bulunan östrojenik bileşiklerin sorumlu olduğu ileri sürülmüştür. İnek, koyun, tavşan gibi memeli türlerinde de fertilite problemlerinin bildirilmesi diyetel fitoöstrojenlerin insan üreme sistemi ve gelişim üzerinde benzer etkiler gösterebileceğini düşündürmüştür. İkinci Dünya Savaşı’nın sonlarına doğru, yaşanan besin kıtlığı nedeniyle lale soğanlarını gıda olarak tüketen Almanlarda üreme sistemi üzerine etkiler kaydedilmiş; bir çok kadında menstrual bozukluklar gözlenmiştir. Bunun da lale soğanında bulunan fitoöstrojenlerden kaynaklanabileceği ileri sürülmüştür (33).

Fitoöstrojenlerce zengin diyet tüketen doğu toplumlarında, batıya kıyasla infertilite oranlarında belirgin bir artış bildirilmemiş olmakla birlikte Japon erkeklerinin testis kütlelerinde belirgin bir azalma olduğu ve bunun bir üreme sistemi hastalığını işaret edebileceği bildirilmiştir. Bunun yanı sıra Japonya’da doğum hızının belirgin biçimde azaldığı da bildirilmiştir. Fitoöstrojenlerin doğulu toplumlarda infertiliteyi azaltmayışının nedeni diyetle nesiller boyu yüksek

düzeylede östrojenik maddelere maruziyetin bireylerde istenmeyen etkilere karşı rezistans gelişmesi ile sonuçlanmış olabileceği şeklinde açıklanmaktadır (34).

Bebekler soya bazlı bebek mamalarıyla, yetişkinler de soyalı yiyeceklerle yüksek miktarlarda fitöostrojene maruz kalmaktadır. Önemli gelişim dönemlerinde izoflavonlara artan maruziyet ve buna ek olarak pestisitler gibi diğer kaynaklardan ksenoöstrojenlere de maruz kalma ana tartışılan konulardan biridir. Bu çoklu maruziyet fitöostojenlerin endokrin sistem üzerinde etkili olmasına neden olabilir ve vücudun östrojen homeostazını bozabilir. Özellikle erken dönem maruziyetin göz önünde bulundurulduğu daha fazla insan çalışmalarına ihtiyaç vardır (35).

I.1.3.3.2. Fitoöstrojenler ve Osteoporoz

Osteoporoz, azalmış kemik kütlesi ve kemik dokusunun yapısının bozulmasıyla kemik hassasiyetinde artış ve kırılma riski ile karakterize bir hastalıktır. Kemik oluşumundan sorumlu hücreler (osteoblastlar) ile kemik yıkımından sorumlu hücreler (osteoklastlar) arasında kemik yıkımı lehine bir dengesizlik durumu, kemik kütle kaybı ve osteoporoz ile sonuçlanır. Sıçanlarla yapılan çalışmalarda fitöostrojenlerin kemik kaybını önlemede yararlı etkileri olduğu, kemik mineral yoğunluğunu arttırdığı bildirilmiştir (20).

Nisbeten yüksek miktarlarda soya tüketen toplumlarda yapılan epidemiyolojik çalışmalar da fitöostrojen alımı ile artmış kemik mineral yoğunluğu arasında ilişki olduğunu göstermiştir (36). Pubertal dönem öncesinde ve sırasında kemiklerin durumunun ileri yaşlardaki osteoporoz oluşumunda belirleyici olduğu bilinmektedir. Çok sayıda çalışmada menopoz öncesi ve sonrası kadınlarda soya alımı ile kemik mineral yoğunluğu arasında pozitif bir ilişki olduğu bildirilirken, bazı çalışmalarda bir ilişki bulunmamıştır. Ancak yetişkinlerde yapılan kısa süreli çalışmalar, erken yaşlar ve takip eden yıllarda uzun süre fitöostrojen alımının

(geleneksel Asya diyetinde olduğu gibi) koruyuculuğu konusunda yorum yapmayı olanaksız kılmaktadır (37). Fitoöstrojen alımı ile kemik kaybı göstergeleri arasındaki ilişkileri inceleyen uzun süreli insan çalışması bulunmamaktadır (38). Eğer fitoöstrojen içeren gıdalar ya da gıda destekleri kemik kaybını önlemek amacıyla önerilecekse söz konusu uzun süreli çalışmaların yapılması gerekmektedir.

I.1.3.3.3. Fitoöstrojenler ve Menopoz

Japon kadınlarda menopoz sonrası sıcak basması, gece terlemeleri gibi vazomotor semptomların batı toplumlarındaki kadınlardan 10 kat daha düşük olduğu gözlenmiştir. Semptomlardaki bu farkın Japon kadınlarda idrar fitoöstrojen düzeylerinin batılı kadınlara kıyasla 100 kat fazla olmasıyla ilişkili olabileceği düşünülmüştür (39).

Östrojen agonisti ve antagonisti olarak fitoöstrojenler seçici östrojen reseptörü düzenleyicileri (SERM) olarak isimlendirilmektedir. SERM, E2 ile benzer yapısı ve östrojen reseptörlerine afinitesi olan non-steroidal kimyasallar olarak da tanımlanabilir. SERMler geleneksel hormon yerine koyma terapisinin istenmeyen yan etkileri önlemek geliştirilmiştir. İdeal SERM sıcak basmaları, vajina kuruluğu, ruh durumu değişiklikleri gibi postmenopozal semptomları tedavi edebilmelidir. Ancak hormon yerine koyma tedavisinin çeşitli yan etkileri ve meme kanseri riskini artırıcı etkisi kadınların alternatif ve doğal yoldan östrojen kaynağı arayışına girmelerine neden olmuştur. Fitoöstrojenler de östrojene duyarlı dokularda agonist veya antagonist özellikleri nedeniyle SERM'dir. Bu da fitoöstrojen kullanımını arttırmıştır (40).

Menopoz öncesi ve sonrası kadınlarda yapılan çalışmalarda soya tüketimiyle sıcak basmalarının azaldığı ancak çoğu çalışmada bu düşüşlerin kontrol grubunda gözlenenden daha fazla olmadığı bildirilmiştir. Görülen bu güçlü plasebo etkisinin

gerçek plasebo etkisi ve vazomotor semptomlarda zamanla oluşan normal düşmeye bağlı olduğu düşünülmektedir (41).

I.1.3.3.4. Fitoöstrojenler ve Kardiyovasküler Sistem

Fitoöstrojenlerin kardiyovasküler hastalıklarda (KVH) koruyucu rol oynadığını gösteren epidemiyolojik çalışmalar vardır. Soya ürünlerinin tüketimi ters olarak serum total kolesterol düzeyleri ile ilişkilendirilmiştir. İzoflavon ve lignan tüketimi arttıkça plazma trigliserit düzeyleri ve KVH riski azalmaktadır (41). Diğer çalışmalarda diyetel izoflavonlarla aort sertliği arasında önemli bir ters ilişki olduğu gösterilmiştir (42).

Fitoöstrojenlerin KVH üzerine etkisini değerlendiren çalışmalar çoğunlukla kan lipid konsantrasyonları üzerinde yoğunlaşmıştır. Ortalama günde 47 g soya proteini alımı sonucunda total kolesterol düzeyinde %9.3, düşük dansiteli lipoprotein (LDL) kolesterolünde %12.9 ve trigliseritte %10.5 oranında azalma olduğu bildirilmiştir (43).

Soya proteinlerinin KVH riskini azaltmalarının olası mekanizmalarını Lichenstein plazma kolesterol düzeylerini azaltması, LDL'nin oksidasyona hassasiyetini azaltması, arteriyel esnekliği arttırması ve östrojenik aktivitesi olarak özetlemiştir (44, 45).

I.1.3.3.5. Fitoöstrojenler ve Kanser

Singapur'da yüksek miktarda soya tüketiminin menopoz öncesi kadınlarda meme kanseri riskini azalttığı bulunmuştur. Başka bir çalışmada ergenlik dönemi boyunca soya tüketiminin meme kanserine karşı önemli derecede koruyucu olduğu gösterilmiştir (46). Ayrıca araştırmalar Asya'dan Amerika'ya göç etmiş kadınlarda çocuklukta yüksek soya tüketiminin azalmış meme kanseri riski ile ilişkili olduğu

bildirilmiştir. Bu yararlı etkiler geleneksel diyetlerinde soya ürünleri tüketmeyen batı toplumlarında görülmemektedir (47). Bazı epidemiyolojik çalışmalarda soya alımı ile meme kanseri arasında bir ilişki bulunmazken bazıları riskin arttığını göstermiştir (48). Lamartiniere ve ark. (49) yetişkin sıçanlarda yaptıkları çalışmada, kimyasal olarak indüklenen meme kanserine karşı en yüksek korumanın genisteine puberte öncesi ve çocukluk döneminde maruziyet ile sağlandığını göstermiştir.

Meme kanseri hücrelerinde yapılan *in vitro* çalışmalarda fitoöstrojenlerin bifazik etki göstererek, düşük dozlarında tümör gelişimini stimüle ettiği yüksek dozlarında ise inhibe ettiği gösterilmiştir. Genistein 10 μM 'a kadar olan konsantrasyonlarında ER taşıyan hücre hatlarında tümör gelişimini stimüle etmiştir. Ancak ER taşıyan ve taşımayan insan meme kanseri hücrelerinin ikisinde de 10 μM 'ın üstündeki konsantrasyonlarında antiproliferatif etki gösterdiği bulunmuştur (50).

Fitoöstrojenler ve prostat kanseri ile ilgili epidemiyolojik çalışmaların çoğu soya ürünlerinde bulunan izoflavonların kansere karşı koruyucu etkisi olduğunu desteklerken, fitoöstrojen alımına bağlı olarak riskin arttığını gösteren çalışmalar da vardır.

Fitoöstrojenlerin diğer kanser türlerindeki aktivitesini araştıran çalışma sonuçları daha belirsizdir. Soya ürünlerinin tüketimi ile mide kanseri arasında ürünün fermente olup olmamasına bağlı olarak bir ilişki vardır. Fermente soya ürünleri yüksek miktarda N-nitrozo bileşikler veya prokarsinogenik bileşikler içermesi nedeniyle mide kanseri riskini arttırabilir. Soya alımı ve kolon kanseri arasında ters ilişki bulunmuştur ancak misonun rektal kanseri attırdığını bildiren çalışmalar vardır (51). Guo ve ark. İnsan kolon kanseri hücrelerinde yaptıkları çalışmada daidzeinin bifazik etki gösterdiğini bulmuşlardır (52). Daidzein 1 μM 'a

kadar olan düşük konsantrasyonlarında kolon kanseri hücrelerinin büyümesini stimüle ederken, 10, 50 ve 100 µM'daki yüksek konsantrasyonlarında doza bağlı olarak hücre büyümesini inhibe etmiştir. Hawai'de yapılan bir vaka-kontrol çalışmasında soya ürünlerini tüketiminin endometrial kanseri riskini azalttığı gösterilmiştir (53).

I.1.4. ENDOKRİN BOZUCULARIN SAPTANMASINDA KULLANILAN

İN VİTRO ve İN VİVO TARAMA TESTLERİ

US-EPA bünyesinde oluşturulan EDSTAC tarafından önerilen 'endokrin toksisite test etme' yaklaşımı **Tablo I.3'de** verilmiştir. Birinci basamak tarama testi östrojen, androjen ve tiroid sistemleri ile etkileşebilen kimyasalları belirlemek için tasarlanmıştır. İkinci basamak tarama testlerinin amacı ise kimyasal maddenin gerçekten endokrin süreçler ile etkileşip etkileşmediğini saptamak ve olası doz-yanıt ilişkisini ortaya koymaktır (54)

Ekonomik İşbirliği ve Kalkınma Örgütü (OECD) de benzer biyoölçüm yöntemlerinin validasyon çalışmalarını kimi testler için tamamlamış, kimi testler için ise halen sürdürmektedir. Kimyasallar için OECD test kılavuzlarında endokrin etkilerin araştırılmasında kullanılan birçok metot bulunmaktadır. Bir veya iki nesil boyunca yapılan testler (OECD test kılavuzu 415 ve 416) endokrin ilişkili dokular ve üreme fonksiyonları üzerinde en kapsamlı yöntemlerdir (55, 56). Özellikle iki nesil boyunca yapılan testler çok çeşitli önemli noktaların (kabul edilen östrojenitenin ve diğer endokrin özellikli mekanizmalar) tarama çalışmalarını kapsamaktadır. Bununla beraber östrojenite tarama çalışmaları için akut ve sub-akut testler avantajlı yöntemlerdir.

Endokrin aktif bileşikler için OECD test stratejisi östrojenik / antiöstrojenik etkilerin araştırılmasında üterotrofik testler, androjenik / antiandrojenik etkilerin araştırılmasında Hershberger testi, östrojenik / antiöstrojenik, androjenik / antiandrojenik, tiroid / antitiroid etkilerin araştırılmasında sub-akut testi (TG 407) (57) gibi çeşitli kısa süreli testleri içermektedir. Bu testler diyetle yer alan bileşiklerin (içerik maddeleri, karışımları) test edilmesine de uygundur.

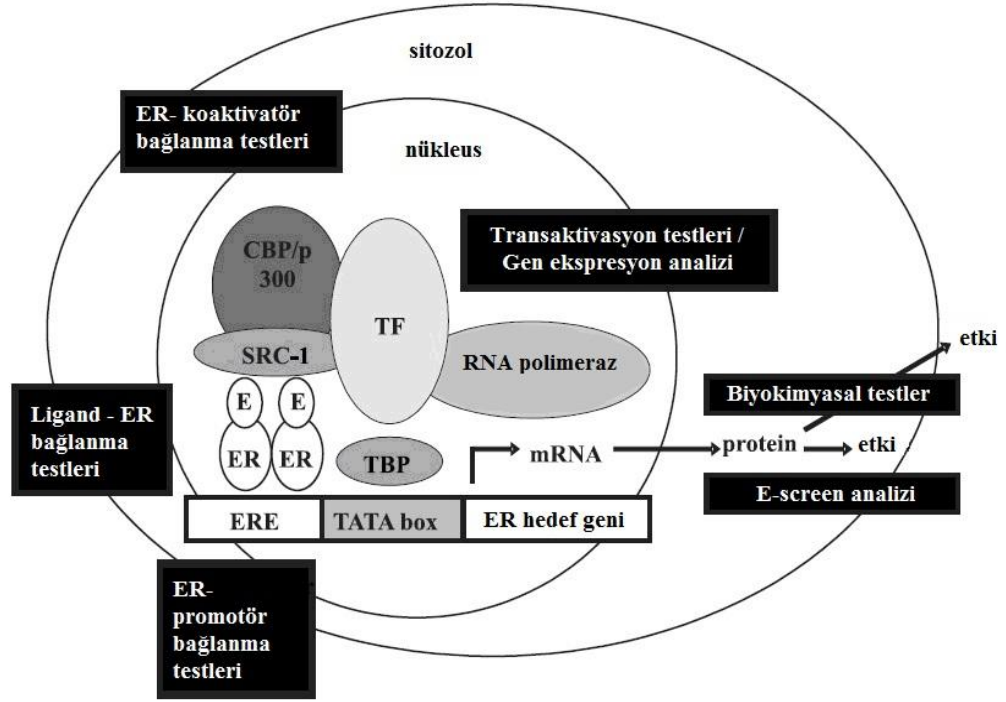
Tablo I.2. US-EPA EDSTAC tarafından önerilen endokrin toksisite testleri

Birinci Basamak Tarama Testleri <u><i>In vitro</i></u> ▪ Östrojen reseptörüne bağlanma ya da raportör gen biyoölçüm yöntemi ▪ Androjen reseptörüne bağlanma ya da raportör gen biyoölçüm yöntemi ▪ Steroidojenez biyoölçüm yöntemi <u><i>In vivo</i></u> ▪ Sıçan 3gün üterotrofi biyoölçüm yöntemi (subkütan) ▪ Sıçan 14-20 gün pubertal dişi biyoölçüm yöntemi ▪ Sıçan 5-7gün hershberger biyoölçüm yöntemi ▪ Kurbağa metamorfoz biyoölçüm yöntemi <u><i>Alternatif biyoölçüm yöntemleri</i></u> ▪ İn vitro plasental aromataz biyoölçüm yöntemi ▪ İn vivo uterotrofi biyoölçüm yöntemi (intraperitoneal) ▪ İn vivo erişkin erkek biyoölçüm yöntemi
İkinci Basamak Toksisite Testleri <u><i>In vivo</i></u> ▪ Sıçanlarda iki nesil memeli üreme toksisite çalışmaları ▪ <u><i>Daha az kapsamlı testler</i></u> ▪ Alternatif memeli üreme testi ▪ Gelişimsel Toksisite testi ▪ Tek nesil testi ▪ <u><i>Diğer hayvan sınıfları için testler</i></u> ▪ Kuşlarda üreme testi ▪ Amfibilerde gelişim ve üreme

I.1.4.1. *In Vitro* Testler

Klasik olarak östrojenik veya antiöstrojenik aktivite bitkisel veya kimyasal bileşiklerin östrojen reseptörleri olan ER- α ve ER- β 'ya bağlanmasına göre belirlenmektedir. Bu reseptörler ile etkileşim endokrin bozucu etki ile sonuçlanmaktadır. **Şekil I.12'** de ER aracılıklı testlerin dayandığı sinyal basamaklarının özeti verilmiştir (58). Bu testler;

- Ligand-ER bağlanma testleri,
- ER-promotör bağlanma testleri,
- ER-koaktivatör bağlanma testleri,
- Transaktivasyon (gen ekspresyonu) analizleri,
- Biyokimyasal testler,
- E-screen analizi'dir.



Şekil I.12. ER aracılıklı testlerin dayandığı moleküler mekanizmalar. (58)

E: ER ligandı

ERE: östrojen duyarlı eleman

CBP/p300 ve SRC-1: koaktivatör proteinler

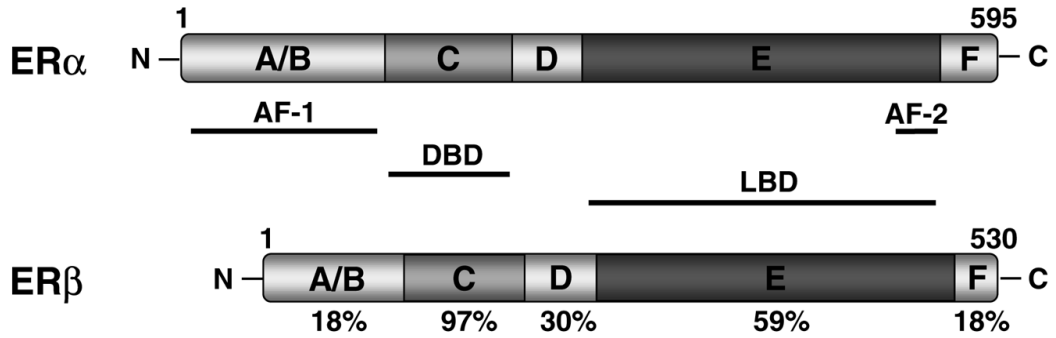
TBP: TATA bağlanma proteini

TF: transkripsiyon faktörü

a) Ligand-ER Bağlanma Deneyleri

Bu tez çalışmasında da kullanılan Ligand - ER bağlanma testi bileşiklerin östrojen reseptörü ile etkileşim yeteneğini ölçmektedir.

Östrojen reseptörleri nükleer reseptör süper ailesinin yesi olan intraselüler reseptörlerdir. Östrojen reseptörlerinin iki izoformu (ER- α , ER- β) bulunmaktadır. Son yıllarda balıklarda ER- γ da tanımlanmıştır, fakat potansiyel önemi ile ilgili henüz bir bilgi söz konusu değildir. ER- α ve ER- β 'yı kodlayan genler farklı kromozomlar üzerinde bulunmaktadır. ER- α 'yı kodlayan gen 6. kromozom üzerinde, ER- β 'yı kodlayan gen ise 14. kromozom üzerine bulunmaktadır. Östrojen reseptörleri dimer formunda bulunmaktadırlar. Reseptörler ER- α ($\alpha\alpha$), ER- β ($\beta\beta$) homodimerleri veya ER- $\alpha\beta$ ($\alpha\beta$) heterodimerleri şeklinde bulunulabilmektedir.



şekil I.13. İnsan strojen reseptörleri ER- α ve ER- β 'nın şematik gösterimi.

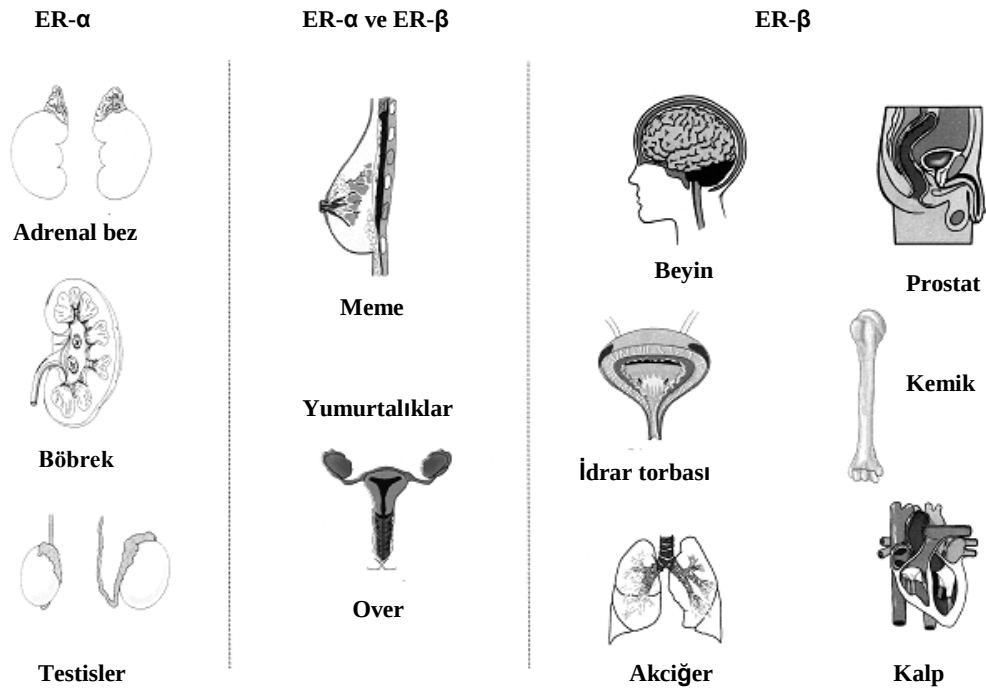
AF-1: Ligand-bağımsız transaktivasyon bölgesi
DBD: DNA bağlanma bölgesi

LBD: Ligand bağlanma bölgesi
AF-2: Ligand-bağımlı transaktivasyon bölgesi

şekil I.13'de insan östrojen reseptörlerinin yapısı gösterilmektedir. Günümüzde strojen reseptörlerinin tanımlanmış fonksiyonel 6 bölgesi bulunmaktadır (A/B, C, D, E, F). ER- α ve ER- β amino uçları olan A/B bölgesi yaklaşık olarak %18 aminoasit benzerliğine sahip olup, genel olarak yapıca

farklılık göstermektedir. Amino uçları A/B ligand-bağımsız transaktivasyon bölgesine (AF1) sahiptir. Evrimsel süreçte en çok korunmuş C bölgesi ise DNA bağlama bölgesidir ve ER izoformları arasında % 97 homoloji bulunmaktadır. D bölgesi nükleer lokalizasyon sinyallerini içerir ve % 30 homoloji gösterir. E bölgesi ise % 59 homoloji gösterir. E/F bölgeleri ligand bağlanması ve dimerizasyondan sorumludur. F bölgesi isoformlar arasında %18 homoloji gösterir (59).

Östrojen reseptörü izoformları değişen miktarlarda olmak üzere vücudun aynı ya da farklı bölgelerinde bulunabilmektedirler. **Şekil I.14**'te ER- α ve ER- β insan dokularında dağılımı gösterilmektedir (60).



Şekil I.14. Östrojen reseptörlerinin vücutta dağılımı

Ligand-reseptör bağlama deneyleri 1970’li yıllarda kimyasalların etkilerinin araştırılmasında oldukça kullanışlı bir yöntem haline gelmiştir. Bunun sebebi kimyasalların reseptörlere bağlanma deneylerinin hayvan ve insan çalışmalarına nazaran kolay olması ve hızlı sonuç vermesinden kaynaklanmıştır.

Klasik ER- ligand bağlanma deneylerinde radyoaktif olarak işaretlenmiş olan E2 ile test edilecek bileşik ER bağlanma bölgesine yarışmalı olarak bağlanırlar. Deneyde yarışmalı bağlanma gerçekleştiği için her bileşiğin ER- α ve ER- β ’e bağlanma afinitesi E2’ye göre hesaplanmakta, dolayısıyla rölatif bir değerlendirme sağlamaktadır (61,62).

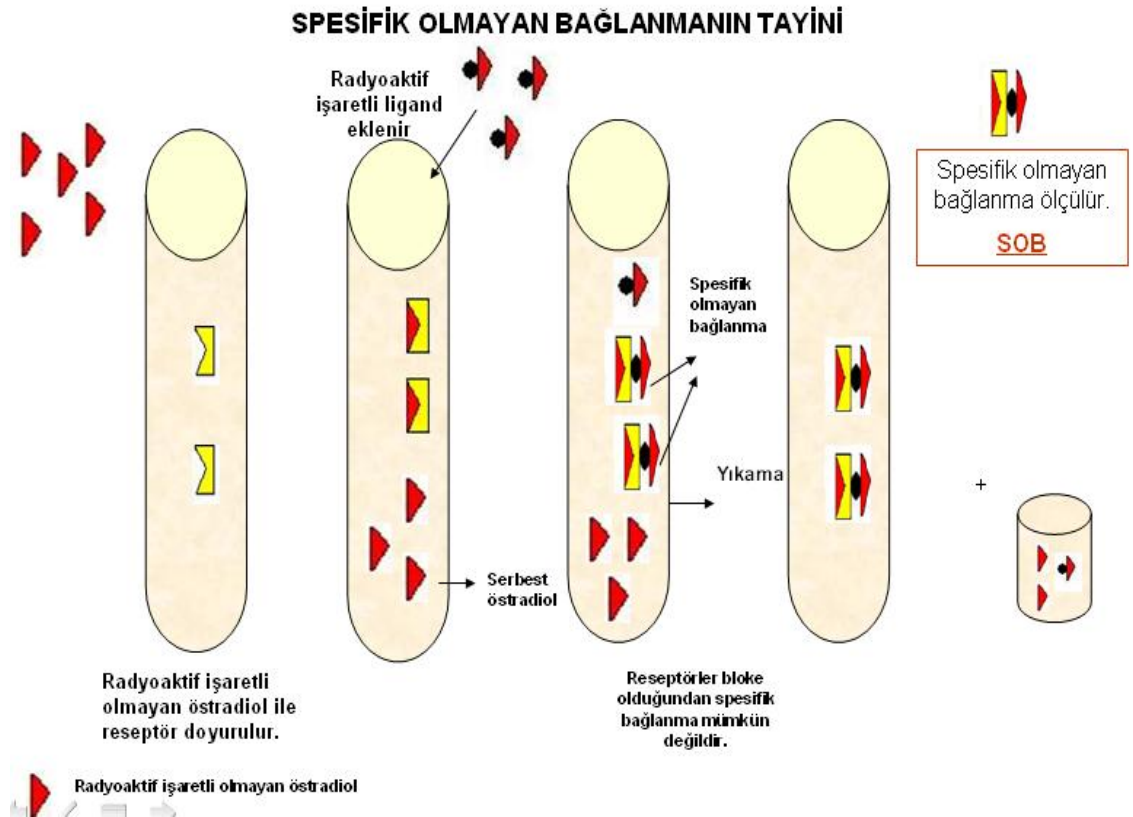
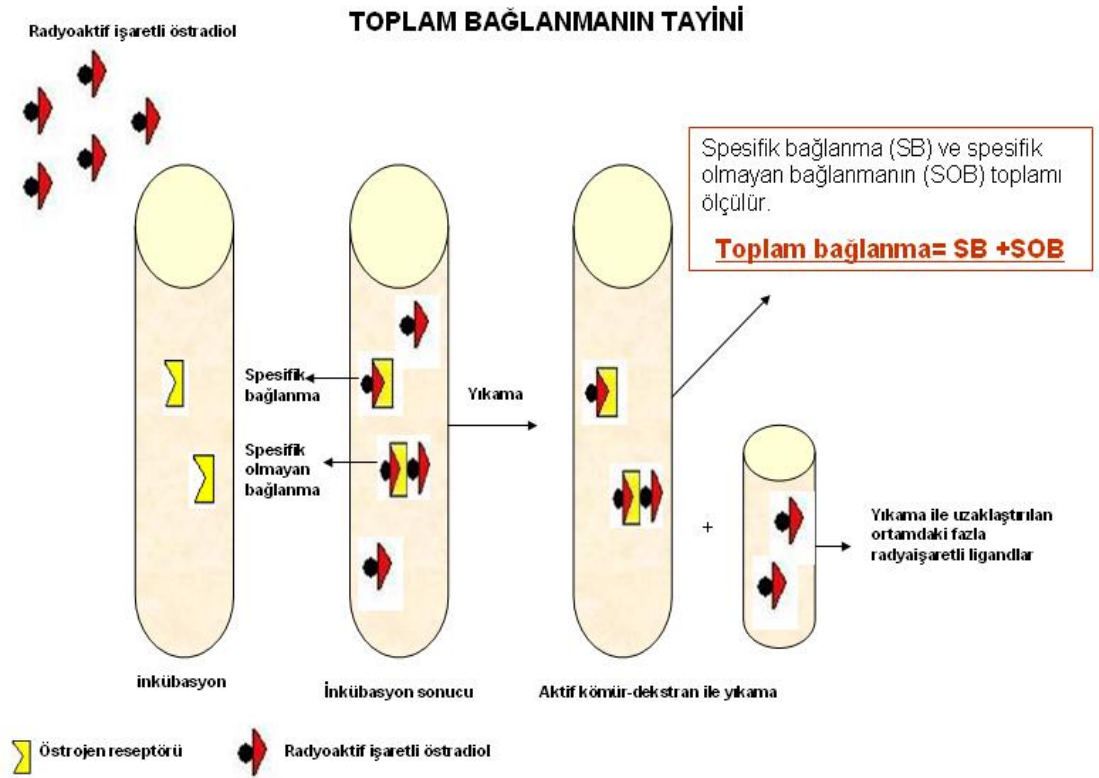
Ligand bağlanmasından sonra ER yapısında meydana gelen üç boyutlu yapı değişikliği de ER yapısı ve aktivitesinde üzerinde etkili olabilmektedir. Farklı ER modülatörleri üç boyutlu yapı değişikliğini indükleyebilirler Paige ve arkadaşları farklı biyolojik etkileri olan ER ligandları ile reseptörlerde üç boyutlu yapı değişikliği indüksiyonunu göstermişlerdir (64). ER konformasyonu ve biyolojik aktivitesi arasında yüksek korelasyon bulunmuştur. ER- α ve ER- β ’ya bağlandığı bilinen bileşiklerin meydana getirebileceği konformasyonel değişiklikler agonist ve antagonist özellikleri ile direkt olarak ilişkilidir (65,66). Reseptör bağlanma deneylerinin bir dezavantajı moleküllerin reseptöre bağlanma sonrasında neden olabileceği bu etkiler konusunda bilgi sağlamıyor oluşudur.

ER-Radyoligand Bağlanma Deneyleri

Klasik ligand-reseptör bağlama analizleri radyoaktif işaretli ligandlar (ör: trityum işaretli östradiol) aracılığıyla yapılmaktadır. İşaretli ligandlar spesifik reseptörlere bağlanır ve ligand kompleks oluştururlar. Spesifik bölge ile ilişkili olmayan ligandlar ise reseptörlere bağlanamaz. Fakat spesifik reseptör dışında dokuya adsorbsiyon gerçekleşebilmektedir. Bağlanma miktarının tayini hedef bölgedeki bağlanmanın ölçülmesi ile elde edilir. Bu iki aşamalı bir süreçtir. İlk olarak toplam bağlanma [Spesifik bağlanma (SB) + spesifik olmayan bağlanmanın (SOB)], ardından SOB ölçülür. İki ölçümün farkı ile SB elde edilir (Şekil I.15).

Radyo işaretli ligand-ER bağlanma testi reseptör kaynağı olarak ham protein ekstratlarının ve ER eksprese eden canlı hücrelerin kullanılabilmesi nedeniyle avantajlıdır.

Floresans işaretli yöntemlerde ise sağlıklı sonuçlar sadece saf ER varlığında sağlanır. Ham protein ekstratlarında arka planda yer alan bileşikler nedeniyle yüksek miktarda floresans ortaya çıktığından yanlış sonuçlar alınabilmektedir. Buna karşın floresans polarizasyonu yüzlerce bileşiğin yüksek hızda ER bağlanma tarama çalışmalarını uygun zaman/maliyet oranı ile mümkün kılmaktadır (63).



Şekil I.15. Radyoligand bağlanma deneylerinde toplam bağlanma ve spesifik olmayan bağlanmanın saptanmasının şematik gösterimi

Radyoligand bağlanma deneylerinin radyoaktif işaretli ligand maliyetleri, spesifik laboratuvar ihtiyacı, spesifik bağlanma dışında spesifik olmayan bağlanma da gerçekleştiğinden spesifik bağlanmanın tayini için ek bir deney düzeneğinin gereksinimi gibi dezavantajları nedeniyle alternatif bağlanma yöntemleri her geçen gün literatüre girmektedir.

ER- Floresans Ligand Bağlanma Deneyleri

Floresans ligand bağlanma deneylerinde bağlı ve serbest olduğu durumlarda farklı floresans özelliğe sahip izleyici ligand (kumestrol) kullanılmaktadır. Yöntem kumestrol ile ligandların ER'ye yarışmalı olarak bağlanma esasına dayanmaktadır. Kumestrol ER'ye iyi bağlanan, floresans özelliğe sahip doğal bir bileşiktir. Serbest halde iken 355 nm'de eksitasyonu takiben 435 nm'de ışığı emite edebilme özelliğine sahiptir. Östrojen reseptörüne bağlandığı durumda ise 355 nm'de eksitasyonu takiben emisyon dalga boyu 408 nm'e kayar. Aynı zamanda kumestrolün floresans şiddeti östrojen reseptörüne bağlandığında 4-10 katlık artış göstermektedir (169). Yarışan ligandlar varlığında floresans şiddetinin azalması ile ER'ye bağlanma potansiyelleri belirlenir. Birçok bileşiğin taranmasında floresans ligand bağlanma deneyleri hızlı, kolay ve düşük maliyetlidir.

b) ER- Promotör Bağlanma Testleri

Ligand ile ER'nün bağlanması gerçekleştiğinde, ER dimerlerinin hedef gende yer alan östrojen duyarlı elemana (ERE) promotör bölgeden bağlanması klasik ligand-ER sinyal yolağının ikinci basamağıdır. ER-promotör bağlanma testlerinde bağlanma radyo ya da floresans işaretli ER'nin ERE'e bağlanması ile ölçülmektedir.

ER- α ve ER- β 'nin ERE'lere bağlanma afinitesi farklıdır (67,68). Bu test E'nin ER'ye, ER'nin de ERE'ye bağlanması nedeniyle her üçlü kompleksin (E-ER-ERE) afinitelerindeki farklılıkları saptayamaması nedeniyle başarısız olmuştur (68, 69,70).

c) ER-Koaktivatör Bağlanma Testleri

ER'in promotöre bağlanması aktif transkripsiyonel kompleks üzerinde farklı sayıda koaktivatörün bulunmasına bağlı olduğundan, ligand-bağımlı konformasyonel değişikliğin belirlenmesine (protein-protein ilişkisine) dayalı bir yaklaşım öne sürülmüştür. En iyi değerlendirmelerden biri 'Glutasyon-S-Transferaz (GST) pulldown assay' olarak bilinen GST çöktürme testidir (71). Bu test GST'nin füzyon proteininin ER'ye bağlanmasına (GST-ER) dayanır. GST-ER füzyon proteini ER ligandı varlığında radyoişaretli koaktivatör ile inkübe edilir.

(d)Transaktivasyon Testleri ve Gen Ekspresyon Analizi

Ligand bağımlı ER aracılıklı gen aktivasyonu bir veya daha fazla raportör gen taşıyan ER cDNA'sının transfeksiyonu ile gerçekleşir (72,73,74). Transaktivasyon testleri endojen olarak ER içermeyen canlı hücrelerde plazmidler aracılığı ile (maya veya memeli hücrelerinde) gerçekleştirilir. Raportör gen indüksiyonu ortamdaki ER ligandlarının eklenmesi ile gerçekleşir ve doza bağımlı olarak indüksiyon ölçülebilir.

Transaktivasyon testleri çok yönlü testler olmasının yanı sıra oldukça hassas testlerdir. Zayıf ve güçlü östrojen/östrojen benzeri moleküllerin analizinde kullanılan bir yöntemdir. Yöntem saf moleküllerin, kompleks karışımların anti/östrojenisitelerinin değerlendirmesine olanak vermesinin yanı sıra aynı anda birçok bileşiğin ve kombinasyonlarının analizini yapabildiğinden, hızlı ve yüksek

çıkıtlı bir yöntemdir (74,75). Testin sınırlaması ise genotip olarak ER'dan yoksun hücrelerdeki yapay ER gen ekspresyonudur. Bu 'zorunlu indüksiyon' gerçek fizyolojik cevabı yansıtmıyor olabilir. Bu nedenle endojen aktiviteleri olan hücelere (insan meme kanseri hücresi MCF-7 gibi) ERE raportör gen yapısı transfekte edilerek çalışılabilir.

Endojen ER eksprese eden hücre hatlarında, ER eksprese eden hedef genler yapay raportör gen transfeksiyonu yapılmadan takip edilebilir. Bu yaklaşım ile herhangi bir ER ligandı ile muamele edilen hücre fizyolojik hücresel yanıtı en yakın cevabı meydana getirirken, farklı doku ve hücre hatlarının spesifik özelliklerinin ayrımlanmasına da olanak verir. Ayrıca kendi ER'lerine sahip hücrelerin kullanımı ile farklı ER ligandlarının farklı durumlardaki (tamoksifenin meme ve uterusu östrojenik aktivitesi ve kemikte antiöstrojenik aktivitesi gibi) aktiviteleri tespit edilebilmektedir.

(e)Biyokimyasal Testler

Gen ve protein ekspresyonunun analizi ve protein aktivitelerinin izlenmesi östrojenik/antiöstrojenik moleküllerin *in vitro* oluşturacağı final etkinin belirlenmesi amacıyla yapılmaktadır. Osteoblast ve endometrial (Ishikawa) hücrelerde alkalın fosfataz aktivitesi (76,77), prostat kanseri hücrelerinde PSA (prostat spesifik antijen) inhibisyonu, hücre proliferasyonunun belirlenmesi (78), steroid biyosentezi metabolizmasına dahil olan enzimlerin aktiviteleri ile etkileşim (ör: aromataz inhibisyonu) (79,80) gibi parametreleri inceleyen biyokimyasal testlerdir.

(f) E-screen Testi

Östrojenik/antiöstrojenik yanıtın ölçülmesinde en yaygın kullanılan *in vitro* testtir. Test edilen maddelerin artan konsantrasyonları ile muamele edilen

ER eksprese eden insan meme kanseri hücrelerinin hücre proliferasyonları izlenmektedir (81). Hücre proliferasyonu östrojenik/antiöstrojenik fizyolojik yanıtın değerlendirilmesinde güvenilir bir araçtır (82). E-screen testinin ana sınırlaması ise farklı ER'ler (ER- α ve ER- β) üzerindeki ayrımı yapamamasıdır. En büyük avantajı ise bileşiklerin agonist ve antagonist özellikleri hakkında bilgi verebilmesidir.

Tablo I.3. Östrojenik etkinin değerlendirilmesinde kullanılan *in vitro* testler (58)

<i>İN VİTRO</i> TEST	ÖLÇÜLEN VERİ	AVANTAJLAR	DEZAVANTAJLAR
Ligand-ER bağlanma	ER α ve ER β bağlanma afinitesi	Uygulaması kolay Yüksek hızlı tarama	ER aktivasyon verisi yok
ER-promotör bağlanma	Farklı ERE'lere ER α ve ER β bağlanma afinitesi	Uygulaması kolay Yüksek hızlı tarama	ER aktivasyon verisi yok
ER-koaktivatör bağlanma	Koaktivatör bağlanması	Moleküler etkileşimlerin ayrışması- Östrojenik/antiöstrojenik etkilerin ayrışması	ER aktivasyon verisi yok Yapay sistem
Transaktivasyon	ER α ve ER β aracılıklı raportör gen aktivasyonu	Kolay Yüksek çıktılı Östrojenik/antiöstrojenik etkilerin ayrışması	Yapay sistem
Gen ekspresyonu	ER α ve ER β 'yı regüle eden gen ve protein ekspresyonu	Fizyolojik veri Östrojenik/antiöstrojenik etkilerin ayrışması	Düşük veri çıktısı
Biyokimyasal	Steroidojenik enzimlerin aktivitesi & östrojen biyosentez analizi & hedef genlerin ER-bağımlı aktiviteleri	Fizyolojik veri Östrojenik/antiöstrojenik etkilerin ayrışması	Moleküler markör eksprese eden hücre hatları ile çalışılması
E-screen	ER bağımlı hücre proliferasyonu	Fizyolojik sonuç Östrojenik/antiöstrojenik etkilerin ayrışması	ER β bağımlı hücre proliferasyonunun gösterilememesi

Fitoöstrojenlerin anti/östrojenik aktivitesinin değerlendirilmesinde kullanılan *in vitro* testler **Tablo I.2'** de gösterilmiştir.

Bu testlerin çoğunda fitoöstrojenlerin östrojenik etkisi E2 veya DES'e göre rölatif olarak hesaplanmaktadır. Ligand-ER bağlanma, E-screen, transaktivasyon ve gen ekspresyonu testleri fitoöstrojenlerin östrojenik potansiyellerinin değerlendirilmesinde en uygun ve en çok kullanılan testlerdir (20). Farklı *in vitro* testlerde elde edilen fitoöstrojenlerin östrojenik potansiyelleri E2'e göre hesaplanır. Farklı testler arasında standardizasyon söz konusu değildir. Dolayısıyla östrojenik potansiyelin değerlendirilmesinde *in vitro* ve *in vivo* çalışmaların validasyonuna gereksinim vardır.

I.1.4.2. *In Vivo* Testler

In vivo östrojenik ve antiöstrojenik etkinin belirlenmesinde yaygın olarak fare ve sıçanlar kullanılmaktadır. Kemiriciler biyolojik araştırmalarda yaygın olarak kullanıldığından anatomi, fizyoloji, patoloji ve genetik özellikleri iyi bilinmektedir. Çoğalmalarının kolaylığı, kısa üreme süresi, canlı organizmanın gelişme sürecindeki (ütero, laktasyon, puberte öncesi ve sonrası, yetişkinlik) potansiyel etkilerinin incelenmesine olanak vermesinin yanı sıra ileri nesillerdeki etkilerin araştırılmasına da olanak vermektedir.

I.1.4.2.1. Üterotrofik Testler

Östrojenik ve antiöstrojenik etkinin araştırıldığı en yaygın kısa süreli test ER β agonist ve antagonistlerinin taranmasına uygun uterus/rahim büyüme testidir. Olgunlaşmamış veya yumurtalıkları çıkarılmış yetişkin dişi fare ve sıçanlar kullanılmaktadır (76, 83, 84). Test edilen bileşenler deri altından veya oral olarak 3-7 gün boyunca verilmektedir. Birincil biyogösterge uterus yaşı ağırlığıdır. Uterus ağırlığında artış test bileşeninin östrojenik aktiviteye sahip

olduğunu gösterirken, antiöstrojenik bileşikler uterus yaş ağırlığının azalmasına neden olacaktır. Testin hassasiyetini arttırmak için ek olarak uterustaki morfolojik ve biyokimyasal göstergeler protokole eklenebilir. Uterus epitelyal hücre kalınlığı, uterus bezi şekli, hücre proliferasyonu, sıçan uterus gen ekspresyonu, progesteron reseptörü, östrojenle indüklenen protein üretimi, uterus epitelyal hücrelerinde laktoferin üretimi gibi biyogöstergeler incelenebilir (84, 85, 86).

I.1.4.2.2. Hershberger Testi

Hershberger testi androjenik/antiandrojenik etkinin tarandığı kısa süreli *in vivo* bir testtir. Test protokolünün farklı varyasyonları bulunmaktadır. Genellikle test pubertal dönem öncesindeki kısırlaştırılmış erkek sıçanlara uygulanmaktadır (87, 88). Androjenik etkinin değerlendirilmesi için, test maddeleri kısırlaştırılmış ve testosteron ile muamele edilmiş hayvanlara oral veya deri altından 10 gün boyunca verilir (87, 89, 90). Deney sonunda androjen bağımlı salgı bezlerinin ağırlıkları ölçülür. Ölçülmesi zorunlu olan organ ağırlıkları ventral prostat, seminal veziküller, penis bezi, Cowper's bezi, levator ani ve bulbokavernus kaslarıdır. Bunlarla beraber isteğe bağlı olarak karaciğer, adrenal bezler, böbreklerin biyokimyasal göstergeleri ile serum lüteinize edici hormon ve testosteronun kan değerleri de ölçülebilir (91). Androjenik maddeler androjen bağımlı dokularda ağırlık artışına neden olurken, antiandrojenik maddeler ağırlık azalışına neden olmaktadır. Hershberger antiandrojen deneyinde kısırlaştırılmış erkek sıçanlara alternatif olarak, yeni süttten kesilmiş hayvanların testosteron stimülasyonu sağlanarak da çalışmalar yapılabilir (87).

I.1.6. KULLANILAN BİTKİSEL DİYET DESTEK ÜRÜNLERİ

Tez kapsamında çalışılan bitkisel gıda destek ürünleri (piyasada bulunan orijinal isimleri ile) sırasıyla;

- ***Astragalus* Root Extract,**
- **Black Cohosh Root Extract,**
- **Dong Quai,**
- **Grape Seed Extract,**
- **Green Tea Leaf Extract,**
- **Gotu Kola,**
- **Isoflavones,**
- **Saw Palmetto Berries,**
- ***Spirulina*,**
- **St. John's Wort,**
- ***Tribulus terrestris*,**
- **Valerian Root Extract'tır.**

Bu örneklerden Gotu Kola, Saw Palmetto Berries ve Spirulina doğrudan materyalin kendisi olup (bitkisel materyal veya alg) diğer örnekler bitkilerin ekstreleri şeklinde piyasada bulunmaktadır.

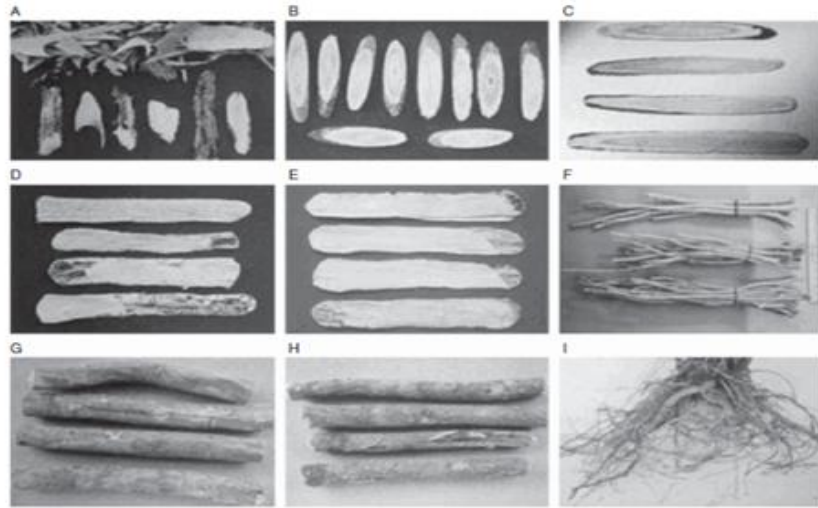
I.1.6.1. *Astragalus* Root Extract

Genel adı: *Astragalus* root

Bilimsel adı: *Astragalus membranaceus* ve *Astragalus mongholicus*

Botanik ailesi: *Fabaceae*

Astragalus kök ekstresi, *Astragalus membranaceus* ve *Astragalus mongholicus* bitkilerinin köklerinden elde edilmektedir (Şekil I.16 ve Şekil I.17). Geleneksel Çin tıbbında ve popüler bitkisel gıda destek ürünlerinin içeriğinde immün direnci artırıcı ve enerji üretimini destekleyici özelliklerinden dolayı yaygın olarak kullanılan önemli bitkilerden biridir.



Şekil I.16. Ameriakan pazarında yer alan farklı şekil ve kalitedeki *Astragalus* kökleri.

Kaynak: Photo courtesy of Roy Upton, Soquel, CA



Şekil I.17. *Astragalus* bitkisinin çiçekleri.

Kaynak: Photo courtesy of Bill Brevoort, American Herbal Pharmacopoeia

Geleneksel ve Modern Kullanımları

Astragalus'un Asya'da geleneksel kullanım amacı immün direnci arttırmaktır. Modern kullanım amacı ise karaciğer fonksiyonlarını, immün ve kardiyovasküler sistemi desteklemektir. İmmün direnci artırıcı etkisi nedeniyle soğuk algınlığı ve üst solunum yolları enfeksiyonlarını önlemede yaygın olarak kullanılmaktadır. Ayrıca çocukları enfeksiyöz hastalıklara karşı korumada etkili olduğu düşünülmektedir.

Astragalus'un batıda modern kullanım amacı ise immün sistemi düzenlemektir. *Astragalus* rekombinant interlökin-2'nin (rIL-2), rekombinant interferon-1 ve interferon-2'nin (rIFN-1 ve rIFN-2) immünterapi gücünü artırır. Terapötik eşiklerin düştüğü kemoterapi ve radyoterapi süresince veya immün yetmezlik durumlarında bütünleyici tedavi olarak önerilebilir.

Geleneksel Çin tıbbı ve modern tıpta, *Astragalus* tek başına nadir olarak kullanılırken, diğer bitkilerle kombinasyonu en çok yapılan bitkidir. *Astragalus*'un klasik kombinasyonları (*Astragalus* ve *Angelica sinensis*) ile sayısız çalışma mevcuttur (92).

Kimyasal Kompozisyonu

Astragalus'ta ilgi uyandıran başlıca bileşikler triterpenler, polisakkaritler ve flavanoidlerdir. Triterpen "astragalosid IV" Çin tıbbında *Astragalus* türleri için benzersiz bir markördür. Çeşitli hazırlama yöntemleri ile klinik çalışmalar için veya bitkisel destek ürünleri için bitkiler hazırlanır. Genellikle ham örnekler, polisakkaritleri izole edilen örnekler, triterpen saponinleri izole edilen örnekler çalışmalarda kullanılmaktadır. Polisakkaritler (12–36 kD) çoğunlukla immün aktivite ile ilişkilidirler. Triterpen saponinlerin büyük çoğunu ise kardiyovasküler ve hepatoprotektif etkiler ile ilişkilidirler. *Astragalus* polisakkaritleri D-glukoz,

D-galaktoz ve L-arabinoz veya D-glukoz karışımından oluşmaktadır. *Astragalus*'un başlıca flavanoidlerinden aktiviteleri rapor edilen bileşikler calycosin, formononetin, daidzein, isorhamnetin, kaempferol, quercetindir (93).

Çin'de ve ABD'de klinik olarak *Astragalus*'u uygulayan bazı araştırmacılar, çoğunlukla dekoksiyon (kaynatma) yapmışlardır. Geleneksel olarak *Astragalus* hazırlanışında genellikle pişirme süresi, pişirme ardından gelen koku ve tat benzer olsa da, çoğu tüketici ve uygulayıcı kişi ham bitki ekstresi (kapsül, tablet), soğutularak kurutulmuş granüller, sıvı ekstraler veya ham bitki tozu kullanmaktadır.

Yapılan Çalışmalar ve Tıbbi Etkileri

Astragalus ile ilgili çalışmaların büyük çoğunluğu immünstimülatör aktivitesi üzerine odaklanan çalışmalardır. Son zamanlarda potansiyel kardiyoprotektif etkileri de gösterilmektedir. Sınırlı sayıdaki klinik çalışmalar ve preklinik çalışmalardan elde edilen veriler *Astragalus*'un soğuk algınlığını önlemede ve kanser tedavilerinde yardımcı olarak kullanılabileceği yönündedir. Kardiyovasküler sisteme, faranjit, konjestif kalp yetmezliği ve miyokard infarktüsü gibi durumlarda yararlı olduğu yönünde kısıtlı sayıda da olsa veri bulunmaktadır. Hepatit ve diyabet tedavisinde destekleyici olduğu yönünde hayvan çalışmaları bulunmaktadır (92).

Sıçanlarla yapılan bir çalışmada, hayvanlara 50 gün boyunca düşük ve yüksek dozda (3.3 veya 10g/kg/gün) oral olarak *Astragalus* ekstraleleri verilmiştir. Bunun öncesinde hayvanlara doksorubisin intraperitoneal olarak verilmiştir. 5 hafta sonra son doksorubisin enjeksiyonu ile önemli ölçüde kardiyak diastolik disfonksiyon gelişmiştir. Bunun yanında asit uygulaması (karında su toplanması),

kalp ağırlığında artış ve mortalitede artış görülmüştür. *Astragalus* uygulaması ile doksorubisinin kardiyak fonksiyonlar ve asit ile ilgili advers etkileri azalmış ve en yüksek doz hayatta kalmayı sağlamıştır. *Astragalus*'un koruyucu etkisinin kardiyak SERCA2a mRNA ekspresyonu ile ilişkili olduğu düşünülmektedir (94).

İmmünmodülatör etkilerinin birçok prelinik çalışmada gösterilmesi ile *Astragalus* kanser tedavilerinde azımsanmayacak bir bitkidir. MD Anderson Cancer Center'da yapılan çalışmalarda *Astragalus* ekstresinden elde edilen polisakkarit fraksiyon immünosüpresif etkili olan siklofosfamid'in etkisini tersine çevirmiştir (95,96). *Astragalus*'un makrofaj fagositozunu (97) ve hematopoezi (98) stimüle ettiği bildirilmiştir.

Astragalus'un gastroprotektif etkileri üzerine yapılan bir çalışmada, gastrik kanser hücrelerine dönüşen insan peritonel mezotelyal hücreleri üzerinde koruyucu etkisi gösterilmiştir (99).

Toksisitesi

Yapılan bir derlemeye göre *Astragalus*'un mutajenik etkilerinin olmadığı belirtilmiştir. Farmakolojik ve toksikolojik literatürler göz önünde bulundurulduğunda laktasyon süresince *astragalus* kullanımı ile ilgili herhangi bir sınırlama bulunmamaktadır (100).

Yapılan çalışmalardan elde edilen verilere göre *Astragalus* geniş dozaj aralığında oldukça güvenli bir bitkidir. Flavanoidler, polisakkaritler ve triterpenler içeren fraksiyonları düşük toksisite göstermektedir (100-102).

I.1.6.2. Black Cohosh Root Extract (*Actaea racemosa*)

Genel adı: Black cohosh, karayılan otu, bugbane, rattleroot, squawroot, macrotys

Bilimsel adı: *Actaea racemosa* veya *Cimicifuga racemosa*

Botanik ailesi: *Ranunculaceae*

Bu bitki ilk olarak 1696 yılında Leonard Plukenet adlı İngiliz botanikçi tarafından tanımlanmıştır. Ardından Carl Linnaeus adlı İsveçli biyolog tarafından *Actaea racemosa* olarak sınıflandırılmıştır (103). Pursh daha sonra black cohoshu *Cimicifuga racemosa* olarak sınıflandırmış olsa da yapılan DNA analizleri black cohoshun *Actaea racemosa* sınıfına ait olduğunu göstermektedir (104).

Black cohosh geleneksel tıpta kullanılan, Kuzey Amerika'ya özgü bir bitkidir. Kök ve rizom (toprakaltı gövde) ekstreleri analjezik, sedatif ve anti-inflamatuar özellikleri nedeniyle kullanılmaktadır.

Geleneksel ve Modern Kullanımları

Kuzey Amerika'ya özgü bir bitki olan black cohosh (**Şekil I.18**); geleneksel olarak yerli Amerikan kabileleri tarafından jinekolojik şikâyetler, romatizmal ağrılar, ürtiker, kabızlık, soğuk algınlığı, öksürük, yorgunluk boğaz ağrısı ve yılan sokması gibi durumlarda yaygın olarak kullanılmıştır.



Şekil I.18. Black cohosh bitkisi

1680 yıllarında botanik literatüründe yer alan black cohosh, 1749 yılında Carl Linnaeus tarafından kadınlar için halsizlik ve ağrı kesici bir bitki olarak

tanımlanmıştır. Diyaforetik, ekspektoran etkilerinin yanı sıra, kardiyak kasları ve uterus kaslarını güçlendirici etkileri olduğu bildirilmiştir. Daha sonraki yıllarda black cohosh, güçlü bir sedatif olarak kullanılmıştır. Rahim, kalp ve dolaşım sisteminde bulunan kasları güçlendirici etkisinden dolayı doğum ve doğum sonrası ağrıları azaltmak için kullanılmıştır. Her türlü kas-iskelet sistemi ve sinirsel ağrıların tedavisinde yaygın olarak kullanılmıştır. Amerikan Farmakopesinde 1820 yılı ile 1920 yılı arasında batı ülkelerindeki en popüler bitkisel ilaç olarak listede yer almıştır (105).

Black cohosh günümüzde çoğunlukla premenstrual ve menstrual semptomların giderilmesinde kullanılmaktadır. Aynı zamanda hormon yerine koyma tedavilerine alternatif olarak da kullanılmaktadır.

Kimyasal Kompozisyonu

Black cohosh kök ve rizomları alkaloidler, fenolik bileşikler, organik asit, palmitik ve oleik asit, tanen, reçine, uçucu yağlar, flavonoidler ve terpenoid glikozitleri içermektedirler.

Black cohosh alkaloidler, fenolik bileşikler (ör: cimicifugic asit türevleri, fukinolic asit, ferulik asit, isoferulic asit, fukiic asit, kafeik asit), organik asit, palmitik ve oleik asit, tanen, reçine, uçucu yağlar, flavonoidler ve terpenoid glikozitleri (ör: actein, 23-epi-26-deoxyactein, 26-deoxyactein, 12-acetylactein, cimiracemoside A, cimiaceroside C, cimigenoside, cimicifugoside H-1, cimicifugoside M) içermektedir (106-109). Özellikle önemli konsantrasyonlarda triterpen glikozitleri ve kafeik asit türevleri bulunmaktadır.

60'tan fazla sikloartan iskeleti içeren triterpen glikozitleri *Actaea racemosa* kök ve rizomlarına özgü bileşiklerdir (110). 23-epi-26-deoxyactein kök ve rizomlardan yapılan ticari ürünlerin standardizasyonunda kullanılır (111).

Yapılan Çalışmalar ve Tıbbi Etkileri

Yapısal steroidlere benzer olan triterpenler geniş anlamda biyolojik aktivite gösterebildiklerinden farklı etkileri ile (ör: sitotoksik veya inhibitör) ilgili birçok çalışma bulunmaktadır (112, 113). Literatürde östrojenik bileşikleri içerebileceği düşünülen birçok çalışma olmasına rağmen etkiden sorumlu olabilecek bileşenler henüz aydınlatılamamıştır. Yapılan bir çalışmada black cohoshun bitki ve kök ekstraktlarının östrojenik etkisi bilinen formononetin (formononetin-7-glikozit) içermediği saptanmıştır (114).

Black cohosh kök ve rizomlarının toplam fenolik içeriğinin araştırıldığı bir başka çalışmada yaklaşık olarak % 0.62 oranında fenolik içerik saptanmıştır (115). 23-epi-26-deoxyactein ve aglikonlarının ER- β ya bağlanma aktivitesinin değerlendirildiği bir çalışmada bağlanma görülmemiştir (116). Fakat fukinolik asit ile yapılan bir çalışmada MCF-7 hücrelerinde östrojenik etki (referans östradiol 10^{-10} M) oranla %120 hücre proliferasyonu artışı) gösterilmiştir (117).

Çiçekli bitkilere özgü olan ferulik asit ile ilgili literatürde luteinize edici hormon (LH) salınımının inhibisyonu (118), folikül uyarıcı hormon (FSH) stimülasyonu (118), antiöstrojenik aktivite (119), ineklerde prolaktin stimülasyonu (120), farelerde prolaktin inhibisyonu (118), sıçanlarda antispasmodik etkinlik (121) görülmüştür.

Black cohosh'un menopozal ve diğer semptomlardaki etki mekanizması tutarlı olmayan klinik çalışmalar nedeniyle henüz aydınlatılamamıştır. Eski literatürün çoğunluğu direkt östrojenik etkiyi gösterse de, son öne sürülen hipotezler hipotalamus üzerine veya hipotalamus üzerinde etkili olan nörotransmitterlerin düzenlemesinde etkili olabileceğini öne sürmektedir.

Östrojen Reseptörüne Yarışmalı Bağlanma

Black cohoshun potansiyel endokrin aktivitesini kanıtlamak için birçok çalışma yapılmışsa da elde edilen sonuçların çoğu birbirini tutmamaktadır (122-125). Çalışmaların çoğunda öngörülen östrojenik aktivite gösterilememiştir. Örneğin, black cohosh'un metanol ekstresinin yüksek konsantrasyonlarındaki (200µg/ml) etkisinin incelendiği bir çalışmada ER'ne bağlanma görülmemiştir (123). Black cohosh-reseptör bağlanma çalışmalarında gözden kaçırılan bir faktör bulunmaktadır. Çalışmalarda çoğunlukla kullanılan lipofilik ekstreler tipik insan tüketimindeki hidroalkolik ekstrelerden farklı olmaktadır.

Reseptör Ekspresyonu

Lipofilik ve hidrofilik black cohosh ekstresi ile yapılan MCF-7 hücrelerinde lüsiferaz ekspresyonu incelendiğinde 35 µg/ml konsantrasyondaki lipofilik ekstrenin östrojen duyarlı genlerin aktivasyonunu sağladığı gözlenmiştir. Hidrofilik ekstrede ise aktivasyon görülemediği (126).

Plazma Hormon Düzeyleri

FSH ve LH serum düzeyleri üzerine black cohoshun etkisi geniş olarak incelenmiştir. Alkol ekstrelerinin overoktemize sıçanlarda FSH düzeyi üzerinde etkisi görülmemiştir (124). Yüksek dozlarda (140 ve 216 mg/rat) lipofilik ve hidrofilik ekstrelerin sıçanlara uygulandığı bir çalışmada hidrofilik ekstrede bir etki gözlenmezken lipofilik ekstrede LH süpresyonu oluşmuştur (124). Ayrıca black cohoshun hipofiz hücre hatlarında yapılan çalışmalarında prolaktin sekresyonu üzerine etkisi incelenmiştir. Bazal prolaktin ve tirotropin salgılatıcı hormonla stimüle edilmiş prolaktin düzeyleri önemli derecede düşmüştür. Bu etki hücre kültürlerine haloperidol (antagonist) eklenmesi ile tersine dönmüştür.

Dopaminerjik düzenlemede black cohoshun etkili olabileceği düşünülmektedir (127).

I.1.6.3. Dong Quai (*Angelica sinensis*)

Genel adı: Dong Quai (Chinese Angelica, Dang Gui, Tang Kuei, Tan Kue, Tanggwi, Toki)

Bilimsel adı: *Angelica sinensis* (Oliv.) Diels

Botanik ailesi *Apiaceae* (*Umbelliferae*)

Dong quai geleneksel Çin tıbbında binlerce yıldır özellikle jinekolojik şikâyetlerde (ör: ‘female ginseng’ olarak) kullanılan popüler bitkilerden biridir. 6.yüzyılda, Lei Gong’un *Treatise on Preparation of Materia Medica* adlı kitabında bitkisel kullanımı tanımlanmıştır. Dong quai dolaşımı arttıran, menstrual döngüyü düzenleyen, kalbi güçlendiren ve kabızlığı gideren bir tonik olarak tanımlanmıştır (128). Avrupa’da 1800’lü yılların sonlarında dong quai ekstresi (eumenol) menstrual kramp ve kanamalarda kullanımı popüler hale gelmiştir. Fakat jinekolojik hastalıklarda dong quai’nin etkinliğini destekleyen oldukça az sayıda klinik veri bulunmaktadır.



Şekil I.19. *Angelica sinensis* kökleri

Güzel kokulu, çok yıllık bir bitki olan Dong Quai iki metreye kadar büyümektedir. Soğuk iklimde zengin, iyi süzölmüş toprakta, nemli dağların eğimli kısımlarında yetişmektedir. Çoğunlukla Çin, Kore ve Japonya'da yetişmektedir. *Angelica sinensis*'in ticari üretimleri ise Gansu, Sichuan, Yunnan, Shaanxi, ve Hubei bölgelerinde yapılmaktadır. *Angelica sinensis* 3 yıl költvasyondan sonra biçilir, küflenme ve uçucu yağların buharlaşması önlemek amacıyla soğuk ve kuru kapalı kutularda depolanır.

Geleneksel olarak *Angelica sinensis* premenstural sendrom, menopoz, dismenore (sancılı adet görme) tedavisinde kullanılmaktadır. Dong quai diğer bitkilerle kombine edilerek de (ör: chamomile) kullanılmaktadır (128). Çin tıbbında kök yaygın olarak kullanılmaktadır. 10-25cm, grimsi, siyaha yakın kahverengi kök üç parçaya (baş, gövde, uç) ayrılır. Her parçanın farklı tıbbi özellikler taşıdığı düşünülmektedir. Bitkinin diğer geleneksel kullanımları ise hipertansiyon, kardiyovasküler hastalıklar (ör: Berger hastalığı, Raynaud hastalığı), baş ağrısı, sinir ağrıları, kronik rijitler, anksiyete, uykusuzluk, unutkanlık, kronik kabızlık, inflamasyon ve enfeksiyöz hastalıklardır (ör: herpes zoster, hepatit, kronik glomerulonefrit) (129,130). Günümüzde ABD ve Avrupa'da Dong quai başlıca şeker, dondurma, krema, likör ve vermut gibi birçok ticari ürün içerisinde aromitize edici olarak kullanılmaktadır.

Menopoz ile ilişkili vazomotor semptomlarda dong quai kullanımını destekleyen az sayıda klinik çalışma bulunmaktadır. Çift kör-placebo kontrollü 71 post menopoz dönemdeki kadın üzerinde yapılan bir çalışmada gruplara dong quai (4.5 g dong quai kökü, 0.5 mg ferulik asit/kg/gün) uygulanmıştır. Kupperman indeks skorları saptanmıştır (ateş basması sayısı, vajinal maturasyon indeksi, endometrial kalınlık), fakat önemli bir fark bulunamamıştır (131).

Kimyasal Kompozisyonu

Dong quai'nin potansiyel biyoaktif bileşenleri içinde ferulic asit ($C_{10}H_{10}O_4$), ligustilid ($C_{12}H_{14}O_2$), ve diğer alkilfitalid bileşikleri (ör: 6,7-dihidroksi ligustilid, senkyunolide A) bulunmaktadır (132). Dong quai ekstrelerinin ferulic asit içerikleri 0.2-1.4 mg/g oranları arasında ekstraksiyon yöntemindeki varyasyonlara bağlı olarak değişmektedir (133). Kapiller elektroforez ile dong quai'nin iki su-etanol ekstrelerinde ferulik asit konsantrasyonu 0.31mg/g ve 0.48 mg/g olarak bulunmuştur (134). Ferulik asit suda zayıf çözünen, zayıf organik asittir, dolayısıyla sulu ekstrelerinin majör bileşeni değildir. Ligustilid ve ferulik asit dışında, kurutulmuş dong quai köklerinin majör bileşenleri içerisinde *n*-bütildeneftalid, *n*-bütilfitalid, vanillin, linoleik asit, nikotinik asit ve süksinik asit bulunmaktadır Dong quai kökü ayrıca ferulik asit esterleri (koniferil ferulat) içermektedir (135). Dong quai'nin geleneksel olarak kullanımında kısmen bir standardizasyon söz konusudur. Bazı ticari ürünler %1 ligustilid veya 0.5 ppm ferulik asiti standart konsantrasyon olarak kullanırlar.

Dong quai ile yapılan *in vitro* çalışmalar dong quai'nin östrojen reseptörüne bağlanma özelliklerinin zayıf olduğunu ve mRNA progesteron reseptörünün düzenlenmesinde kısmen etkili olduğunu göstermektedir (136).

Toksisitesi

Ferulik asit ve ligustilid'in farmakokinetik özellikleri ile ilgili oldukça az sayıda veri bulunmaktadır. Bitkilerle ilgili çoğu yayında dong quai'nin içerdiği doğal kumarin bileşiklerinin potansiyel antitrombosit etkilerinden dolayı antikoagulant kullanan hastalarda kullanımı önerilmemektedir. Yapılan bir çalışmaya göre dong quai kullanımı ile warfarin kullanan hastalarda protrombin

zamanının değişimine neden olabilmektedir (137). Buna rağmen dong quai'nin hastalarda koagölasyon parametrelerine olan etkisi ve antikoagölantlar üzerine etkisini doğrulayan deneysel veriler oldukça sınırlıdır.

In vitro hayvan çalışmalar dong quai'nin bazı bileşenlerinin (ör: ferulik asit) tromboksan A formasyonunun inhibisyonu ve araşidonik asit metabolizması inhibisyonu dahil olmak üzere farklı mekanizmalarla trombosit agregasyonunu inhibe ettiğini destekler yöndedir (138).

Dong quai kullanımına bağlı insan toksisite çalışmaları oldukça az sayıdadır. Yapılan bir çalışmada 35 yaşındaki bir erkekte Dong quai haplarının 1 ay boyunca kullanımına bağlı olarak jinekomasti gelişimi görölmüştür (139). Plazma FSH, LH, E2, testosteron ve prolaktin konsantrasyonlarının normal düzeyde olduğu gözlenmiştir.

Dong quai kökü en az 100 bileşen içermektedir. Bu bileşenlerin ayrıştırılması oldukça karmaşık bir süreçtir ve çok boyutlu ayırım teknikleri gerektirir. Ferulik asit belirlemesi için HPLC ve kapiller elektroforez de kullanılan yöntemlerdendir (140). Dong quai ekstreleri ekstraksiyon işlemi sırasında ferulik asite dönüşen fenolik bileşikler içermektedirler (Ör: koniferil ferulat).

Dong quai ekstreleri için letal doz (LD₅₀) değerleri çeşitli çalışmalarda belirlenmiştir. Sıçanlarda dong quai ekstresi 100g/kg (141,142), farelerde dong quai %50 etanol ekstresi 40g/kg olarak (143), dong quai asitlerinin LD₅₀ değeri 1.05±0.49 g/kg (144) olarak saptanmıştır. Ferulic asitin farelerde LD₅₀ değeri 856.6 mg/kg (145), ligustilidin LD₅₀ değeri yaklaşık olarak 410 mg/kg saptanmıştır (146). Dong quai ile ilgili toksikoloji çalışmalarında uçucu

fraksiyonların enjeksiyonunun böbrek dejenerasyonuna yol açtığı bildirilmiştir (147).

I.1.6.4. Grape Seed Extract (*Vitis vinifera*)

Genel Adı: Grape Seed Extract, üzüm çekirdeği ekstresi

Bilimsel Adı: *Vitis vinifera*

Botanik Ailesi: *Vitaceae*

Grape seed extract içerisinde (GSE) üzüm (*Vitis vinifera*) çekirdeklerinden elde edilen kateşin monomerleri, prosiyanidin oligomerleri ve prosiyanidin polimerleri bulunmaktadır. Biyoaktif olan bu bileşenler indirgeyici ajanlar ve antioksidanlardır. Bileşenlerin bu özellikleri polifenolik yapıya sahip olmalarından kaynaklanmaktadır. Bu bileşenler *in vitro* çalışmalarda farmakolojik konsantrasyonlarda farklı biyolojik etkiler oluşturabilmekte ve hücre fonksiyonlarını, hücre aktivasyonunu, hücre sinyal transdüksiyonunu, endotelyal vazodilatasyonu, vazküler reaktivasyonu, inflamatuvar kaskadları, bağışıklık fonksiyonlarını, hücrel ve humoral bağışıklığı, hücre canlılığını, karsinogenezi etkilediği ve değiştirdiği görülebilmektedir. Son yapılan klinik araştırmalar GSE'nin kan basıncı, inflamasyon ve metabolik sendrom gibi durumlarda yararlarını ortaya koymanın yanı sıra, Alzheimer hastalığına karşı koruma gibi yeni alanlarda da yararlı olabileceğini öne sürmektedir (148).

Kimyasal Kompozisyonu

GSE değişen oranlarda monomerler, oligomerler, kateşin ve flavan-3-ol polimerlerini içerir. Üzüm çekirdeği içinde bulunan polifenollerin yüzdesi üzüm çeşidine bağlı olmakla beraber genellikle toplam çekirdek ağırlığının %4'ünün biraz üzerindedir. Üzümün etli kısmı yaklaşık olarak %10'u ekstre edilebilir

fenolik bileşen içermektedir. Çekirdekler 2/3'üne sahipken, üzüm küspesi ise 1/3 oranında fenolik bileşene sahiptir (149). Üzüm çekirdeğinin fenolik kısmını oluşturan bileşenler monomerik flavan-3-oller olarak belirlenmiştir. Flavanoid yapıdaki bu bileşikler (ör: epikateşin, epikateşin-3-gallat) genel olarak kateşin olarak tanımlanmaktadır. Flavan-3-ol molekülleri üzüm çekirdeğinde geniş dağılım göstermektedir. Zincir uzantılarının birleşmesi ile prosiyanidin adı verilen polimerler oluşmaktadır.

Yapılan Çalışmalar ve Tıbbi Etkileri

GSE prosiyanidinlerinin antioksidan ve serbest radikal süpürücü etkileri GSE'nin bazı biyolojik etkilerini açıklayabilmektedir. Etkileri arasında endotelial nitrik oksit sentaz enziminin regülasyonu, hücre aktivasyonunun modülasyonu, hücrel protein fosforilasyonu, hücrel sinyaller ve matriks proteazları ile etkileşim vb. bulunmaktadır.

Kanser Üzerine Etkileri

Hayvan deneyleri GSE'nin karsinogenezin başlaması ve artışı ile ilişkili olduğunu göstermektedir. GSE prostat ve diğer kanser hücreleri ile yapılan *in vitro* çalışmalarda antiproliferatif, apoptosisi başlatıcı ve sitotoksik etkiler göstermektedir (148).

Alzheimer Hastalığı

GSE'den elde edilen polifenollerin amiloid beta (Abeta) agregasyonunu inhibe ettiği, Abeta üretimini azalttığı, Abeta nörotoksisitesine karşı koruduğu *in vitro* çalışmalarda gösterilmiştir. Polifenol içeriğince zengin olan GSE'nin Alzheimer hastalığı oluşturulan fare modelinde terapötik etkileri bulunmuştur. Alzheimer oluşturulan fare GSE ile beslenmiştir ve beyinde oluşan amiloid plakları ve mikrogliosis %49-70 oranında azaldığı gözlenmiştir (149).

Metabolizma, Böbrek ve Kardiyovasküler Sistem Üzerine Etkileri

Koroner arter hastalığında düşük yoğunluklu lipoprotein (LDL) değişikliklerine karşı antioksidan koruma birincil mekanizma olmayabilir. Çalışmaları GSE kateşin ve prosiyanidinlerinin fare ve insanlarda proteinlere bağlandığını göstermiştir. Sıçanlarda yapılan bir çalışmada GSE prosiyanidinleri intestinal kolesterol absorpsiyonunu azaltma, safra asidini artırma gibi antihiperkolesterolemik etkiler göstermiştir (150). Prosiyanidinlerin böbrek fonksiyonlarını korumada da etkili olduğu gözlenmiştir. Sıçanlarda gliserol ile deneysel olarak oluşturulmuş böbrek yetmezliği GSE prosiyanidinleri ile geri döndürülmüştür (151).

Saç Uzaması Üzerine Etkileri

GSE prosiyanidin dimerleri ve trimerlerinin topikal uygulamada monomerlere nazaran yüksek oranda saç uzamasını arttırdığı görülmüştür. Epikateşin dimeri olan prosiyanidin B2 saç epitelyum hücrelerinde kontrole göre %300 oranında büyümeyi desteklemiştir. Epikateşin trimeri olan prosiyanidin C1, prosiyanidin B2'den sonra büyümeyi destekleyici (kontrole göre %200) ikinci etkin bileşik olarak gösterilmiştir (152).

Hepatoprotektif, Doku Koruyucu ve Premenstural Etkileri

GSE'nin hepatoprotektif etkilerine ilgi her geçen gün artmaktadır. Sıçanlarda yapılan bir çalışmada OPC'lerin (Oligomeric ProanthoCyanidin) sitokrom P450 1A1 ve diğer indüklenabilir p450 izozimlerinin aktivitelerini azalttığı, reaktif ara metabolitlerin detoksifikasyonunda yer alan faz II enzimlerinin aktivitesini ise arttırdığı görülmüştür. Dolayısıyla GSE'nin reaktif ara metabolitlerin olası toksisitelerine koruyucu olduğu düşünülmektedir (153).

Hepatotoksisite, pulmoner toksisite, kardiyotoksisite, nefrotoksisite, dalak toksisitesi ve nörotoksisiteye neden olan ajanlara karşı GSE verilen farelerde (7-10 gün boyunca oral olarak) bu etkenlerden dolayı ortaya çıkan çeşitli dokulardaki DNA hasarı önemli ölçüde azalmıştır (154).

Toksisitesi

GSE'nin doğrudan kullanımıyla ilgili önemli derecede sağlığa yönelik tehdit belirtilmemiştir. Yapılan oral toksisite ve mutajenisite çalışmalarında toksisite görülmemiştir (155).

I.1.6.5. Green Tea Leaf Extract (*Camellia sinensis*)

Genel Adı: Green Tea Leaf Extract, yeşil çay ekstresi

Bilimsel Adı: *Camellia sinensis*

Botanik Ailesi: *Theaceae*

Çay, sudan sonra dünya çapında popülaritesi olan ikinci içecektir. Üretim şekilleri ve kimyasal kompozisyonlarına göre; yeşil çay, oolong ve siyah çay, temel çay tipleridir. İnsanlarda, hayvan modellerinde ve hücre hatlarında yapılan birçok çalışma; potansiyel çay tüketiminin kanser ve kalp hastalıklarının önlenmesine katkı sağladığını göstermiştir. Geniş ölçüde yapılan birçok çalışma, hastalık dönemlerini önlemede ve tedavide; Epigallocateşin-3-gallat (EGCG) ve ilgili kateşinler gibi polifenolik bağların sağlığa katkı sağladığını belirtilmiştir. Yeni çalışmalara göre yeşil çay polifenolleri kalp rahatsızlıklarını, nörodejeneratif bozuklukları, obezite, diyabet ve kanser oluşumunu önlediği şeklindedir. Özellikle yapılan birçok çalışmada en büyük dikkat kanserin önlenmesi hususundadır. Bu etkinin oluşmasında önemli olan kateşinlerin biyoyumumluluğu ve biyotransformasyonudur.

Genel olarak çay  tipe ayrılır: yeşil (fermente edilmemiş), oolong (yarı fermente edilmiş) ve siyah (fermente edilmiş). Yeşil ay ve oolong çay daha çok Çin, Japonya, Kore ve bazı Afrika lkelerinde popülerdir, oysa siyah ay Hindistan ve batı ülkelerinde tercih edilir. Deneysel ve epidemiyolojik çalışmalar çay tüketiminin kardiyovasküler hastalıklar ve kanser riskini azalttığını belirtmişlerdir (156).

Bu etkilerden polifenol bileşiklerin sorumlu olduğu düşünülmüştür. Kateşinler yeşil çay içindeki en çok bulunan polifenollerdir. Tipik bir fincan demlenmiş yeşil çay, %30-40 net ağırlığında kateşinlerden EGCG, Epigallokateşin (EGC), epikateşin-3-gallat (ECG) ve epikateşin (EC) içermektedir. Yeşil ve oolong çaylar tipik olarak bir fincanda (237 ml) 30 ila 130 mg EGCG içerir, oysa bu miktar siyah ayda fincan başına 70 mg EGCG'dır. Siyah ay içerisindeki theaflavinler ve thearubiginler gibi temel pigmentler, kateşinlerin fermentasyonu sırasında oksidasyon ve polimerizasyon ile oluşurlar.

Kardiyovasküler Hastalıklar

İnsan ve hayvan çalışmaları çayın kalp koruyucu etkisini göstermişlerdir. ay polifenollerinin, ateroskleroz biyogstergeleri, hipertansiyon ve damar fonksiyonları üzerine olumlu etki ettiğini göstermektedir. Örneğin, Bursill ve ark. yaptığı çalışmada yüksek kolesterol diyet ile beslenen Yeni Zellanda beyaz tavşanlarına ek olarak verilen % 0.5-2 kateşin toplam plazma kolesterolü ve düşük yoğunluklu plazma lipoproteininin (LDL) azaldığını rapor etmişlerdir. Bir diğer çalışmada, Yeni Zelanda tavşanlarında % 0.3 değerindeki yeşil çay tüketiminin aort doku aterosklerotik bozulmalarını azalttığını gösterilmiştir. Siyah ayın ek

bir etkisi yoktur. Farelerde iki haftalık beslenmeye ek yeşil çayın angiotensin-2'nin hipertansiyon ve kalp hipertrofisi etkisinin azalttığı gösterilmiştir. Ayrıca yapılan bazı deneyler yeşil çay ve bileşenlerinin özellikle de ECGC'nin parkinson hastalığının gelişimini durdurduğunu göstermiştir. Yeşil çayın koruyucu etkisini destekleyen farelerle yapılmış çalışmaları da bulunmaktadır (156).

Obezite ve diabet

Birçok hayvan modelleme çalışmalarında çay polifenollerinin obezite ve diyabet engelleyici etkileri gösterilmiştir. Obezite ve diyabetin engelleyici etki mekanizmalarının belirsiz olmasına rağmen hem *in vitro* hem *in vivo* çalışmalar çay ve çay polifenollerinin bağırsaktaki lipid yağ salınımını azalttığı, yağ oksitlenmesini ve glikoz kullanımını arttırdığını göstermektedir (156).

Kanser

Çay polifenoller ve kafein, çayın önemli kanser önleyici bileşenlerindendir. Yapılan bir çalışmada yeşil çay polifenol karışımın akciğer tümörü bulunan farede önemli boyutta ciğer adenokarsinom ilerleyişini düşürdüğünü göstermektedir (156).

Hepatotoksisite

Yeşil çay içeren karışımların kemirgen ve köpeklerde kullanıldığı laboratuvar çalışmalarında, bu karışımların yüksek dozlarının potansiyel zehirlenmeyi desteklediği görülmüştür. Doza dayalı zehirlenme ve ölüm gözlenmiştir. 13 hafta boyunca %91,8'lik ECGC içeren yeşil çay ekstresi verilen çalışmada köpeklerde zehirlenme ve ölüm görülürken, sıçanlarda aynı ekstre %80 oranında ölümle sonuçlanmıştır. Bu bulgular yeşil çay ekstralarının kullanımında

dikkatli olunmasını ve güvenli üst eşiğe karar verilmesinin gerekli olduğunu göstermektedir (156).

I.1.6.6. Gotu Kola (*Centella asiatica*)

Genel Adı: Gotu Kola, Mandukaparni

Bilimsel Adı: *Centella asiatica*

Botanik Ailesi: *Apiaceae*

Hindistan'da, bitki genellikle 'Mandukaparni' olarak bilinir. Srilanka ve Endonezya'da da 'Thankuni Sak' adı verilir. Klasik Hint Ayurveda Literatürde 'Rasayana' (rejuvenator-geçleştirici) ilaçlardan biri olarak kabul edilir. Çoğu geleneksel fitoterapötik ajanlarda olduğu gibi *C. Asiatica*'nın da geniş farmakolojik etkileri olduğu düşünülmektedir. Yara iyileşmesi, ruhsal bozukluklar, damar sertliği, mantar, antibakteriyel, antioksidan ve antikanser amaçlar için kullanılmaktadır. Çok sayıda klinik çalışma *C. asiatica* preparatlarının ülser önleyici, sedatif ve antidepresif etkilerini doğruladığı gibi venöz yetmezlik ve mikroanjyopati geliştirdiğini göstermektedir. Bitkinin farklı bölgelerinden triterpenoid asitler, uçucu yağlar, alkaloidler, glikozitler, flavonoidler, steroidler izole edilmiştir (157).

Kimyasal Kompozisyonu

C. Asiatica bitki ve bitki ekstresi aktif bileşen olarak Asiatikosid'i içermektedir. Asiatikosid'in trisakkarit kısmı asiatik asit aglikonuna bağlıdır. *C.asiatica*'dan izole edilen diğer bir bileşik ise madekasol'dür. Triterpen saponinler ve sapogeninlerin yara iyileşmesi ve vasküler etkilerden sorumlu olduğu düşünülmektedir. Brahmoside ve brahminoside ise *C. Asiatica*' dan izole edilen diğer bileşenlerdendir. Ham bitki ekstresinde bulunan isothankuniside ve

thankuniside farelerde anti fertilite etki göstermiştir. Centellosid ve türevlerinin venöz hipertansiyon tedavisinde etkili olduğu bulunmuştur. Bunun yanı sıra toplam bitki ekstresi farmakolojik aktiviteleri bilinmeyen bitki steroller, flavanoidler ve diğer bileşenleri içermektedir. Bu tıbbi bitkinin uçucu yağ analizlerinde 11 monoterpenoid hidrokarbon, dokuz oksijenli monoterpenoid, 14 seskiterpenoid hidrokarbon, beş oksijenli seskiterpenoid ve seskiterpenoid bisülfür saptanmıştır. Birçok çalışma asiatic asit, asiaticozid, sentelosid ve madecassozid triterpenoidleri üzerinde yoğunlaşmıştır (157,158).

Asiaticozid anksiyolitik, anti-inflamatuar, antioksidan, antiülser ve yara iyileştirici özellikler göstermektedir. Asiaticozid ve madecassoside artrit tedavisinde etkili olabileceği düşünülmektedir. Ayrıca asiatic asit sıçanlarda yapılan çalışmalarda farklı kanser hücrelerinde apoptozisi indüklemektedir.

Mohandas Rao ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada sıçanlara 4 ile 6 hafta boyunca 4 ve 6 ml/kg vücut ağırlığında olacak şekilde taze *Centella asiatica* yaprak ekstresi uygulanmıştır. Apikal ve bazal dendritlerde ve dendritik dallanma noktalarında önemli ölçüde artış görülmüştür. Dolayısıyla *Centella asiatica* da bulunan aktif bileşenlerin dendritik büyümeyi stimüle edici özellikleri olduğu düşünülmektedir.

Aynı zamanda *Centella asiatica* beyinde bölgesel lipid peroksidasyon (LPO) ve protein karbonil (PCO) düzeylerini azaltmada etkili olduğu bildirilmiştir. Oral olarak alınan *Centella asiatica* sinir rejenerasyonu hızlandırmada etkili olduğu ve *in vitro* olarak sinir hücresi aksonlarında uzama sağlayan birden fazla aktif fraksiyon içerdiği rapor edilmiştir. Aksonal rejenerasyon fonksiyonel iyileşme açısından oldukça önemlidir. *Centella*

asiatica etanol ekstresi sinir büyüme faktörlerinin varlığında insan hücrelerinde sinir hücrelerinde belirgin bir artış göstermiştir (157, 158).

I.1.6.7. Isoflavones

İzoflavonların diyetteki temel kaynakları soya fasulyesi ve soya bazlı besinlerdir. Literatür baklagiller, meyve ve sebzelerin izoflavon içerdikleri bildiren pek çok çalışma ile doludur. Bu ifadeler teknik olarak doğru olmakla birlikte bu gıdaların çoğunda miktarı kesinlikle fizyolojik düzeylerden uzak olacak şekilde küçük olduğundan, onlar istemeden yanıltıcı durumlar söz konusu ortaya çıkmaktadır (159).

Son 20 yılda, izoflavonların sağlıkla ilgili etkileri üzerine birçok çalışma yapılmıştır. Yaklaşık olarak her yıl 1000 hakemli bildiri yapılması bu konu üzerine ne kadar önem verildiğinin göstergesidir. Araştırma hacminin yüksek olması bulguları doğru yorumlama ve sentezleme aşamasında zorlu bir görev sunmaktadır. Çeşitli deneysel tasarımlar, belirgin bir şekilde farklı izoflavon dozları, kimyasal bileşimleri ve izoflavon profiller ve sağlık durumları (sağlıklı, riskli) parametrelerde önemli farklılıklar göstermekte ve deneysel bulguları karmaşık hale getirmektedir. Deneysel tasarımlardaki bu ve benzeri farklılıklar bilimsel literatürün yorumlanmasını zorlaştırmaktadır. İzoflavonlar her zaman soya fasulyesinde önemli miktarlarda bulunmaktadırlar. Başlıca fonksiyonları toprakta bulunan *Rhizobium* familyasına ait bakterilerin nodulasyon genlerinin stimüle etmektir. Böylece amonyak ile atmosferik azotun azaltılması sağlandığı gibi, soya büyümesi için gerekli olan için azot için kaynak oluşturulmuş olmaktadır (159).

Toplamda 12 farklı soya izoflavon izomeri vardır. Bunlardan bazıları: 3 aglikon: genistein(4,5,7-trihidroksiizoflavon), daidzein (4,7-dihidroksiizoflavon),

glikozitler: glycitein (7,4-dihidroksi-6-metoksiizoflavon) ve glikozitleri genistin, daidzin, glycitin; malonik asit ve asetik asitle esterlenmiş glikozitler şeklindedir (159).

I.1.6.8. Saw Palmetto Berries (*Serenoa repens*)

Genel Adı: Saw Palmetto, American Dwarf, Palm Tree, Sabal

Bilimsel Adı: *Serenoa repens* (Bartram) J.K. Small

Botanik Ailesi: *Arecaceae* (Palmae, palm)

Saw Palmetto meyve ekstreleri çoğunlukla prostat hiperplazisi ve üriner sistem semptomlarının giderilmesi için tüketilmektedir. *Serenoa repens* (W.Bartram, Arecaceae, aynı zamanda Palmaceae, Palmae olarak da bilinir) genellikle Saw palmetto olarak bilinir.

Palmiye şeklindeki dalları genellikle 3 metreye kadar ulaşabilmektedir. Yaprakları sarı-yeşil gümüş yeşiline dönük renklidir. Saplarının yüzeyinde testere yüzeyine benzer dişler bulunmaktadır. Küçük, hoş kokulu çiçekleri beyaz/kremsi renktedir. Tek tohum veren etli meyveler olgunlaştıktan sonra yeşilden turuncuya, maviye ve siyaha dönüşmektedir (160).



Şekil I.20. Saw palmetto bitkisinin yaprakları



Şekil I.21. Saw palmetto bitkisinin meyveleri

Geleneksel ve Modern Kullanımı

Serenoa repens ekstresinin geleneksel kullanımları içerisinde göğüs büyütme, cinsel istek geliştirilmesi, diürez ve sistit tedavisinde kullanır. Prostat hipertrofisi ile ilişkili semptomlarda da alternatif tedavi olarak *Pygeum africanum* Hook.f. (Afrika erik ağacı), *Hypoxis rooperi* T. Moore (Afrika yıldız otu), çavdar ve ot polenleri ile birlikte kullanılmaktadır.

Saw palmetto'nun günümüzdeki birincil olarak benign prostat hiperplazisi ile ilişkili üriner semptomların kısa süreli tedavisinde kullanılmaktadır.

Kimyasal Kompozisyonu

Saw Palmetto meyvelerinin alkol ekstralarında rutin, isoquersitrin, kamferol-3-O-glikosid flavonoidleri, apigenin-7-O-ramnoglikozid ve antranilik asit bulunduğu bildirilmiştir. Sulu ekstralardan elde edilen polisakkarid fraksiyonlar anti-enflamatuar ve immünmodülatör aktiviteler göstermiştir. Saw palmetto'da bulunan bazı polisakkaritlerin içerisinde galaktoz, arabinoz, ksiloz, mannoz, ramnoz, glikoz ve glukuronik asit bulunmaktadır.

Piyasada bulunan saw palmetto preparatları kapsül, jel kapsül veya tablet şeklinde 160 mg ile 585 mg oranlarında değişen miktarlarda tek başlarına bulunabildikleri gibi çinko, kabak çekirdeği yağı özü, ginseng, arı poleni,

piridoksin, amino asit gibi diğer maddelerle birlikte karışım halinde de bulunabilmektedirler (160).

I.1.6.9. *Spirulina*

Genel Adı: *Spirulina*

Bilimsel Adı: *Spirulina maxima*, *Arthrospira platensis*, *Spirulina platensis*

Botanik Ailesi: *Lichinaceae*

Doğal olarak var olan mavi-yeşil algler yüzyıllar boyunca besleyici özellikleri nedeni ile hasat edilmiş ve tüketilmiştir. Batı toplumları, yaklaşık 30 yıldır, özellikle *Spirulina (Arthrospira) platensis* ve *Spirulina maxima* olmak üzere bazı tatlı su mavi-yeşil alg (siyanobakteriler) türlerini bir besin kaynağı olarak kabul etmişlerdir.

Geleneksel ve Modern Kullanımları

Mavi-yeşil algler enerji artırımı, zihinsel gelişim, odaklanma artışı, çocuklarda dikkat eksikliğinin giderilmesi, sindirimin geliştirilmesi amacıyla kullanılmaktadırlar. Geçtiğimiz on yıl içerisinde, tüketici ifadelerine bağlı olarak, çalışmalar sadece beslenme etkinliğini doğrulamak amacıyla yapılmasının yanı sıra aynı zamanda potansiyel farmasötik yararlarını belirlemek amacıyla yapılmıştır.

Kimyasal Kompozisyonu

Yenilebilir mavi-yeşil algler besin içeriğince yoğundur; amino asitler, çinko, selenyum gibi mineralleri yüksek miktarda içerirler. Besin ve vitamin içeriğinin yanı sıra antioksidan özellikler üzerinde hasat şekli, kontaminantların varlığı, uygun işleme ve saklama koşulları ve habitat gibi faktörlerin etkili olduğu bildirilmiştir. Bununla beraber mavi-yeşil algler ham halde karotenoidler, klorofil, fikosiyaninler, fitosteroller, glikolipitler, γ -linolenik asit ve diğer

biyoaktif bileşenleri içerir. *Spirulina* ağırlıkça %60-%70 oranında birçok vitamin ve protein (özellikle B12 vitamini, β -karoten, demir, γ -linolenik asit gibi) içermektedir (161,162).

I.1.6.10. St. John's Wort (*Hypericum perforatum*)

Genel Adı: St. John's Wort, sarı kantaron.

Bilimsel Adı: *Hypericum perforatum* L.

Botanik Ailesi: *Clusiaceae*

Hypericum perforatum L. ilk defa 1753 yılında Carolus Linnaeus tarafından tanımlanmıştır. Tıbbi bir bitki olarak nevralji ve küçük deri lezyonlarını tedavi etmek için yüzyıllar boyunca kullanılmıştır (163). Ortaçağ boyunca Dioscorides siyatik ve cilt yaraları tedavisi için St. John's Wort'u önermiştir. Avrupa'da ise bitki 20. yüzyılın ortalarında ticari olarak bulunmaya başladı. 1984 yılında, Alman Komisyonu E Monografi'nda psikojenik bozukluk, depresif durumlar, anksiyete ve /veya sinir eksitasyonu gibi durumlarda *Hypericum* kullanılmasını önerilmiştir (164).

Geleneksel ve Modern Kullanımları

St. John's Wort ekstresi *Hypericum perforatum* L. bitkisinin yapraklarından ve çiçekli üst kısımlarından meydana gelmektedir. *Hypericum* geleneksel olarak depresyon, uykusuzluk, yaralar, nevralji, doku romatizması, siyatik, gut, gastrit, romatizma, bronşit, hipotiroidizm, anksiyete tedavisinde kullanılmaktadır (165). Topikal olarak ise bu bitki, yanıklar, sıyrıklar, hemoroid, vezikül ve böcek sokmasında astrenjan olarak kullanılmaktadır (166).

Hypericum perforatum'dan elde edilen ekstre ve yağlar bazı kozmetik formülasyonlar içinde yaklaşık olarak % 0.01-0.5 oranında hiperisin yer almaktadır (167).

Ticari olarak bitkisel formülasyonları çay, tentür, tablet ve yaklaşık 300 mg hiperisin içeren kapsüller şeklinde bulunmaktadır. *Hypericum* ekstresi depresyon tedavisi için popüler bir alternatif tedavidir.

Hypericum ekstresinin depresyon tedavisinde etkinliği konusunda yapılan klinik çalışmaların değerlendirilmesi metodolojik eksiklikler nedeniyle karmaşık hale gelmiştir. Depresyon için objektif tanı kriterlerinin bulunmaması, antidepresanlar ile karşılaştırılan subklinik dozlar, yüksek plasebo cevap oranları ve advers ilaç reaksiyonlarının sınırlı analizi bu eksiklikler arasında sayılabilir (168). *Hypericum* ekstrelerinin klinik etkinliğini değerlendiren meta analizleri bu bitkinin hafif ve orta şiddet depresyonda plaseboda daha etkin, bazı trisiklik antidepresanların düşük dozları ile benzer etkili olduğunu göstermektedir (169). Bununla beraber büyük ölçekli, çok merkezli plasebo kontrollü denemelerde majör depresyon hastalarında St John's Wort kullanımının plaseboda anlamlı bir fark göstermediği saptanmıştır (170).

Kimyasal Kompozisyonu

Hypericum perforatum değişen konsantrasyonlarda olmak üzere en az on farklı gruptan biyolojik aktif madde içermektedir. Bu maddelerin konsantrasyonları ekstraksiyon işlemine, bitkinin yetiştiği yer ve çevre şartları gibi faktörlere bağlı olarak değişmektedir (163) Biyolojik olarak aktif bileşenler bitki ekstresinin yaklaşık % 15- 20 si kadardır (171). Bu bileşiklerin başlıcaları; fenipropanlar (klorojenik asit, *p*-kumarik asit),flavanol glikozitleri (kuersetin, hiperin, rutin, izokuersetin, kersitrin, lüteolin, kamferol, mirisetin), biflavonlar (biapigenin, amentoflavon), taninler, proantosiyanidinler (prosiyanidin B2, kateşin, epikateşin), ksantonlar (mangiferin, kielkorin, 1,3,6,7tetrahidroksiksanton), floroglusinoller (hiperforin, adhiperforin,

hidroperoksiadforin), esansiyel yağlar (α -pinen, β -pinen, mirsen, limonen), aminoasitler, γ -aminobütirik asit, naftodiantronlardır (hiperisin, psödohiperisin, siklopsödohiperisin).

St. John's Wort *Hypericum perforatum* çiçek ve tomurcuklarının etanol veya metanol ekstralarının havada kurutulmuş halidir. Çiçeklenme döneminde veya öncesinde çiçek ve tomurcuklar toplanır. ABD'de St. John's Wort kompozisyonu etiket üzerinde bildirilen markör bileşiklere benzerdir. St John's Wort üretiminde seriler arasında etken madde (hiperisin, psödohiperisin) içerikleri bakımından önemli farklılıklar bulunmaktadır (172). *Hypericum perforatum*'un piyasada bulunan sekiz kuru ekstresi ile yapılan bir çalışmada major bileşen içerikleri sırasıyla: hiperisin %0.19- %3; hiperforin %1.3-%3.9; flavanoidlerden rutin %4.8-11.4 değerleri arasında belirlenmiştir (173). Diğer bileşenler ise suda çözünebilen şekerler, sitrik asit, malik asit ve tanendir. Bitkinin çiçeklenen kısmı naftodiantronları içerir. Bitkinin toprak üstü kısımlarında çok sayıda flavonoid bileşik (hiperosit, kamferol, lüteolin, izokersitrin, kersitrin, mirisetin, kersetin) mevcuttur. Ekstre içerisindeki naftodiantron bileşiklerinin tamamını hiperisin ve psödohiperisin oluşturmaktadır ve bu bileşikler ham bitkide oldukça az miktarda bulunmaktadır. Ekstraksiyon işlemi boyunca fotodinamik reaksiyon ile çoğu protohiperisin ve protopsödohiperisin, hiperisin ve pseudohiperisine dönüşür. Bitkinin çiçek ve tomurcukları da biyolojik olarak aktif olan floroglusinol bileşikleri içermektedir. *Hypericum* preparatlarında bulunan diğer bileşikler ise herhangi bir antidepresan etkiye sahip olmayan aminoasitler, fenilpropanlar, kumarinler, taninler ve prosiyanidinlerdir.

Hypericum perforatum'un yaprak ve çiçek tomurcuklarında bulunan bazı aromatik bileşikler ışığa maruz kaldıklarında kırmızıya dönüşürler. Hiperforinler oda sıcaklığında saklandıklarında bozunmaya uğrarlar *H. Perforatum* ışığa oldukça duyarlıdır (174).

Yapılan Çalışmalar ve Tıbbi Etkileri

Hypericum perforatum içindeki aktif bileşenler ve bunların etki mekanizması tam anlamıyla aydınlatılamamıştır. Çalışmalar *Hypericum perforatum* preparatlarının katekolaminlerin (norepinefrin, dopamin) biyolojik iletimini etkilediğini göstermektedir. *In vitro* veriler hiperikum ekstrelerinin potansiyel antidepresan etkinliğini diğer antidepresanlara benzer şekilde, santral monoamin konsantrasyonlarını değiştirerek gösterdiğini bildirmektedir. Bununla beraber *Hypericum* ekstrelerinin nöral kavşaklarda bulunan hücre içi sodyum iyon yoğunluğunu yarışmasız olarak arttırmaları diğer antidepresanlardan farklı bir etki mekanizmasına sahip olduklarını düşündürmektedir. *Hypericum* ekstrelerinde hiperforin içeriğinin doza bağımlı olarak antidepresan aktivite ile ilişkili olduğuna dair klinik kanıtlar mevcuttur (175).

Çoğu *Hypericum perforatum* preparatı hiperisin içeriğine göre standardize edilmektedir. Ticari ürünlerde hiperisin içeriği %0.05 –% 0.3 arasında olmak üzere önemli ölçüde değişmektedir. Çoğu klinik çalışmada günlük doz olarak %0.3 hiperisin içeren standardize ekstreten 900-1500 mg kullanılmaktadır. 300 mg'lık hiperikum tableti yaklaşık olarak 15 mg hiperforin içeriğine karşılık gelmektedir.

DeneySEL ve klinik çalışmalardan elde edilen veriler *Hypericum* ekstre bileşenlerinin ilaçlar ile etkileşebileceklerini göstermektedir. Bu etkileşim

sitokrom P450 enzimlerinden, CYP3A4 ve CYP2C19'un St. John's Wort tarafından indüksiyonu ile olmaktadır (175).

Toksisitesi

Hypericum ekstresinin kullanımı sonucu ortaya çıkan fotosensitiviteden muhtemelen hiperisin sorumlu olduğu düşünülmektedir. *Hypericum* ekstreleri ile ilişkili fotosensitivite reaksiyonlarının değerlendirildiği bir derlemede advers reaksiyonların ortaya çıkmaya başladığı eşik günlük olarak 2-4 g ticari örnek (yaklaşık olarak 5-10 mg hiperisin) olarak belirtilmiştir. Faz 1 klinik çalışmalarında HIV enfeksiyonu taşıyan hastaların tedavisinde hiperisin haftada 2 kez 0.5 mg/kg dozda uygulanmıştır. 23 hastanın 11'inde şiddetli kutanöz fotosensitivite görülmüştür. Toksik reaksiyon içerisinde güneşe maruz kalan bölgelerde ağrılı disestezi ile beraber eritematöz döküntü bulunur (176).

I.1.6.11. *Tribulus terrestris*

Genel Adı: *Tribulus terrestris*

Bilimsel Adı: *Tribulus terrestris*

Botanik Ailesi: *Zygophyllaceae*

Tribulus terrestris birçok ülkede halk arasında çeşitli amaçlarla kullanılan önemli bir bitkidir. Azımsanmayacak miktarda erkek ve kadın libido bozuklukları, iktidarsızlık, kısırlık ve sperm hareketinde etkinliği üzerine araştırma bulunmaktadır. Sitotoksik, kardiyovasküler ve antimikrobiyal aktiviteleri üzerine çalışmalarda bulunmaktadır. Dünya çapında birçok farmasötik preparat ve gıda destek ürünleri bu bitkinin saponin fraksiyonuna dayalı olarak satış yapmaktadırlar.

Tribulus terrestris Akdeniz'e özgü yıllık bir bitki olmasına rağmen günümüzde Avrupa'nın sıcak bölgeleri, Asya, Amerika, Afrika, Avusturalya olmak üzere dünyaya yayılmış bir bitkidir. Birçok farklı adı bulunmaktadır: çarık diken, çoban çökerten, deve çökerten, demir diken vb.

Genellikle bahçelerde yabancı ot olarak bilinmektedir. 10–60 cm boyunda, bir yıllık, otsu, tüylü, sürünücü ve çiçekleri küçük ve açık sarı renklidir. Toprak üzerine yatık olarak bulunur. Meyveleri ortalama olarak 10 mm çapında ve boynuz şeklinde sivri uçlara sahiptir.

Kimyasal Kompozisyonu

Tribulus terrestris içerisinde saponinler, flavanoidler, alkaloidler, lignanamid ve sinamik asit amidlerinin bulunduğu bildirilmiştir. Spirostanol ve furostanol saponinleri bu bitkide karakteristik olarak bulunmaktadır. Tigogenin, neotigogenin, gitogenin, neogitogenin, hecogenin, neohecogenin, diosgenin, ruscogenin, chlorogenin ve sarsasapogenin gibi çeşitli spiro türevleri bulunur. Ayrıca dört sülfatlı furo ve spiro saponinler de izole edilmiştir (177).

İmmatür albino sıçanlarda yapılan bir çalışmada *Tribulus Terrestris*'in vücut ve testiküler ağırlık üzerine etkisi incelenmiştir. 20 gün boyunca günde 70mg/kg *Tribulus Terrestris* ekstresi alan sıçanlarda kontrole oranla istatistiksel olarak ağırlık artışı gözlenmiştir (178).

Tribulus Terrestris ekstresi erkek White Plymouth Rock cinsi tavukların 11 hafta boyunca suyuna eklenmiştir. Deney sonunda erkek tavuklarda sperm kalite parametrelerinin artışı gözlenmiştir. Bu parametreler ejakulat hacmi, spermatozoid konsantrasyonu ve motilitesi vb. Serum total kolesterol içeriğinin de kontrole oranla %9-24 oranları arasında azalmıştır (179).

I.1.6.12. Valerian Root Extract (*Valeriana officinalis*)

Genel adı: Valerian, Garden Heliotrope, Garden Valerian, Kediotu

Bilimsel adı: *Valeriana officinalis*

Botanik ailesi: *Valerianaceae*

Valerian Yunan hekim ve herbalist Pedanios Dioscorides *De Materia Medica* 'yı yazana kadar en az bilinen şifalı bitki idi. 16. yüzyılın sonlarına doğru, Fabius Columna Valerian'ın antikonvülsan etkinliğinin yanı sıra çeşitli sinir hastalıklarının tedavisinde de kullanılabileceğini bildirmiştir. 19. yüzyılda hekimler sakinleştirici, ateş düşürücü, ağrı kesici ve afrodizyak olarak kullanımını önermişlerdir.

Valerianaceae ailesi yaklaşık olarak 250 farklı tür içermektedir. *Valeriana jatamansi* (Hindistan ve Pakistan Valerianı), *Valeriana edulis* (Meksika Valerianı), *Valeriana officinalis* (Avrupa Valerianı) bilinen en yaygın bitkisel Valerian kaynaklarıdır. En yaygın diğer bir tür ise Kuzey Amerika'ya özgü bir türdür. Amerikan Valerianı ile diğer cinslerin karıştırılması pek yaygın değildir (180,181).

Kimyasal Kompozisyonu

Esansiyel Valerian yağında 150'den fazla bileşik bulunmaktadır. Bu bileşikler içerisinde seskiterpenler (valerinik asit, valerenon) (182), seskiterpen türevleri (asetoksivalerinik asit, 3 β ,4 β -epoksivalerinik asit, hidroksivalerinik asit, valeran, valerenal, kriptofuranol) (183,184), bisiklik iridoid esterler (valepotriatlar) (185), valepotriatların bozunma ürünleri (baldrinal, homobaldrinal, valtroksal), monoterpenler (borinil asetat, izovaltrat), flavanoidler (6-metil apigenin, hisperidin) (186), furanofuran lignanları, alkaloidler (valerianin, aktinidin), aminoasitler (γ -aminobütirik asit, arjinin, glutamin, tirozin) bulunmaktadır.

Valepotriatlar kimyasal olarak stabil olmayan iridoid triesterlerdir (valtrat, izovaltrat, homovaltrat, asevaltrat, didrovaltrat). Valtrat ve izovaltrat valerian kökü içerisindeki valapotriat bileşiklerinin %90'ını oluşturmaktadır (187). Ticari valerian kök ekstraktları lipofilik olmaları ve sulu solüsyonlarda in-stabil olmaları nedeniyle düşük miktarda valepotriat içermektedirler. Valerian esansiyel yağ içeriği bitkilerin yetiştirme koşullarına bağlı olarak değişebilmektedir. Esansiyel yağ içeriğinde bornil asetat, valerenal, valerenon ve kriptofuranol major bileşenlerdir (188). Minör bileşenler ise α -pinen, β -pinen, kamfen, β -karyofilin, terpinolen, limonen ve karil asetatdır. Valerian bitki preparatlarında kullanılan bir standart bileşen bulunmamaktadır. Ana içerikte seskiterpen bileşikler (valerinik asit, hidroksivalerinik asit, asetovalerinik asit) oldukça değişken miktarlarda bulunmaktadır. Altı ticari valerian örneğinin analizinin yapıldığı bir çalışmada valerinik asit ve hidroksivalerinik asit tek bir örnekte gözlenmiştir (189). Avustralya kökenli 31 ticari valerian preparatının (kapsül, tablet, çay, sıvı) toplam valerinik asit içeriği incelenmiştir. Toplam valerinik asit içeriğinin $< 0.01 - 6.32$ mg/g arasında değiştiği saptanmıştır (190).

Yapılan Çalışmalar ve Tıbbi Etkileri

Valerian bitkisi yaygın olarak sedatif, uyumaya yardımcı ve antispazmotik etkileri nedeniyle kullanılmaktadır. Diğer geleneksel kullanımları içerisinde kas krampları, menstural ağrı, gerilim tipi baş ağrısı, nöbetler, mantar enfeksiyonları, boğaz ağrısı, ödem, aşırı terleme ve gastrointestinal gaz tedavisi bulunmaktadır.

Valerian uykusuzluk ve anksiyete için geleneksel bitkisel tedavi yöntemi olarak kullanılsa da kanıtlanmamıştır (191). Çeşitli klinik çalışmalarda valerian öncelikle uykuya dalma süresini azaltması, gece uyanmaların azaltılması, uyku

kalitesinin artırması nedeniyle uykusuzluğa karşı etkili bir tedavi olduğunu düşündürmektedir (192,193). Fakat uyku parametrelerinde gelişmelerin görülmediği klinik çalışmalar da mevcuttur (194). Sonuçların tutarsızlığı ve deney tasarım eksiklikleri (küçük örneklem grupları, zayıf değerlendirme ölçüleri, değişkenlerin yetersiz kontrolü vb.) uykusuzluk tedavisinde Valerian'ın etkinliği hakkında sınırlı bilgi elde edilmesine neden olmuştur.

Toksisitesi

Valepotriat bileşikleri çoğunlukla Valerian'ın aktif bileşenleri olarak adından söz ettirse de olası sedatif etkilerinin etki mekanizması ile ilgili ortak bir görüş bulunmamaktadır. *In vitro* çalışmalar Valerian'da bulunan flavanoid yapıdaki 6-metilapigenin'in GABA A reseptörünün benzodiazepin bağlanma bölgesine bağlandığını göstermiştir (195). Ayrıca lignan olan 1-hidroksipinoresinol 5-HT 1A serotonin reseptörüne bağlanmaktadır (196). *In vitro* çalışmalar valerian ve valerinik asitin 5-HT 5a reseptörüne parsiyel agonist olarak bağlandığını göstermektedir.

BÖLÜM II

II.1 GEREÇ VE YÖNTEM

II.1.1. GEREÇ

II.1.1.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler

<u>Kimyasal Madde</u>	<u>Firma Adı</u>
Asetik asit	J.T Baker 9515-03
Asetonitril	Sigma Aldrich 34851
Biochanin A	Sigma D-2016
Blocking Reagent	Roche 14950800
Daidzin	Sigma 30408
Daidzein	Sigma D7802
Dimetilsülfoksit (DMSO)	Merck 8.02912.2500
Ditiyotretiyol (DTT)	Fluka 43819
EDTANa ₂ .2H ₂ O	Sigma E5134
Etanol	Merck 1.00983.2500
Formononetin	Sigma 47752
Genistin	Sigma G-0897
Genistein	Sigma G0897
Gliserol	Sigma Aldrich G7893
Glycitein	Sigma G-2785
Glycitin	Sigma G-1296
Hidroklorik asit (HCl)	Sigma Aldrich 07102
Kumestrol	Sigma 27885
Metanol	Sigma Aldrich 34885
2-Metoksiflavon	Sigma M-6047
NaCl	Merck 1.06404.100
17-β-Östradiol	Sigma E8875
Ters faz kolon materyali (RP-C18)	Merck
Sülfirik Asit	Sigma Aldrich 07208
Tersiyer Bütanol	Merck 8.22264.1000
Tris	Sigma T1503

II.1.1.2. Kullanılan Gereçler

Makine ve Teçhizat

Buzdolabı (+4 °C)
Çoklu Mikroplaka Okuyucu
Derin Dondurucu (-80 °C)
Hassas Terazı
Manyetik Karıştırıcı
Otomatik pipet
Otomatik pipet
Otomatik pipet
pH metre
Rotary Evaporatör
Su Banyosu
Ultrasonik Banyo (sonikatör)
Vorteks
96 kuyucuklu mikroplaka
HPLC
UV detektör
Liyofilizatör
PTFE filtre
NMR
LC/ESI TOF MS

Firma Adı ve Modeli

Profilo BD2206T
Perkin Elmer Victor3
New Brunswick U410 premium
Sartorius GP1200P
Velp Scientifica
Eppendorf 1-10µl
Eppendorf 10-100µl
Eppendorf 100-1000µl
Hanna Ph 211
Heidolph Laborata 4000 efficient
Memmert
Elma Transonic 460/H
Nüve NM110 Vep Scientifica
Grenier BioOne 655209
Agilent 1100 series
Agilent VWD G1314A
Labconco
Sartorius Minisart SRP15
Varian AS 400
Agilent 1100 series

II.1.1.3. Kullanılan Bitkisel Diyet Destek Ürünleri

Tez kapsamında çalışılan bitkisel gıda destek ürünleri (piyasada bulunan orijinal isimleri ile) sırasıyla ***Astragalus Root Extract***, ***Black Cohosh Root Extract***, ***Dong Quai***, ***Grape Seed Extract***, ***Green TeaLeaf Extract***, ***Gotu Kola***, ***Isoflavones***, ***Saw Palmetto Berries***, ***Spirulina***, ***St. John's Wort***, ***Tribulus Terrestris*** ve ***Valerian Root Extract***'tır.

Bu örneklerden Gotu Kola, Saw Palmetto Berries ve *Spirulina* doğrudan materyalin kendisi olup (bitkisel materyal veya alg) diğer örnekler bitkilerin ekstreleri şeklinde temin edilmiştir. Kullanılan bitkisel diyet destek ürünlerin tümü serbest eczanelerden satın alınmıştır.

II.1.1.4. Kullanılan Çözeltiler

II.1.1.4.1. Bitkisel Diyet Destek Ürünlerinin Ekstraksiyonunda Kullanılan Çözeltiler

Etanol:Su:Dimetilsülfoksit (70:25:5) çözeltisi: 500 ml çözelti için, 350 ml etanol, 125 ml distile su ve 25 ml dimetilsülfoksit karıştırılarak hazırlanmıştır.

HCl ve NH₄OH çözeltisi: pH ayarlamak için kullanılmıştır.

II.1.1.4.2. Ters Faz Kromatografisi ile Fraksiyonlamada Kullanılan Çözeltiler

- Distile su
- %40 metanol çözeltisi
- %100 metanol çözeltisi

II.1.1.4.3. Reseptör Bağlanma Deneyinde Kullanılan Çözeltiler

Stok TEN Tamponu (Tris, EDTA $\text{Na}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, NaCl): Bağlanma tamponunun hazırlanmasından önce; Tris, EDTA $\text{Na}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ve NaCl'den oluşan stok TEN tamponu hazırlanmıştır. Stok TEN tamponu konsantrasyonu bağlanma tamponunun 10 katı olacak şekilde (100mM NaCl, 100mM Tris, 15mM EDTA $\text{Na}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) hazırlanmıştır. Deney günü stok TEN tamponu ve diğer kimyasallar (ditiyotritol ve blocking reagent) kullanılarak taze bağlanma tamponu hazırlanmıştır.

100 ml TEN tamponu için; 0.5844g NaCl, 1.2114g Tris, 0.5584g EDTA $\text{Na}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ tartılmıştır. Tartılan maddeler balon jöjeye aktararak 100 ml distile su ile çözülmüş ve +4°C'de saklanmıştır.

Bağlanma Tamponu: Bağlanma tamponu 10mM NaCl, 10mM Tris, 1.5mM EDTA $\text{Na}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 1mM ditiyotritol, %10 gliserol ve 0.4g/L blocking reagent içerir.

100 ml bağlanma tamponu için 0.015 g ditiyotritol, 0.4 g blocking reagent tartılmıştır. Üzerine 10ml stok TEN tamponu (Tris, EDTA $\text{Na}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, NaCl) ve 80 ml distile su eklenir. Homojen hale gelmesi için tampon manyetik karıştırıcı ile karıştırılmış ve ardından NaOH ile pH'ı 7.4'e ayarlanmıştır.

Stok Östradiol: Stok östradiol 10^{-1} M olacak şekilde hazırlanmıştır. Çözücü olarak DMSO kullanılmıştır. Stoklar -20°C'de saklanmıştır. Deney sırasında, deney ortamındaki final konsantrasyonu 10^{-5} M olacak şekilde DMSO ile dilüsyonları yapılmıştır.

Stok Kumestrol: Stok kumestrol 100 μM olacak şekilde DMSO içinde çözümlenerek hazırlanmış ve 20°C'de saklanmıştır. Deney ortamındaki final

konsantrasyonu 10nM olacak şekilde bağlanma tamponu ile dilüsyonları yapılmıştır.

Östrojen reseptörü ligand bağlanma bölgesi (ER α -LBB) : Östrojen reseptörü ligand bağlanma bölgesi (ER α -LBB) eldesi için kullanılacak His6-ER α -LBB eksprese eden rekombinant E.coli BL21 (DE3) hücreleri Dr. Marc Ruff tarafından gönderilmiştir. Hücrelerin çoğaltılarak ER α -LBB izolasyon ve saflaştırma işlemleri Hollanda'da Vrije Universitesi, Moleküler Toksikoloji Bölümü laboratuvarlarında gerçekleştirilmiş; analize kadar -80 °C'de saklanan ER α -LBB, deney sırasında buzda çözündürülerek kullanılmıştır.

II.1.1.4.4. Fitoöstrojen Analizinde Kullanılan Çözeltiler

- %1 asetik asit çözeltisi
- %100 asetonitril çözeltisi

II.1.2. YÖNTEMLER

II.1.2.1. Bitkisel Diyet Destek Ürünlerinin Ekstraksiyonu

Ekstre halindeki bitkisel gıda destek ürünlerinden 800 mg, bitkinin kendisi olan gıda destek ürünlerinden 4 g tartılmıştır. Tartılan örnekler santrifüj tüplerine aktarılmıştır. Tüplerdeki örneklerin üzerlerine 4 ml EtOH:H₂O:DMSO (70:25:5) karışımı eklenmiş ve tüpler 1 dk vortekslenmiştir. Ardından ekstraksiyon için tüpler 30 dk sonikasyona tabi tutulmuş ve sonikatörden alınan örnekler, 10 dk süreyle 7000 rpm'de santrifüj edilmiştir. Asidik hidroliz (AH) ve normal ekstraksiyonu (N) hazırlamak için üst sıvı faz alınarak ikiye bölünmüştür.

Asit hidroliz için ayrılan tüplere 1 ml konsantre HCl eklenmiş, bu örnekler 2 saat 80 °C’de su banyosunda tutulmuştur. Su banyosundan alınan örneklerin oda sıcaklığına gelmesi beklenmiş; daha sonra NH₄OH çözeltisi ile nötralizasyon gerçekleştirilmiştir.

Asit hidrolizi uygulanmayan normal ekstraksiyon örneklerinde gerekli olduğu durumda NH₃ ya da HCl ile nötralize edilmiştir.

II.1.2.2. Asit Hidrolizi ve Normal Ekstraksiyon Örneklerinin Ters Faz Kromatografisi İle Fraksiyonlanması

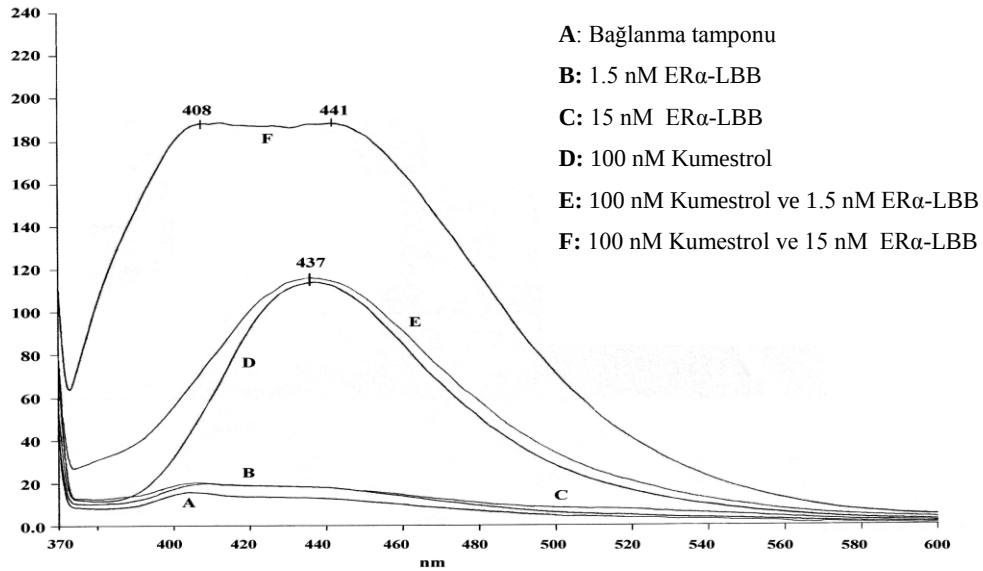
Nötralize edilen asit hidroliz örnekleri ile normal ekstraksiyon örnekleri, ekstraksiyon çözücüsünün uçurulması için rotary evaporatörde vakum altında yoğunlaştırılmıştır. Kurutulan örnekler su içinde çözülmüş ve/veya süspande edilmiştir. Ardından su ile şartlandırılmış RP-C18 kolona uygulanmıştır. Kolondan sırayla %100 su, % 40 MeOH ve %100 MeOH çözeltileri geçirilerek ekstre içeriği 3 fraksiyon halinde toplanmıştır.

Ters faz kromatografisi sonucunda elde edilen tüm fraksiyonlar rotary evaporatörde uçurulmuş ve devamında tam olarak kurutulup tartım hatalarının önüne geçilmesi amacı ile liyofilize edilmiştir. %100 su ve %40 MeOH fraksiyonları suda, %100 MeOH fraksiyonu ise tersiyer bütanolde çözüldükten sonra amber şişelere aktararak liyofilize edilmiştir.

II.1.2.3. Floresans Ligand - ER α -LBB Bağlanma Yöntemi

II.1.2.3.1. Yöntemin Esası

Östrojenik bileşiklerin taranmasında klasik reseptör bağlanma deneyine alternatif yüksek verimde çalışan yeni bir yöntem kullanılmıştır (197). Bu yöntem 96-kuyucuklu mikrolaka formatında örneklerin östrojen reseptörüne olan afinitelerinin taranmasına olanak verir. Kumestrol östrojen reseptörüne iyi bağlanan, floresans özelliğe sahip doğal bir bileşik olup, bu yöntemde izleme ligandı olarak kullanılmaktadır. Kumestrol serbest halde iken 355nm’de eksitasyonu takiben 435nm’de ışığı emite edebilme özelliğine sahiptir. Östrojen reseptörüne bağlandığı durumda ise 355nm’de eksitasyonu takiben emisyon dalga boyu 408 nm’e kayar. Aynı zamanda kumestrolün floresans şiddeti östrojen reseptörüne bağlandığında literatüre göre 4-10 katlık artış göstermektedir.



Şekil II.1: Bağlanma tamponu, kumestrol, kumestrol- ER α -LBB kompleksinin 355nm eksitasyonda emisyon spektrumu (197)

Kumestrolün 408 nm'deki floresans şiddeti ER'ye ligand bağlanmasına göre değişmektedir. Kumestrol'ün örnekteki ligand ile yer değiştirmesi floresans şiddetinde azalma olarak gözlemlenir. Pozitif kontrol olarak kullanılan 17- β -östradiol (E₂) ile ER α -LBB'ye maksimum bağlanma gerçekleşmekte, dolayısıyla maksimum floresans düşüşü gözlenmektedir.

II.1.2.3.2. Floresans Ligand - ER α -LBB Bağlanma Yöntemi ile Örneklerin Bağlanma Afinitelerinin Değerlendirilmesi

Test edilen örneklerin ER α -LBB'ye yarışmalı olarak bağlanmasındaki floresans değişimi çoklu mikrolaka okuyucu ile kaydedilmiştir. Çeşitli konsantrasyonlarda DMSO içinde hazırlanan örnekler 5 μ l olacak şekilde, önceden 180 μ l bağlanma tamponu yüklenmiş kuyucuklara (well) eklenmiştir. Kuyucuk içinde DMSO konsantrasyonunun % 5'i geçmemesine dikkat edilmiştir. DMSO içinde hazırlanmış ve dilüsyonları bağlanma tamponu içinde yapılmış stok kumestrol 10 μ l halinde, deney ortamındaki konsantrasyonu 10nM olacak şekilde kuyucuklara eklenmiştir. Negatif kontrol (bağlanma tamponu ve kumestrol) ve pozitif kontrol (bağlanma tamponu, kumestrol ve E₂- deney ortamındaki konsantrasyonu 10⁻⁵ M) her deney günü uygulanmıştır. ER α -LBB kuyucuklar içindeki konsantrasyonu yaklaşık 14 nM olacak şekilde 10 μ l kullanılmıştır. Toplam kuyucuk hacmi 205 μ l olacak şekilde deneyler yapılmıştır. Oda sıcaklığında 1 saat inkübasyondan sonra çoklu mikrolaka okuyucu ile floresans değerleri 355/405 nm'de ölçülmüştür. Deneylerde her örnek en az üç tekrarlı çalışılmıştır.

Genel tarama çalışmaları

Test edilen örneklerin ER α -LBB bağlanma afinitelerinin değerlendirilmesi amacıyla genel tarama çalışmaları örneklerin %100 metanol fraksiyonları için 1mg/ml konsantrasyonda, %40 metanol fraksiyonları için 1.5mg/ml konsantrasyonda yapılmıştır. Floresans şiddetindeki değişimler ve örneklerin E2'ye oranla % inhibisyon değerleri hesaplanmıştır. Hesaplamalar sırasında ekstrelerin kendilerine ait (arka plan/background) floresans değerleri de dikkate alınarak sadece bağlanmadan kaynaklanan "bağlanma" floresans şiddetleri belirlenmiştir.

Yarışmalı Bağlanma Eğrileri

Genel tarama çalışmaları sonucunda bağlanma afiniteleri yüksek bulunan örneklerin, 6 farklı konsantrasyonda (41 mg/ml; 13.67 mg/ml; 4.55 mg/ml; 1.52 mg/ml; 0.5 mg/ml; 0.05 mg/ml) ER α -LBB'e bağlanma afiniteleri değerlendirilerek IC₅₀ değerleri saptanmıştır. IC₅₀ değeri kumestrolün ER α -LBB'ne bağlanmasını %50 inhibe eden madde konsantrasyonunu ifade etmektedir.

II.1.2.4. Fitoöstrojenlerin HPLC ile Analizi

Bitkisel diyet destek ürünlerinin fitoöstrojen içeriğinin analizi için Luthria ve ark.'nın HPLC yöntemi tarafımızdan modifiye edilmiştir (198). Yöntemde, ters faz C₁₈ kolonda gradyen elüsyon yapılmıştır. Mobil faz olarak, %1 asetik asit ve %100 asetonitril kullanılmıştır. Akış hızı 0.6 ml/dk'dır. Toplam analiz süresi 70 dk'dır. Gradyen elüsyondaki mobil faz oranları **Tablo II.1**'de gösterilmektedir. Analitler floresans dedektörde 254 nm dalga boyunda monitörize edilmiştir. Standart maddeler (daidzin, glisitin, genistin, daidzein,

glisitein, genistein, formononetin, biyokanın A) ve örnekler DMSO içinde çözülmüştür. Örnekler enjeksiyon yapılmadan önce 0.45µm PTFE fitreden geçirilmiştir. Enjeksiyon hacmi 5µl'dir.

Tablo II.1. HPLC analizinde gradyen elüsyon mobil faz bileşenlerinin oranları

Zaman(dk)	% 100 Asetonitril	%1 Asetik asit
0	15	85
5	15	85
10	19	81
15	20	80
30	30	70
35	32	28
45	40	60
50	60	40
55	100	0
60	100	0
61	15	85
70	15	85

II.1.2.5. İstatistiksel Değerlendirme

Bulguların istatistiksel değerlendirmesinde t-testi uygulanmıştır.

BÖLÜM III

III. BULGULAR

III.1 Yöntemlerin Laboratuvar Koşullarına Uyarlanması İle İlgili Bulgular

III.1.1. Floresans Ligand - ER α -LBB Bağlanma Yöntemi

III.1.1.1. Gün İçi ve Günler Arası Tekrarlanabilirlik

Tablo III.1'de gün içi ve günler arası tekrarlanabilirlik göstergesi olarak varyasyon katsayıları görülebildiği gibi yüksek hızlı tarama yöntemlerinin performansının iyi bir göstergesi olarak Z' faktörü de belirtilmiştir (199). Z' faktörü, yöntemdeki pozitif ve negatif kontrol verileri kullanılarak hesaplanmaktadır. Z' faktörünün 0.5-1.0 arasında bir değere sahip olması yöntemin bağlı (maksimum etki) ve bağlı olmayan kumestrolü (minimum etki) birbirinden ayırabilme başarısının bir göstergesidir. Aşağıdaki eşitlikte Z' faktörünün nasıl hesaplandığı gösterilmiş ve **Tablo III.1**'de de yöntemin laboratuvarımız şartlarında Z' faktör değeri hesaplanmıştır.

$$Z\text{-factor} = 1 - \frac{3(\sigma_p + \sigma_n)}{|\mu_p - \mu_n|} \quad (199)$$

σ_p ve σ_n : pozitif ve negatif kontrollerin standart sapması

μ_p ve μ_n : pozitif ve negatif kontrollerin ortalaması

Tablo III.1: Pozitif ve negatif kontrollerin gün içi ve günler arası tekrarlanabilirlik değerleri ve Z' faktörü.

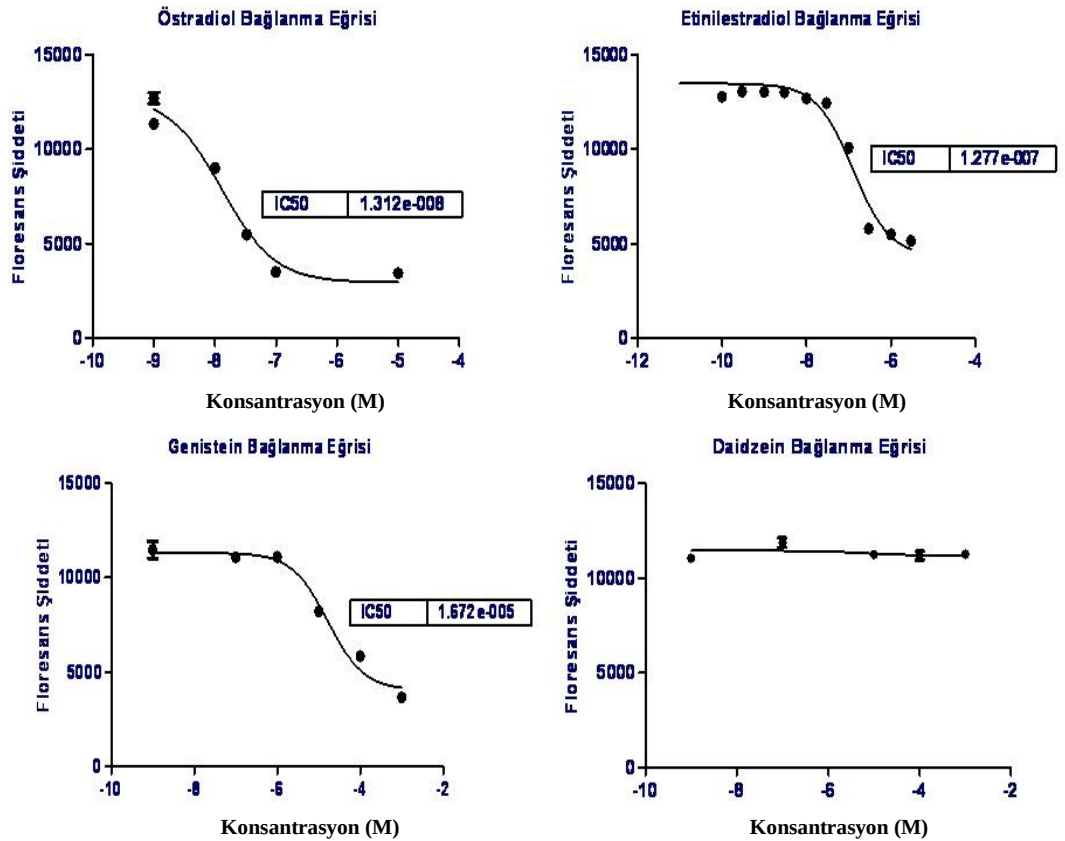
	Ortalama (μ) $\pm$ SS (σ) (%VK)	n
Gün İçi		
(-) kontrol	11498 $\pm$ 423 (%3.67)	10
(+) kontrol	3304 $\pm$ 32.4 (% 0.98)	10
Z' faktörü	0.99	
Günler arası		
(-) kontrol	11318 $\pm$ 342 (%3.02)	10
(+) kontrol	3278 $\pm$ 99.6 (%3.04)	10
Z' faktörü	0.84	

(+) kontrol: 10 μ M E₂ varlığında kumestrol - ER α -LBB kompleksinin floresans şiddeti (%100 inhibisyon), **(-) kontrol:** kumestrol - ER α -LBB kompleksinin floresans şiddeti (%0 inhibisyon); %VK (% varyasyon katsayısı)

%VK değerleri ve Z' faktörü dikkate alındığında yöntem tekrarlanabilirlik ve performansı açısından başarılı bulunmuştur.

III.1.1.2. Standart Maddeler İle Yöntem Performansının Gösterilmesi

Yöntemin kısmi validasyon çalışmaları kapsamında standart maddeler ile yöntemin performansı değerlendirilmiştir. Bu amaçla 17- β -östradiol, etinilestradiol, bilinen en potent fitoöstrojen olan genistein ve kendisi östrojenik olmayıp metabolitinin (equol) östrojenik olduğu bilinen diğer bir fitoöstrojen daidzeinin kumestrole karşı yarışmalı bağlanma eğrileri oluşturulmuştur. Bu deneylerden hareketle maddelerin IC₅₀ değerleri hesaplanmıştır (Şekil III.1).



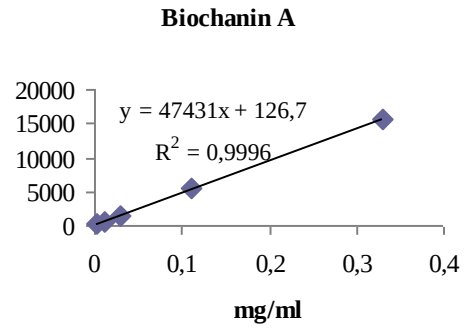
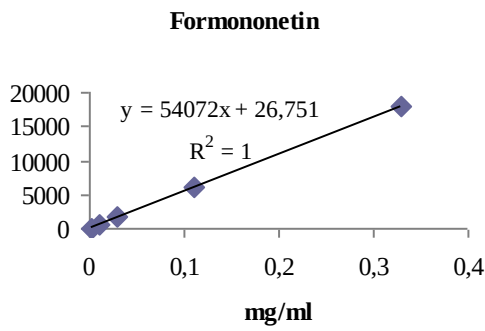
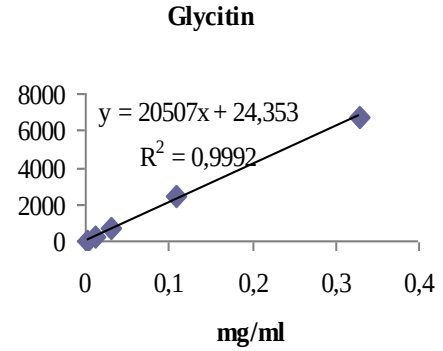
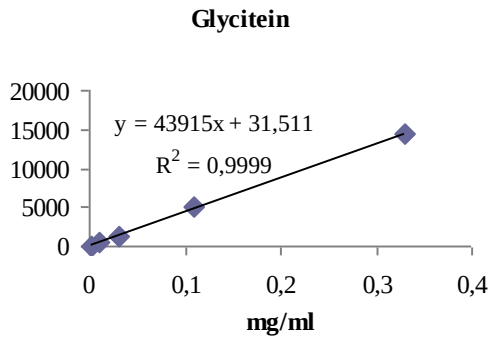
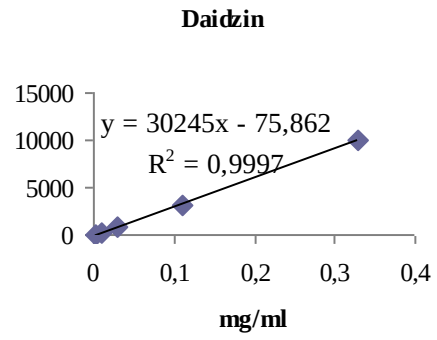
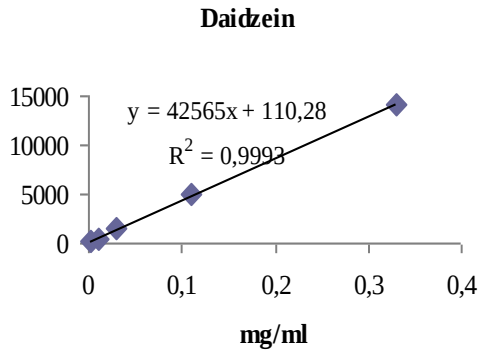
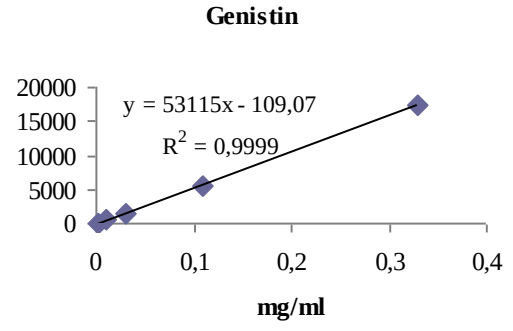
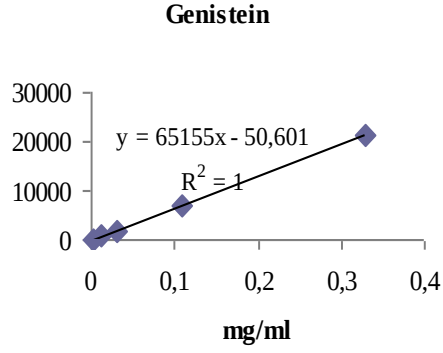
Şekil III.1. Östradiol, etinilestradiol, genistein ve daidzein için ER α -LBB'ye bağlanma eğrileri ve IC₅₀ değerleri

Östradiol, etinilestradiol, genistein ve daidzein ile yapılan çalışmada östradiol, etinilestradiol ve genistein'in farklı oranlarda ER α -LBB'ye bağlandığı, daidzein'in ise metabolik kapasiteye sahip olmayan *in vitro* reseptöre bağlanma deneyinde, öngörüldüğü şekilde, ER α -LBB'ye bağlanmadığı saptanmıştır (**Şekil III.1**)

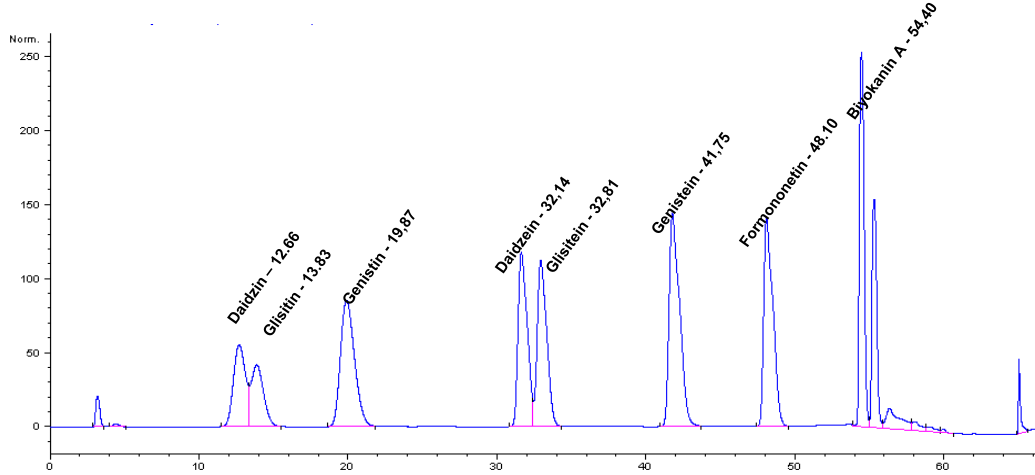
III.1.2. İzoflavon Standartlarının Analizi ve Kalibrasyon Doğrularının Çizimi

İzoflavon standart doğruları için, örneklerin 5 farklı konsantrasyonunda (0.33mg/ml, 0.11mg/ml, 0.03mg/ml, 0.011mg/ml, 0.003mg/ml) pik alanları elde edilmiş ve kalibrasyon doğruları çizilmiştir. Elde edilen doğrular **Şekil III.2**'de gösterilmiştir.

Sekiz izoflavon standardının 0.1 mg/ml konsantrasyonlarında eklenmesiyle hazırlanan karışımın HPLC-UV sisteminde analizi sonucu elde edilen kromatogram **Şekil III.3**'te görülmektedir. Standartların alıkonma zamanları ayrıca **Tablo III.2**'de de gösterilmektedir.



Şekil III.2. Fitoöstrojen standartlarının kalibrasyon doğruları



Şekil III.3. Fitoöstrojen standartlarının 0.1mg/ml konsantrasyondaki karışımlarının HPLC kromatogramı ve alıkonma zamanları

Tablo III.2. Fitoöstrojen standartlarının alıkonma zamanları

Standart Maddeler	Alıkonma zamanları (dk)
daidzin	12.66
glisitin	13.83
genistin	19.87
daidzein	32.14
glisitein	32.81
genistein	41.75
formononetin	48.10
biyokanın a	54.40

III.1.2.1. Gün içi ve Günler arası Tekrarlanabilirlik

Gün içi ve günler arası tekrarlanabilirlik, standartlardan 0.01 mg/ml genistein'in aynı gün içinde aynı örneğin 3 kez (gün içi) ve aynı örneğin farklı dört günde analizi ile (günler arası) elde edilen pik alanlarının incelenmesi ile belirlenmiştir (**Tablo III.3**).

Tablo III.3 Genistein'in gün içi ve günler arası tekrarlanabilirlik değerleri

	Ortalama $\pm$ SS	n
Gün içi	594 $\pm$ 56.4 (0.095)	3
Günler arası	613 $\pm$ 52.6 (0.086)	4

III.2. DENEYSEL BULGULAR

III.2.1. ER α -LBB Bağlanma Afinitelerinin Belirlenmesi

Bitkisel gıda destek ürünlerinin ters faz kromatografide elde edilen % 40 metanol ve %100 metanol fraksiyonlarının potansiyel endokrin bozucu etkilerinin araştırılması amacıyla örneklerin ER α -LBB'e bağlanma afiniteleri değerlendirilmiştir. Elde edilen veriler ile rölatif bağlanma afiniteleri hesaplanmıştır.

RBA - Rölatif Bağlanma Afinitesi

Pozitif kontrol olan E2'nin ER α -LBB'e bağlanması 100 kabul edilerek (RBA E₂=100) örneklerin E2'ye göre rölatif bağlanması hesaplanmıştır. Ölçülen floresans değerleri (F_{ölçülen}) örneklerin kendilerinden kaynaklanan (F_{arka plan}) floresans şiddetleri göz önünde bulundurularak sadece bağlanmanın neden olduğu floresans değerleri (F_{bağlanma}) hesaplanmıştır. En az 3 tekrarlı çalışılmış ve F_{bağlanma} değerlerinin ortalaması üzerinden RBA değerleri hesaplanmıştır.

$$F_{\text{arka plan}} = F_{(C+\text{örnek})} - F_C$$

$$F_{\text{bağlanma}} = F_{\text{ölçülen}} - F_{\text{arka plan}}$$

$$RBA = \frac{(C+ER\alpha-LBB) - F_{\text{bağlanma}}}{[C+ER\alpha-LBB] - [(C+ER\alpha-LBB+E2) - [(C+E2) - C]]} * 100$$

DeneySEL bulgularda örneklerin isimleri aşağıdaki gibi kısaltılarak kullanılmıştır:

Astragalus Root Extract: **ARE**

Isoflavones: **Iso**

Black Cohosh Root Extract: **BC**

Saw Palmetto Berries: **SPB**

Dong Quai: **DQ**

Spirulina: **SP**

Grape Seed Extract: **GSE**

St. John's Wort: **SJW**

Green Tea Leaf Extract: **GTLE**

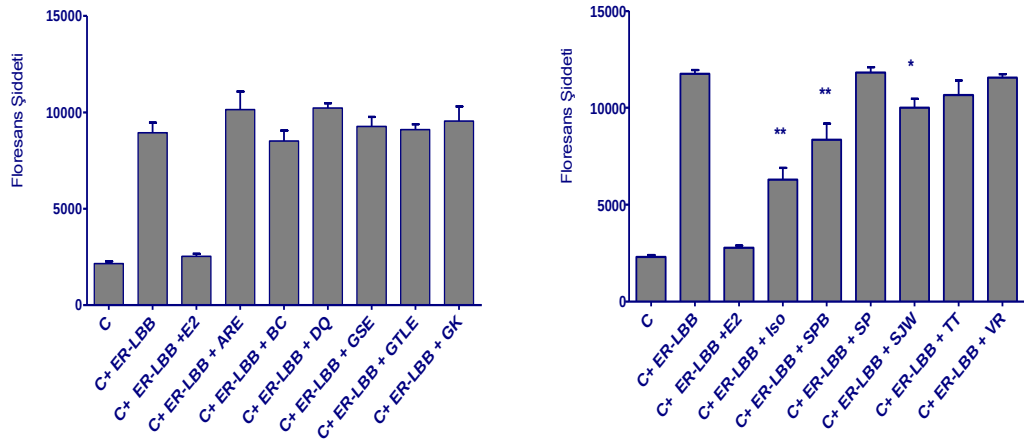
Tribulus Terrestris: **TT**

Gotu Kola: **GK**

Valerian Root Extract: **VR**

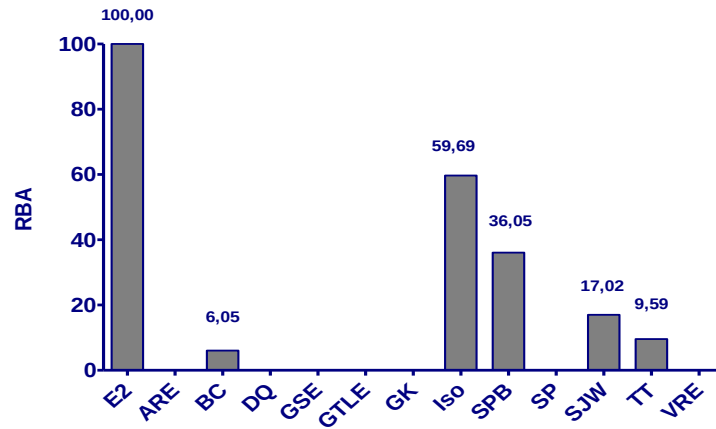
III.2.1.1 AH Ekstrelerinin %40 MeOH fraksiyonlarının ER α -LBB'ne bağlanma potansiyeli (1.5 mg/ml)

AH sonrası elde edilen %40 metanol fraksiyonlarının 1.5 mg/ml konsantrasyonunda bağlanma afiniteleri taranmıştır. Floresans değerleri Şekil III.4'te ve RBA değerleri Şekil III.5'te verilmiştir.



Şekil III.4. Asidik hidroliz ekstrelerine ait %40 metanol fraksiyonlarının 1.5 mg/ml konsantrasyonda ER α -LBB'ye bağlanma potansiyelleri

*p<0.005, **p <0.0001

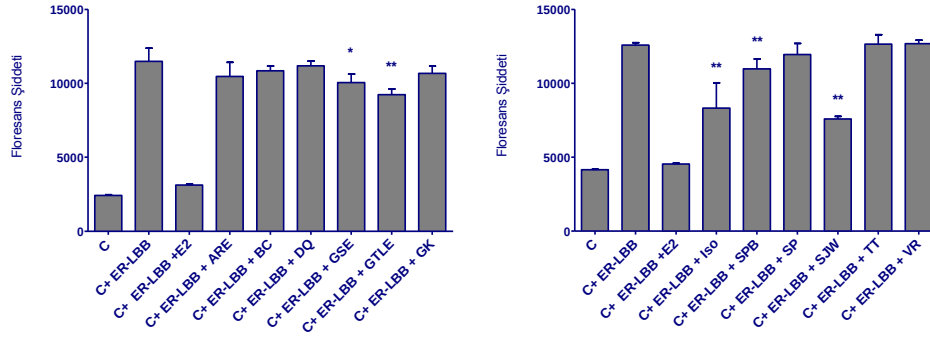


Şekil III.5. Asidik hidroliz ekstrelerine ait %40 metanol fraksiyonlarının 1.5 mg/ml konsantrasyonda RBA değerleri

AH ekstrelerinin %40 MeOH fraksiyonlarında en yüksek RBA değeri Iso örneğinde, ardından sırasıyla SPB, SJW, TT ve BC'da görülmüştür.

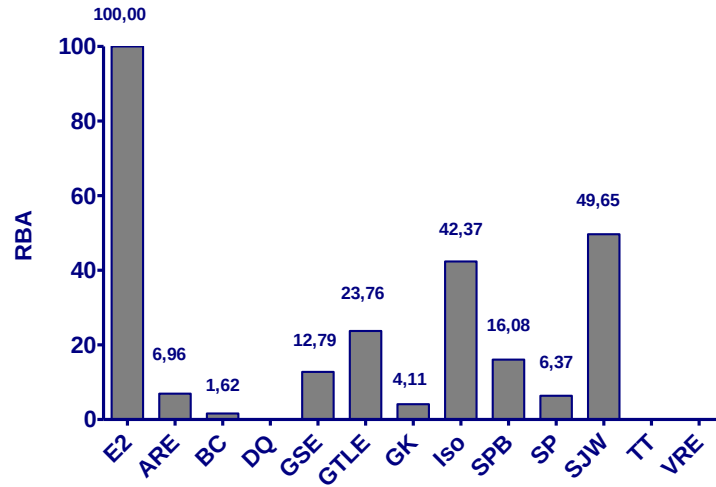
III.2.1.2. N Ekstrelerinin %40 MeOH fraksiyonlarının ER α -LBB'ne bağlanma potansiyeli (1.5 mg/ml)

N ekstraksiyon sonrası elde edilen %40 metanol fraksiyonlarının 1.5 mg/ml konsantrasyonunda bağlanma afiniteleri taranmıştır (Şekil III.6).



Şekil III.6. N ekstrelerine ait %40 metanol fraksiyonlarının 1.5 mg/ml konsantrasyonda ER α -LBB'ye bağlanma potansiyelleri

*p<0.005, **p <0.0001

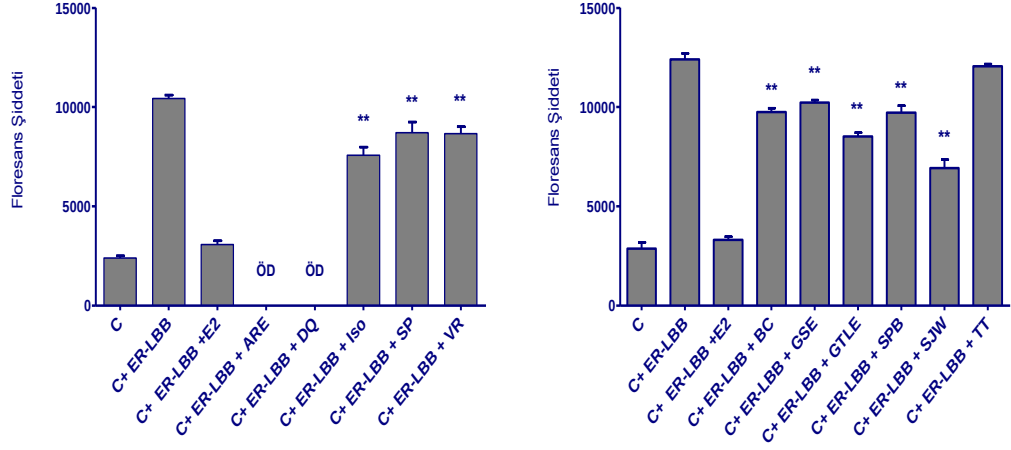


Şekil III.7. N ekstrelerine ait %40 metanol fraksiyonlarının 1.5 mg/ml konsantrasyonda RBA değerleri

N ekstrelerinin % 40 MeOH fraksiyonlarında en yüksek RBA değeri SJW'te ardından sırasıyla Iso, GTLE, GSE'de görülmüştür.

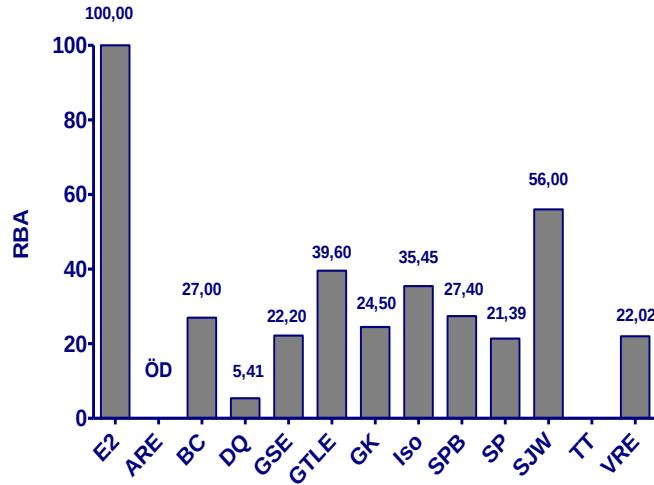
III.2.1.3. AH Ekstrelerinin %100 MeOH fraksiyonlarının ER α -LBB'ne bağlanma potansiyeli (1 mg/ml)

AH sonrası elde edilen %100 metanol fraksiyonlarının 1 mg/ml konsantrasyonda bağlanma afiniteleri taranmıştır (Şekil III.8).



Şekil III.8. AH ekstrelerine ait %100 metanol fraksiyonlarının 1 mg/ml konsantrasyonda ER α -LBB'ye bağlanma potansiyelleri

**p < 0.0001, ÖD: ölçülebilir değil

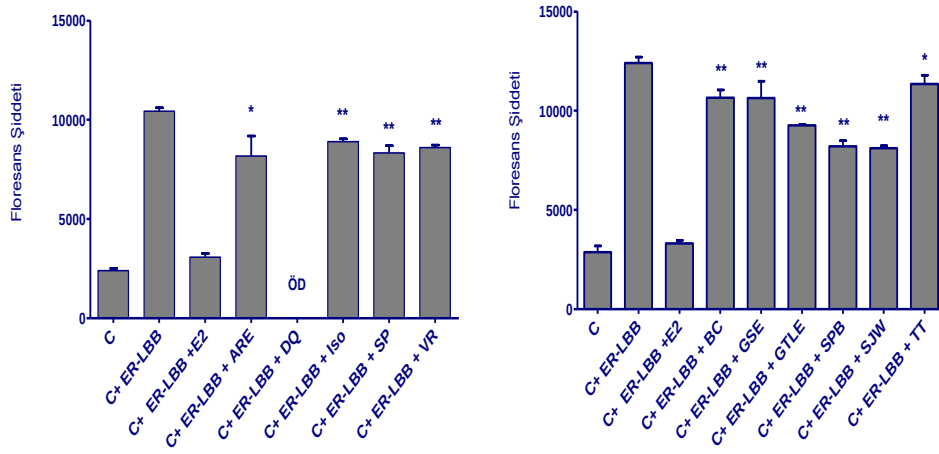


Şekil III.9. AH ekstrelerine ait %100 metanol fraksiyonlarının 1 mg/ml konsantrasyonda RBA değerleri

AH ekstralarının %100 MeOH fraksiyonlarında en yüksek RBA değeri SJW’de görülmüştür. Diğer yüksek RBA değerli örnekler ise GTLE, Iso, SPB, BC, GK, GSE, VRE ve SP’dir.

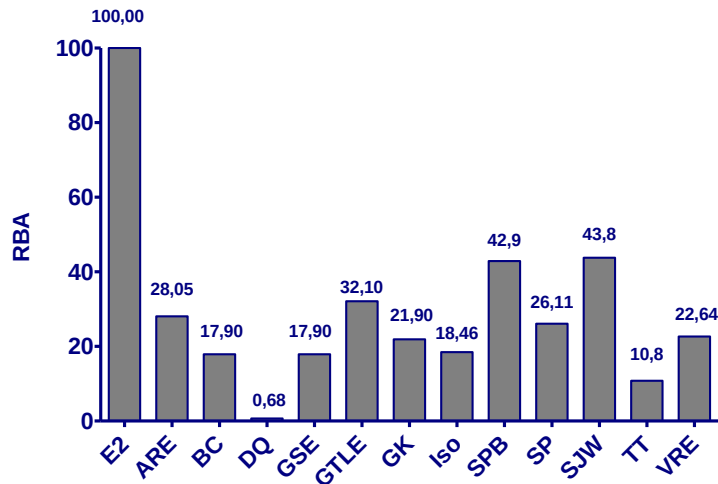
III.2.1.4. N Ekstrelerinin %100 MeOH fraksiyonlarının ER α -LBB’ne bağlanma potansiyeli (1 mg/ml)

N ekstraksiyon ile elde edilen %100 metanol fraksiyonlarının 1 mg/ml konsantrasyonda bağlanma afiniteleri taranmıştır (Şekil III.10).



Şekil III.10. N ekstralarına ait %100 metanol fraksiyonlarının 1mg/ml konsantrasyonda ER α -LBB’ye bağlanma potansiyelleri

**p < 0.0001, 0D:ölçülebilir değil



Şekil III.11. N ekstralarına ait %100 metanol fraksiyonlarının 1 mg/ml konsantrasyonda RBA değerleri

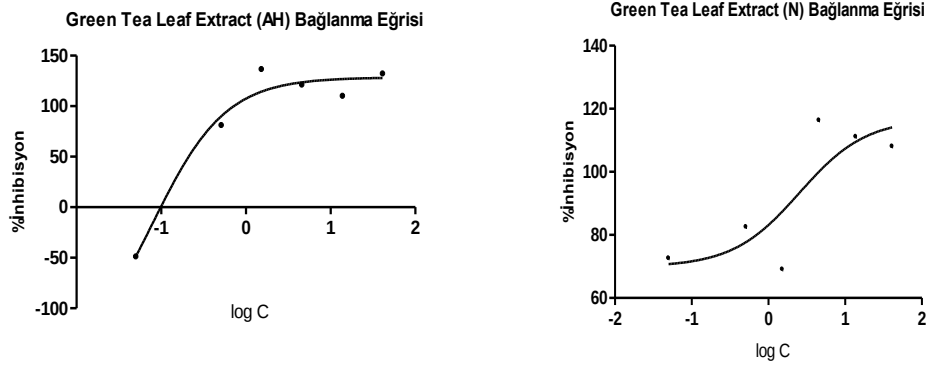
N ekstrlerinin %100 MeOH fraksiyonlarında en yüksek RBA değeri SJW’de görülmüştür. Diğer yüksek RBA değerli örnekler ise SPB, GTLE, ARE, SP, VRE, GK, Iso ve GSE’dir.

III.2.2. Seçilen Örneklerin Bağlanma Eğrileri ve IC₅₀ değerleri

Tüm veriler değerlendirildiğinde ER α -LBB’ye bağlanma potansiyelleri en yüksek olan üç ekstrenin (GTLE, SPB, SJW) detaylı bağlanma verilerini elde etmek amacıyla 6 farklı konsantrasyonda bağlanma düzeyleri incelenmiş ve IC₅₀ değerleri hesaplanmıştır.

Green Tea Leaf Extract (GTLE)

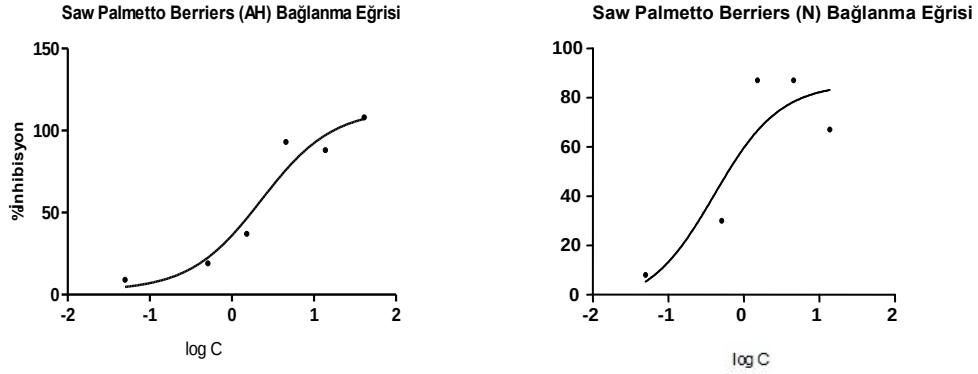
GTLE asidik hidroliz ve normal ekstraksiyon örneğinde çalışılan doz aralığında sağlıklı bağlanma eğrileri elde edilememiştir (**Şekil III.12**).



Şekil III.12. Green Tea Leaf Extract AH ve N ekstrlerine ait %100 MeOH fraksiyonlarının bağlanma eğrileri

Saw Palmetto Berries (SPB)

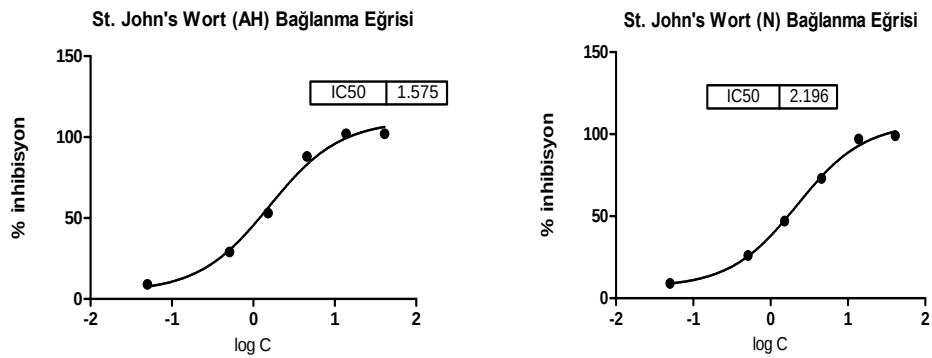
SPB asidik hidroliz ekstresinin IC_{50} değeri 2.28 mg/ml olarak saptanmış ancak normal ekstrenin çalışılan konsantrasyonları ile anlamlı bir bağlanma eğrisi elde edilememiştir (Şekil III.13).



Şekil III.13. Saw Palmetto Berries AH ve N ekstrelerine ait %100 MeOH fraksiyonlarının bağlanma eğrileri

St. John's Wort (SJW)

ER α -LBB'ye bağlanma potansiyeli en yüksek saptanan SJW'ün asidik hidroliz ekstresinin IC_{50} değeri 1.57 mg/ml, normal ekstresinin IC_{50} değeri ise 2.19 mg/ml olarak saptanmıştır (Şekil III.14).

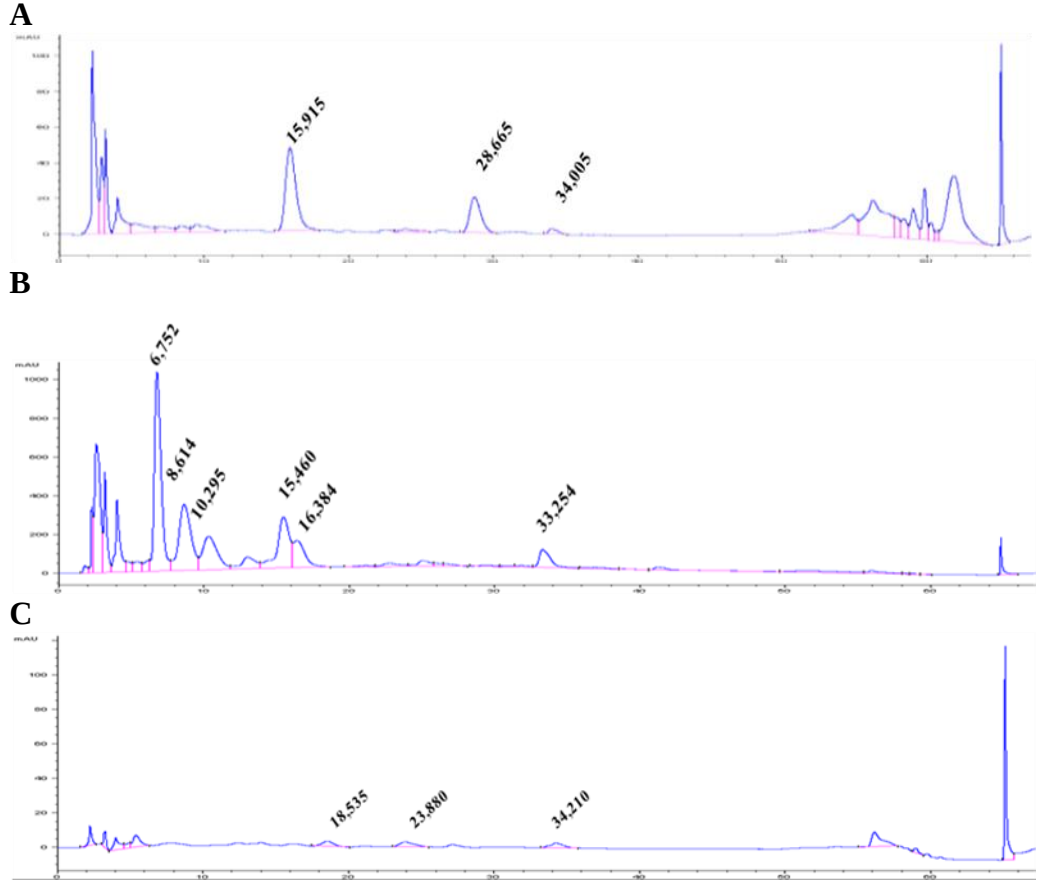


Şekil III.14. St. John's Wort AH ve N ekstrelerine ait %100 MeOH fraksiyonlarının bağlanma eğrileri

III.2.3. Örneklerin İzoflavon Analizi

AH ve N ekstreler 5 mg/ml olacak şekilde DMSO içinde çözülerek HPLC-UV sisteminde izoflavon analizleri yapılmıştır.

III.2.3.1. AH Ekstrelerinin %40 MeOH Fraksiyonlarının İzoflavon Analizi



Şekil III.15. AH ekstrelerinin %40 MeOH fraksiyonlarının HPLC kromatogramları

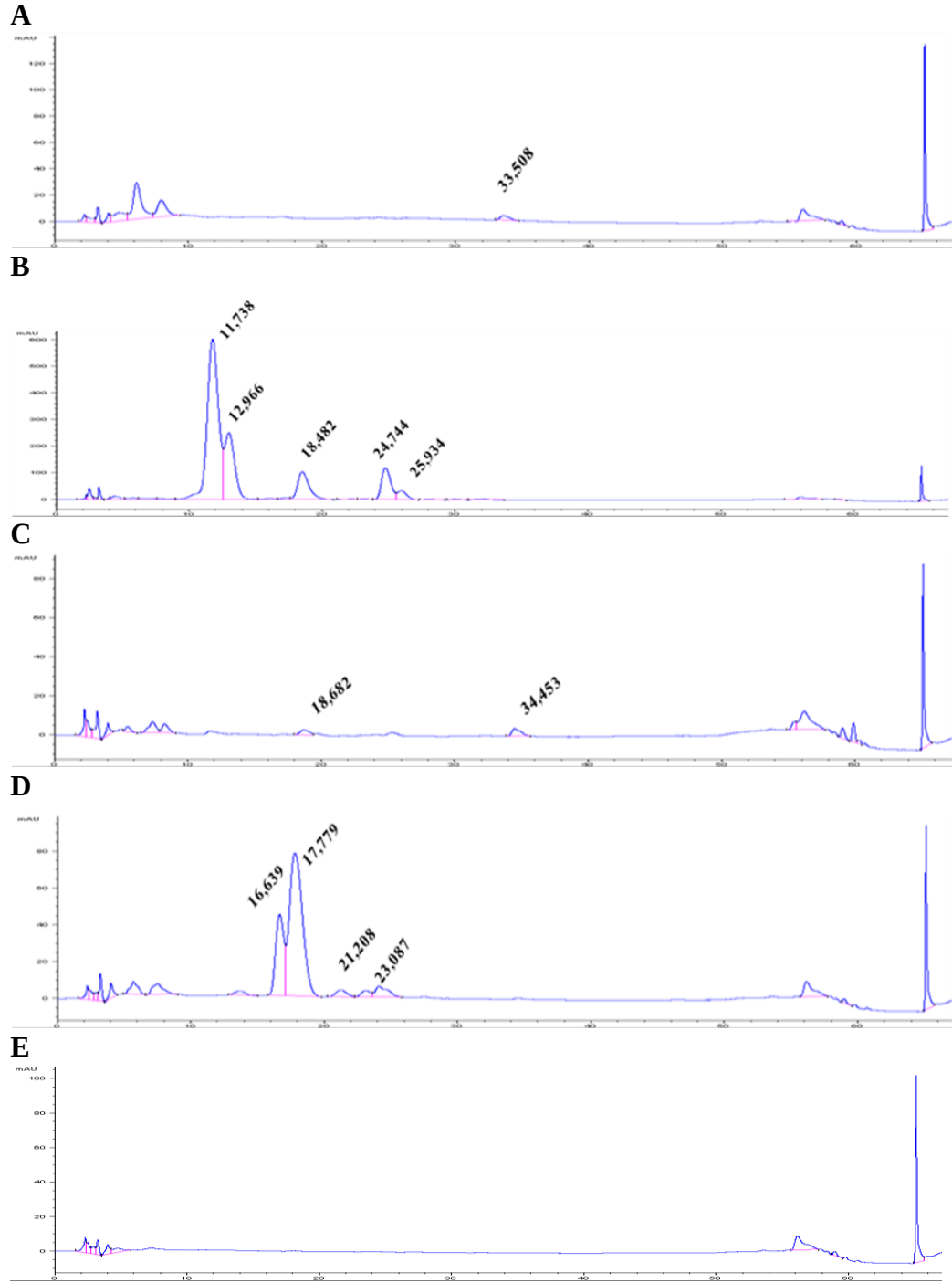
A: Astragalus Root Extract (ARE)

B: Green Tea Leaf Extract (GTLE)

C: St. John's Wort (SJW)

ARE, GTLE ve SJW örneklerinde 8 izoflavon standardından (daidzin, glisitin, genistin, daidzein, glisitein, genistein, formononetin, biyokanın A) hiçbiri saptanamamıştır (Şekil III.15).

III.2.3.2. N Ekstrelerinin %40 MeOH Fraksiyonlarının İzoflavon Analizi



Şekil III.16. N ekstrelerinin %40 MeOH fraksiyonlarının HPLC kromatogramları

A: Grape Seed Extract (GSE)

D: St. John's Wort (SJW)

B: Isoflavones (Iso)

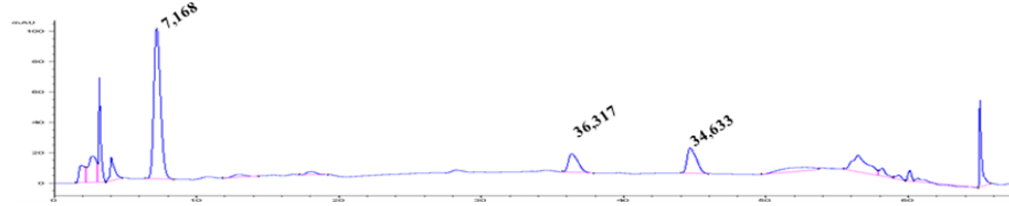
E: Valerian Root Extract (VRE)

C: Saw Palmetto Berries (SPB)

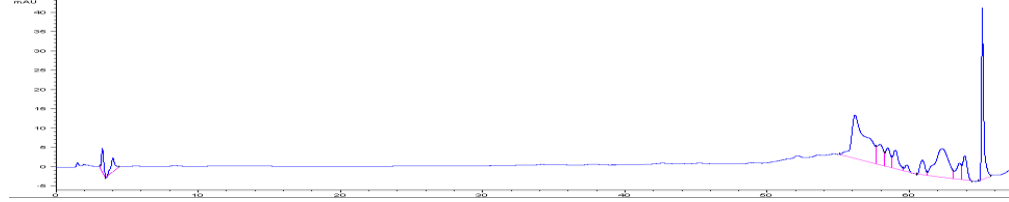
GSE, SPB, SJW ve VRE örneklerinde izoflavon standartları (daidzin, glisitin, genistin, daidzein, glisitein, genistein, formononetin, biyokanin A) saptanamazken, Iso örneğinde daidzin (alınma zamanı-Rt:12.66 dk) saptanmıştır.

III.2.3.3. AH Ekstrelerinin %100 MeOH Fraksiyonlarının İzoflavon Analizi

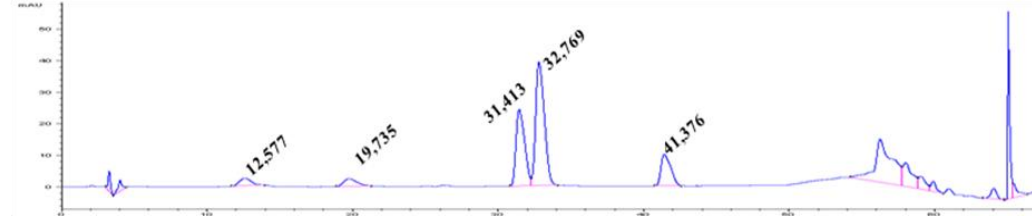
A



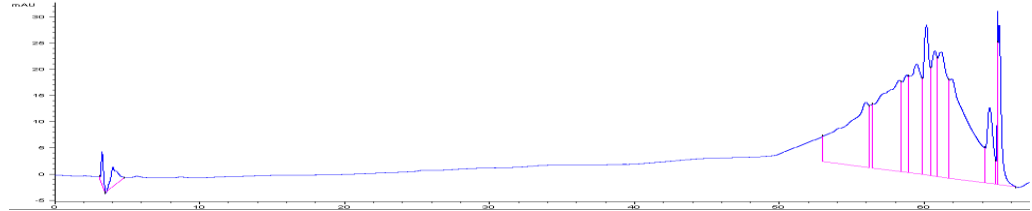
B



C



D



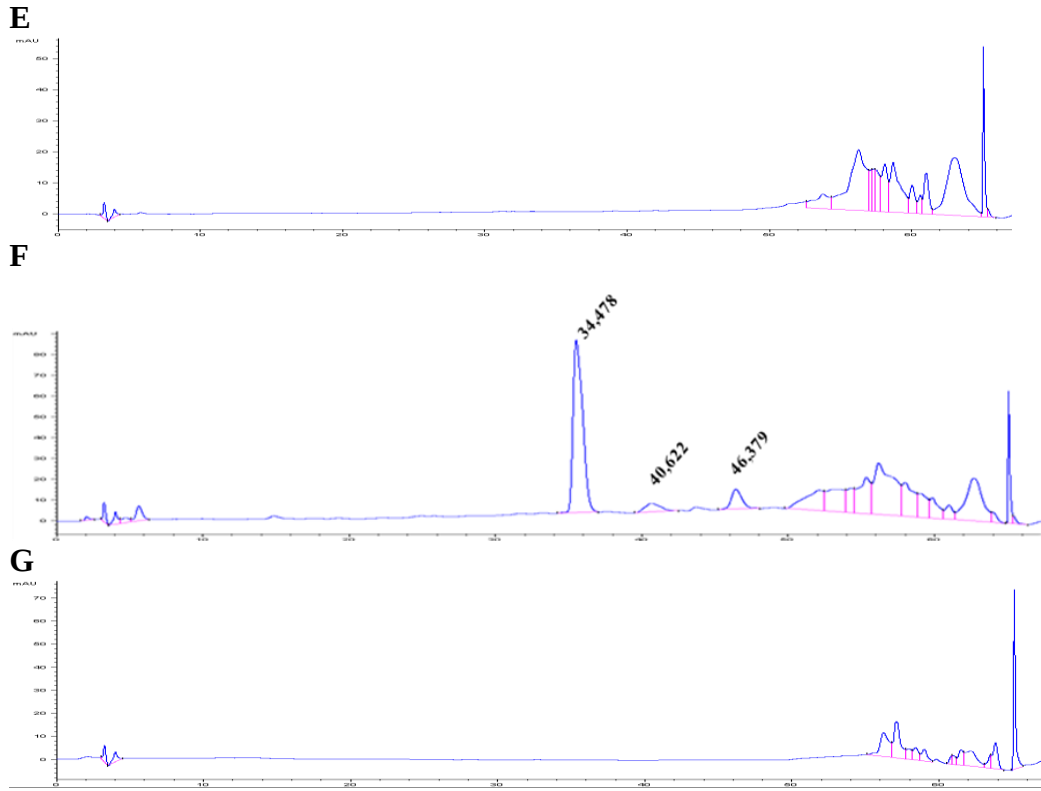
Şekil III.17. AH ekstrelerinin %100 MeOH fraksiyonlarının HPLC kromatogramları

A: Green Tea Leaf Extract (GTLE)

C: Isoflavones (Iso)

B: Gotu Kola (GK)

D: Saw Palmetto Berries (SPB)



Şekil III.17'in devamı. AH ekstrelerinin %100 MeOH fraksiyonlarının HPLC kromatogramları

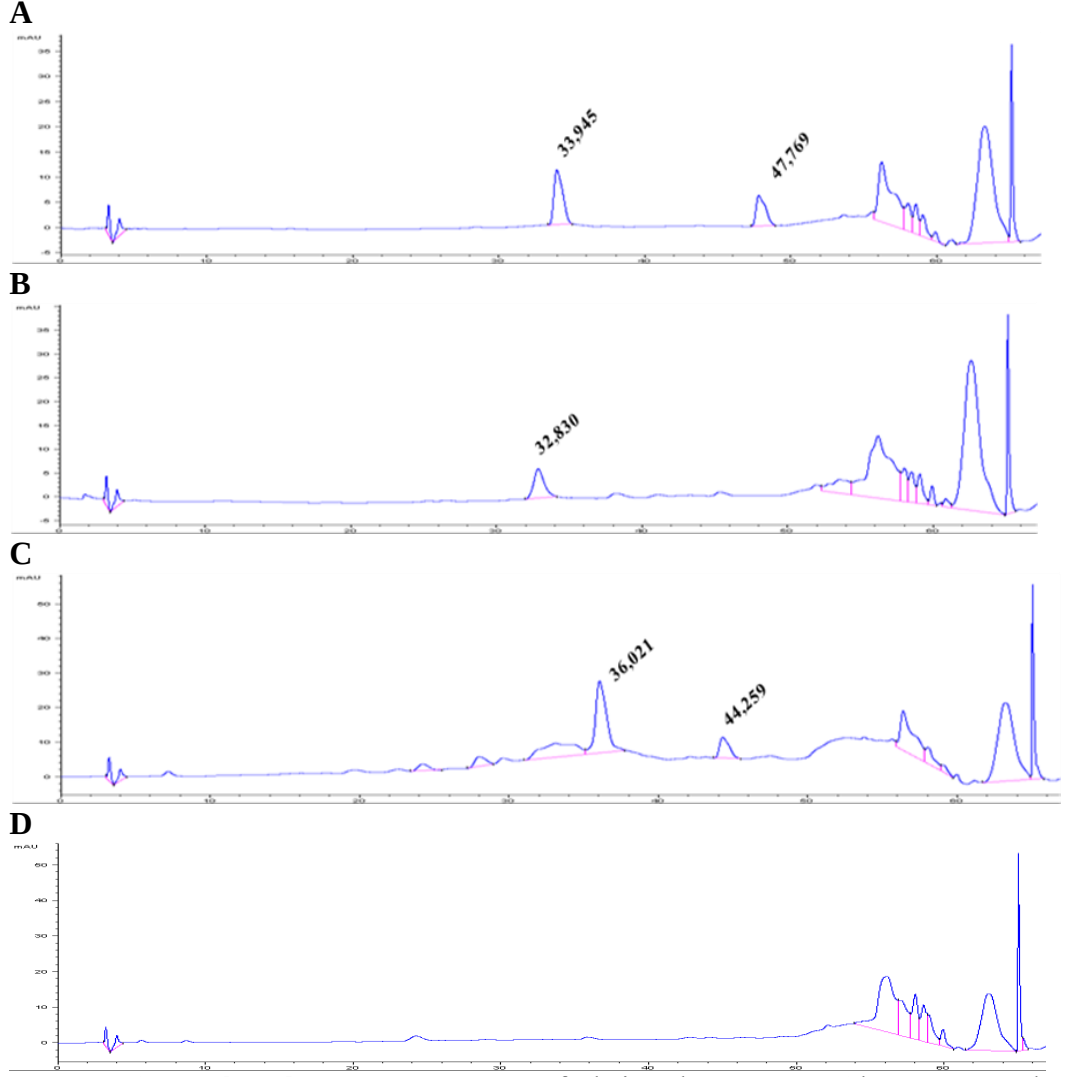
E: Spirulina (SP)

G: Valerian Root Extract (VRE)

F: St. John's Wort (SJW)

GTLE, GK ve SPB örneklerinde izoflavon standartları saptanamazken, Iso örneğinde beş izoflavon saptanmıştır. Bunlar; daidzin (Rt:12.66 dk), genistin (Rt:19.87 dk), daidzein (Rt: 32.14 dk), glisitein (Rt: 32.81 dk) ve genistein (Rt:41.38 dk)'dir. GK ve SPB örneklerinde herhangi bir pik görülmezken, GTLE örneğinde standartlardan farklı 3 pik gözlenmiştir. SP, SWJ ve VRE örneklerinde izoflavon standartları saptanamamıştır. Fakat SJW örneğinde standartlardan farklı 3 pik gözlenmiştir.

III.2.3.4. N Ekstrelerinin %100 MeOH Fraksiyonlarının İzoflavon Analizi



Şekil III.18. N ekstrelerinin %100 MeOH fraksiyonlarının HPLC kromatogramları

A: Astragalus Root Extract (ARE)

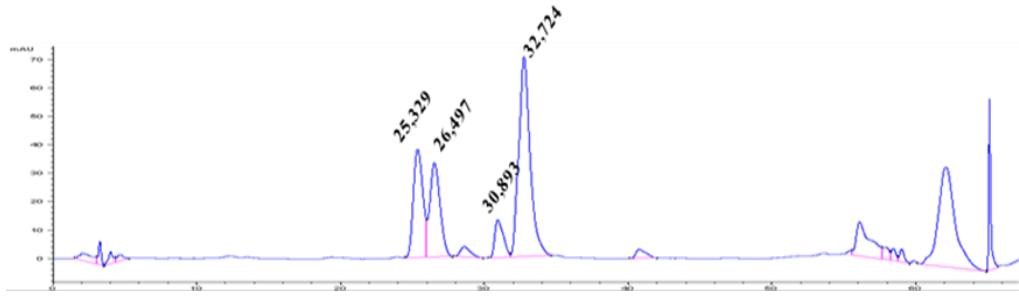
C: Green Tea Leaf Extract (GTLE)

B: Black Cohosh (BC)

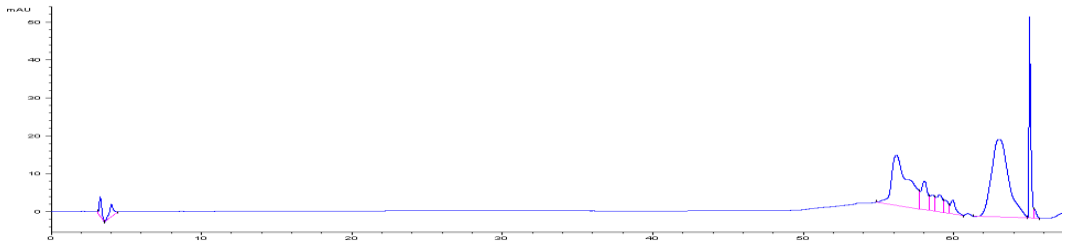
D: Gotu Kola (GK)

ARE, GTLE ve GK örneklerinde izoflavon standartları saptanamamıştır. BC örneğinde glisitein (Rt: 32.81 dk) saptanmıştır. ARE ve GTLE örneklerinde standartlardan farklı ikişer pik gözlenmiştir.

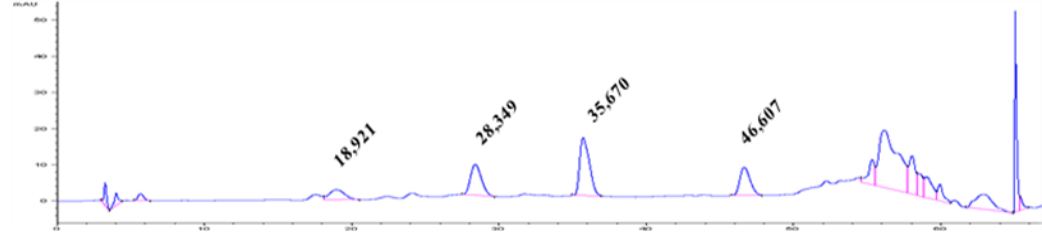
E



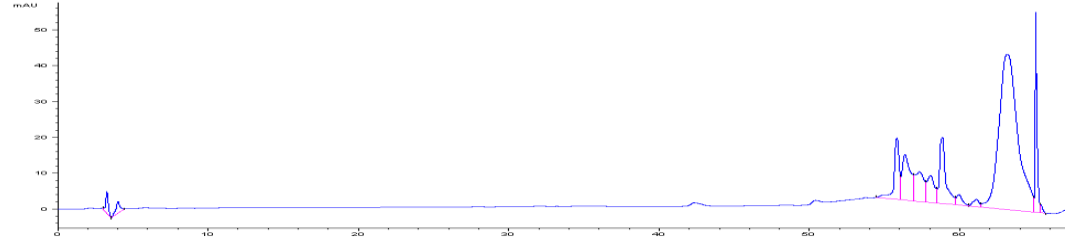
F



G



H



Şekil III.18'in devamı. N ekstrelerinin %100 MeOH fraksiyonlarının HPLC kromatogramları

E: Isoflavones (Iso)

G: St. John's Wort (SJW)

F: Saw Palmetto Berries (SPB)

H: Valerian Root Extract (VRE)

SPB, SJW ve VRE örneklerinde 8 izoflavon standardı da (daidzin, glycitin, genistin, daidzein, glisitein, genistein, formononetin, biyokanın A) saptanamamıştır. Iso örneğinde ise glycitein (Rt: 32.81 dk) saptanmıştır.

III.2.4. St. John's Wort (SJW) ile İleri Çalışmalar

III.2.4.1. Etkin Madde İzolasyon ve Saflaştırması

Ekstraksiyon

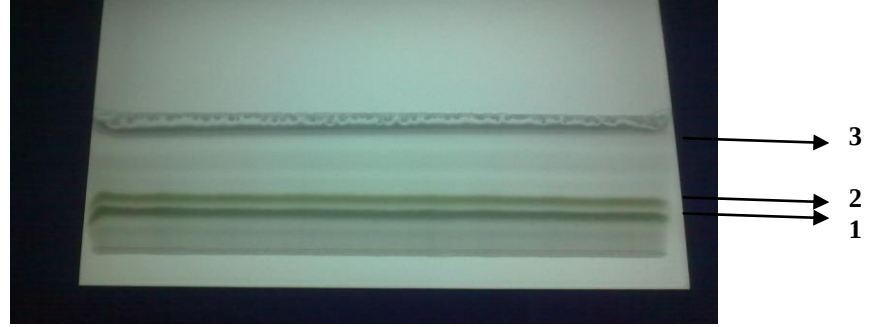
St. John's Wort bitkisel gıda destek ürünü içinde bulunan potansiyel endokrin bozucu etkisi olan molekülleri saflaştırmak amacıyla ileri çalışmalar yapılmıştır. Bu amaçla ilk olarak ekstraksiyon gerçekleştirilmiştir. Aynı ayrı metanol ve etilasetat ile yapılan katı-sıvı ekstraksiyonların İTK profilleri incelendiğinde içeriğin çok daha zengin görülen metanol ekstresinin daha üstün olduğu saptanmış ve ileri işlemlerde metanol ile ekstraksiyonun yapılmasına karar verilmiştir.

Poliamid Kolon Uygulaması

SJW-metanol ekstresi poliamid kolono uygulanarak artan metanol oranlarında (%20 MeOH, %40 MeOH, %50 MeOH, %60 MeOH, %70 MeOH, %100 MeOH) solvent geçirilerek toplam 60 fraksiyon elde edilmiştir.

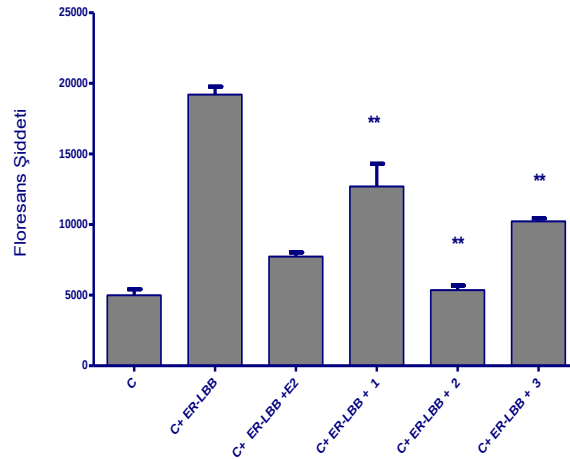
Fraksiyonların İTK'ları yapılmış, benzer fraksiyonlar birleştirilerek, ER α -LBB'ye bağlanma potansiyelleri değerlendirilmiştir. En yüksek bağlanma potansiyeline sahip fraksiyonunun (aktif fraksiyon) ileri analizine geçilmiştir. Bağlanma afinitesi deneylerinde örnekler DMSO ile çözülmemektedir. Biyolojik olarak aktif bulunan fraksiyonda aktiviteden sorumlu moleküllerin elde edilebilmesi için yapılacak preparatif İTK çalışmalarında DMSO polar ve kaynama noktası yüksek (188.5 -189.5 °C) bir çözügen olduğundan aktif fraksiyonun su ve etilasetat ile sıvı-sıvı ekstraksiyonu yapılmıştır. Elde edilen DMSO-su ve etilasetat fraksiyonlarının İTK profilleri incelendiğinde etilasetat fraksiyonuna aktif moleküllerin geçtiği tespit edilmiştir. Elde edilen etilasetat fraksiyonunun preparatif

RP- İTK'sı yapılmış ve 3 bant elde edilmiştir. Bantlar **Şekil III.19'de** gösterildiği üzere 1, 2, 3 olarak kodlanmıştır.



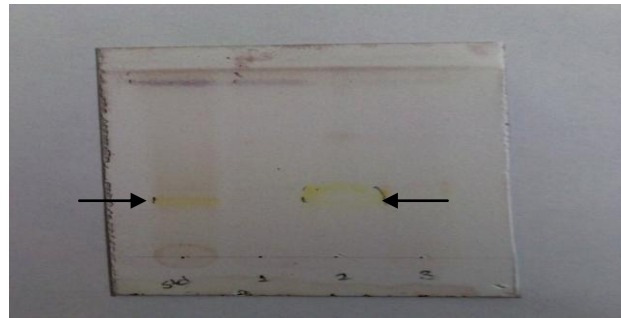
Şekil III.19. Etilasetat fraksiyonunun preparatif RP-İTK uygulaması sonucunda elde edilen bantlar (254 nm)

Bantların ER α -LBB'ye bağlanma potansiyelleri **Şekil III.20'de** gösterilmiştir. ER α -LBB'ye bağlanma afinitesi en yüksek bant 2'de görülmüştür.



Şekil III.20. Bant 1, 2, 3' ün 1.5 mg/ml konsantrasyonlarında ER α -LBB'ye bağlanma potansiyelleri. **: p < 0.0001

Bantların İTK'sı yapılmış ve 2. bantın referans fraksiyonda bulunduğu ve artefakt olmadığı doğrulanmıştır. (**Şekil III.21**)



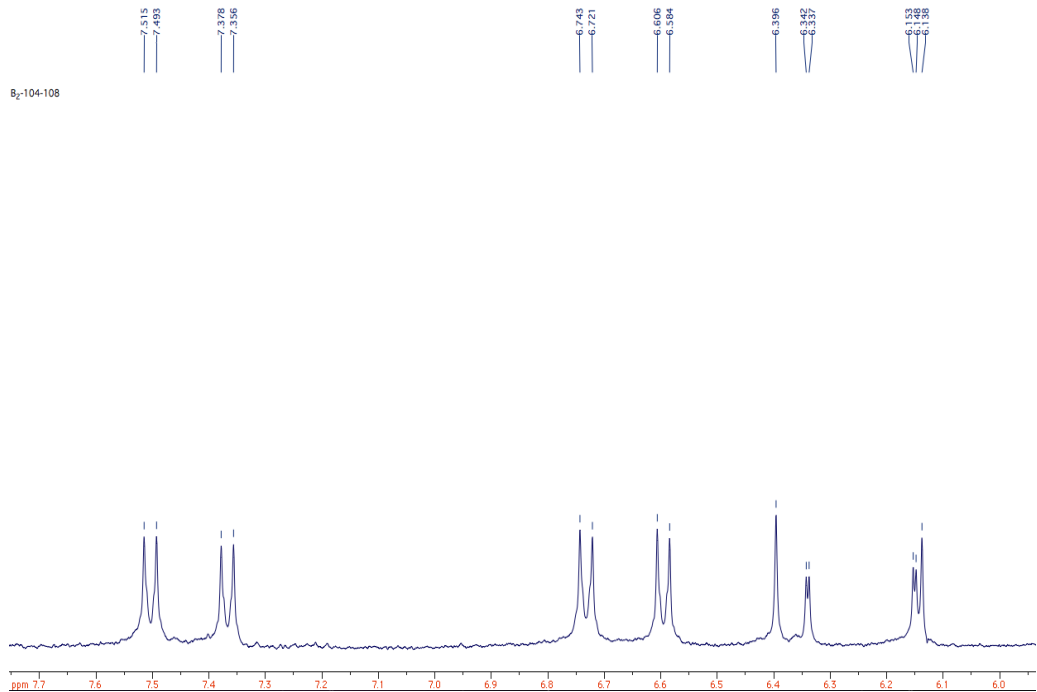
Şekil III.21. Standart, bant 1, bant 2, bant 3'ün silika İTK'sı Solvent sistemi 10:10:3 hekzan:etilasetat:metanol

Bant 2 safsızlıklar taşıdığı için sephadex LH-20 kolona MeOH ile uygulanmıştır. Elde edilen alt fraksiyonların İTK profilleri incelenmiş ve saf olarak saptanan fraksiyonlar birleştirilerek yoğunlaştırılmıştır.

NMR Analizi

Elde edilen saf aktif fraksiyonun NMR analizi yapılmıştır. Saf olduğu ^1H -NMR ile de doğrulanan molekülün ilk değerlendirmede bir biflavonoit olduğu anlaşılmıştır. Literatür araştırmasında bugüne kadar *Hypericum* türlerinde üç adet biflavon rapor edildiği saptanmıştır. Bunlar 3,8-biapigenin (%0.1–0.5), amentoflavon (%0.01–0.05) ve 6,8-diquercetin'dir (200).

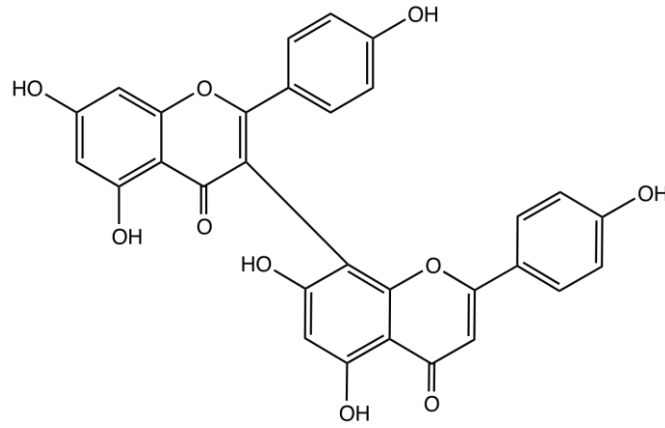
Yaptığımız ön değerlendirme de elde ettiğimiz bileşiğin bağlanma noktalarının amentoflavon'dan farklı olduğu anlaşılmıştır. Aşağıda biflavonoit yapısındaki molekül için önerilen iki yapısal fragment sunulmuştur (Şekil III.23). A ve B fragmentlerinin çizimde işaretlenmiş olan noktalardan herhangi birinden C-C köprüsü ile bağlı olduğu öngörülmektedir.



Şekil III.22. Aktif fraksiyonun ^1H NMR spektrumu (400 MHz, DMSO- d_6).

Kimyasal yapının tam olarak aydınlatılabilmesi için metanol-d4 içinde çözölen örneğe tekrar NMR analizi (Varian AS 400) ve kütle spektroskopisi (LC/ESI-TOFMS) yapılmıştır*. Elde edilen veriler doğrultusunda kimyasal yapının 3',8''-biapigenin ($C_{30}H_{18}O_{10}$) olduğu saptanmıştır (Şekil III.23).

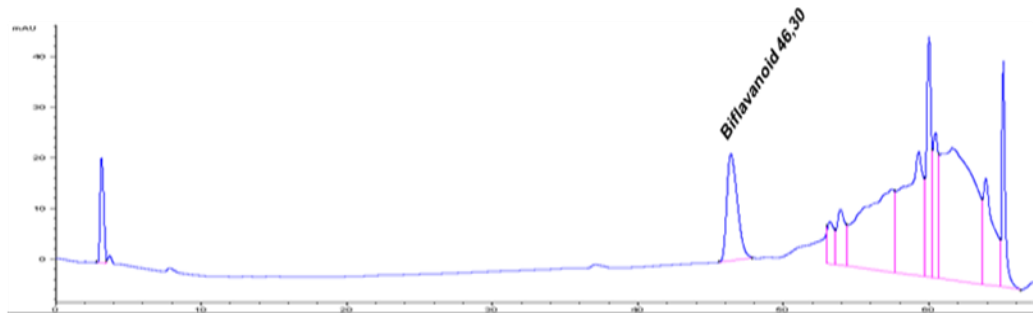
**NMR ve LC/ESI-TOFMS analizleri Prof. Dr. Erdal Bedir tarafından yapılmıştır.*



Şekil III.23. NMR ve LC/ESI-TOFMS analizi sonrasında saptanan 3',8''-biapigenin'in kimyasal yapısı

HPLC Analizi

Elde edilen saf aktif fraksiyon izoflavon analizinde uyguladığımız HPLC yöntemi ile analiz edilmiştir. Saf aktif fraksiyonun alıkonma zamanı 46.30 dk olarak saptanmıştır (Şekil III.24).



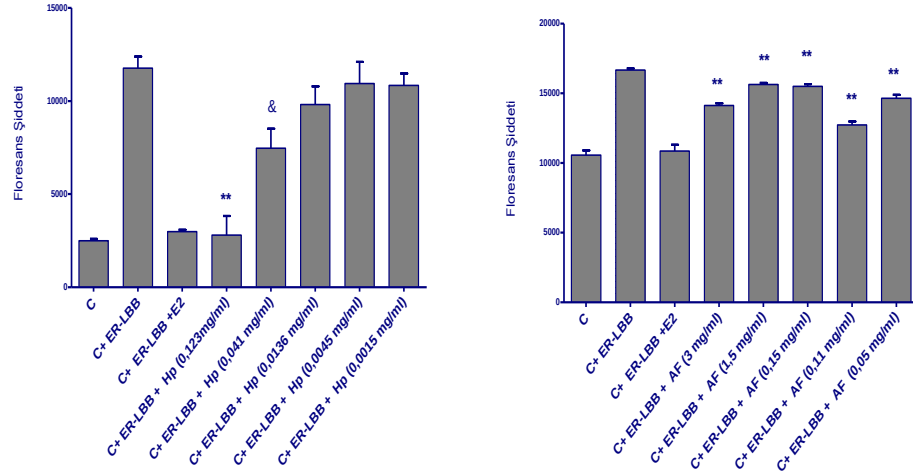
Şekil III.24. HPLC analizinde saf aktif fraksiyona ait kromatogram.

III.2.4.2. SJW'ün Bilinen Bileşikleri ile İleri Çalışmalar

Hypericum türleri için tipik olan naftodiantron yapısındaki hiperisin ve biflavon yapısındaki amentoflavon ticari olarak temin edilmiş, ER α -LBB'ye bağlanma potansiyelleri belirlenmiş ve HPLC analizleri yapılmıştır.

III.2.4.2.1. Hiperisin ve Amentoflavon'un ER α -LBB'ye bağlanma potansiyelleri

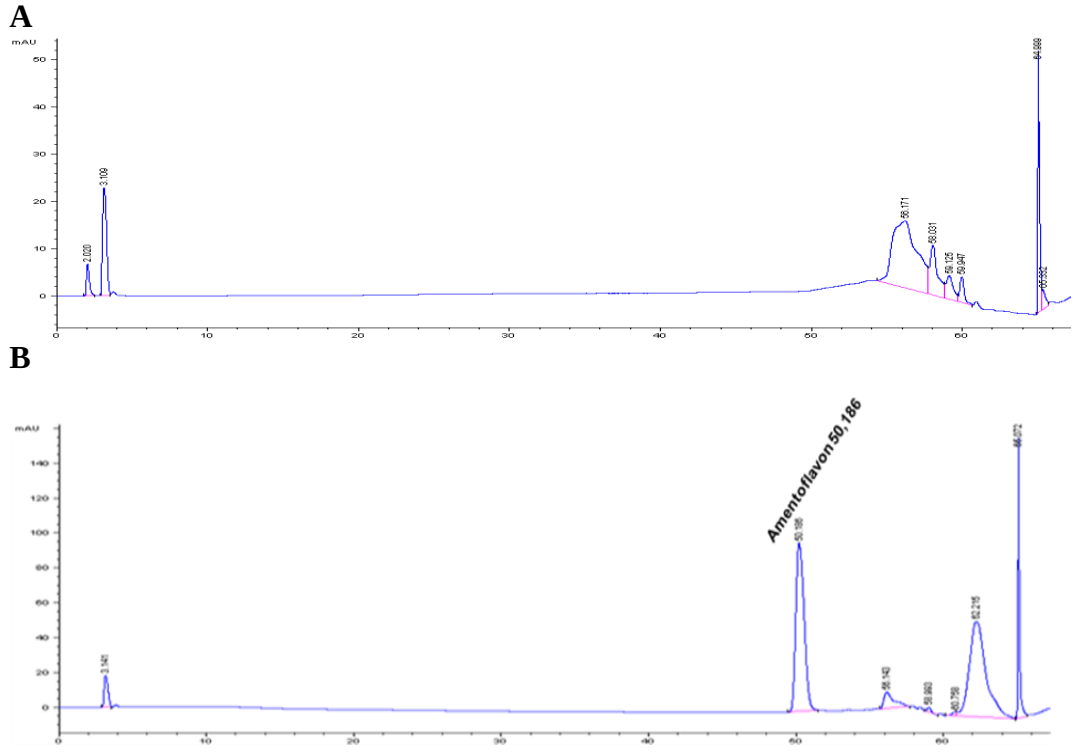
Hiperisin ve amentoflavonun 5 farklı konsantrasyonda ER α -LBB'ye bağlanma potansiyelleri incelenmiş ve sonuçlar Şekil III.25'da verilmiştir.



Şekil III.25. Hiperisin ve Amentoflavon'un ER α -LBB'ye bağlanma potansiyelleri

III.2.4.2.2. Hiperisin ve Amentoflavon'un HPLC Analizleri

Hiperisin ve amentoflavon izoflavon analizinde uyguladığımız HPLC yöntemi ile analiz edilmiştir. HPLC analizi ile elde edilen kromatogramlar Şekil III.26'de gösterilmektedir. Uyguladığımız HPLC sisteminde hiperisin saptanamazken, amentoflavona ait tek bir pik 50.19 dk'da saptanmıştır.

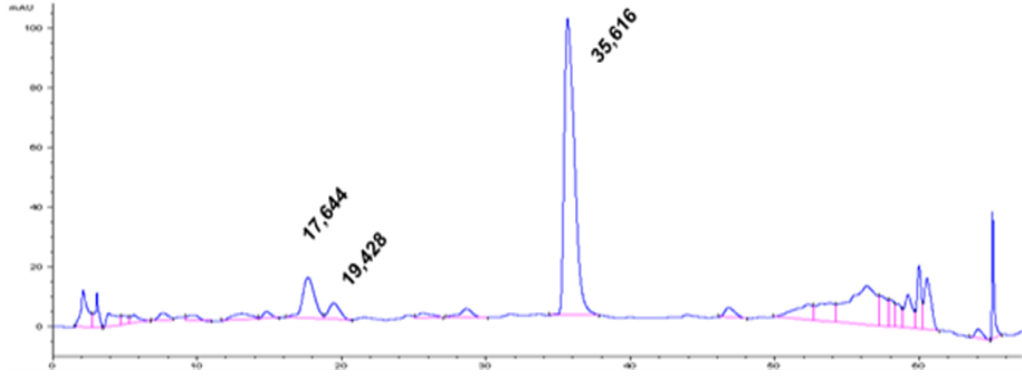


Şekil III.26. A:Hiperisin ve **B:** Amentoflavon'un HPLC analizi sonucunda elde edilen kromatogramlar

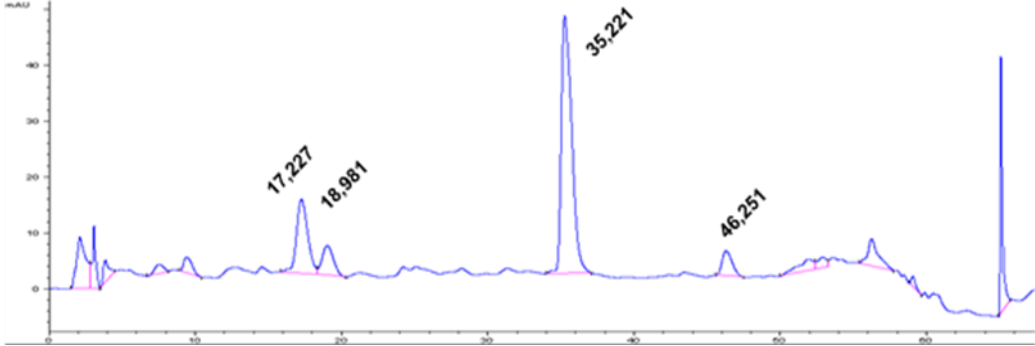
III.2.4.3. Farklı Üretim Numaralı SJW Ürünlerinin İzoflavon İçerik Analizi

SJW'ün farklı üretim numaralı ürünlerinin (SJW-No:1 ve SJW-No:2) içeriklerinin incelenmesi amacıyla iki farklı ürünün metanol ekstraktları hazırlanmış ve RP kolon sonrasında elde edilen %40MeOH ve %100 MeOH fraksiyonları HPLC ile analiz edilmiştir. Sonuçlar Şekil III.27 ve Şekil III.28'da gösterilmektedir.

SJW - No:1

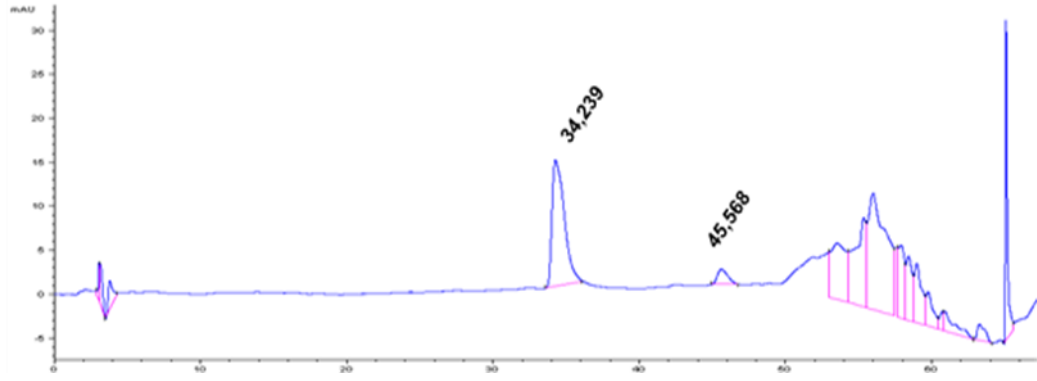


SJW - No:2

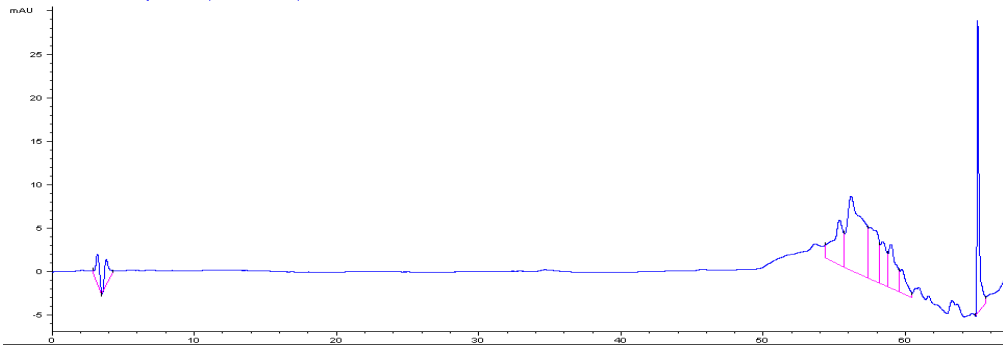


Şekil III.27. SJW-No:1 ve SJW-No:2 %40MeOH fraksiyonlarının HPLC analizi sonucunda elde edilen kromatogramlar

SJW - No:1



SJW - No:2



Şekil III.28. SJW-No:1 ve SJW-No:2 %100 MeOH fraksiyonlarının HPLC analizi sonucunda elde edilen kromatogramları

BÖLÜM IV

IV. TARTIŞMA VE SONUÇ

Özellikle son yirmi yıldır EB'lara maruziyetin hayvan ve insanlarda oluşturabileceği olumsuz etkiler konusunda bilimsel çalışma ve yasal düzenlemeler olduğu kadar spekülasyon toplumsal tartışmalar da sürmektedir. Bugün östrojenik etkinliği bilinen çevresel EB'lar arasında organoklorlu pestisitler, poliklorlu bifeniller, polibromlu bifeniller, ftalatlar ve parabenleri sayabiliriz (201). EB kimyasallara çevresel maruziyet ile kuşlarda, balıklarda ve memelilerde azalmış fertilité, azalmış yumurtlama, erkeklerde demaskülinizasyon ve feminizasyon ile dişilerde maskülinizasyon ve timsahlarda penis boyunda küçülme gözlemlendiği belirtilmiştir (202-206). Deney hayvanlarında yapılan çalışmalar da söz konusu ksenoöstrojenlere maruziyetin üreme toksisitesine neden olduğunu doğrulamış; sıçanlarda Leydig hücre hiperplazisi (207), tavşanlarda azalmış fertilité (208) ve fare ile sıçanlarda değişen tipte üreme sistem toksisitesi (209, 210) bildirilmiştir.

Bu bulgular, çevresel ya da besin zinciri yolu ile ksenoöstrojenlere maruz kalan, diyet içerisinde gerek EB kontaminantları gerekse doğal bileşenler olan fitoöstrojenleri alan insanlarda da benzer toksik etkilerin görülme olasılığını düşündürmüştür. Son 50 yıldır, bu olasılığı destekler nitelikte, erkek üreme sistemi gelişimi ve fonksiyonlarında artan bozulma bildiren çok sayıda veri yayınlanmıştır (204, 211, 212). Bu yayınlarda, dünyanın farklı bölgelerinde farklı oranlarda olmakla birlikte genel olarak semen hacim ve sperm sayısında azalma, hipospadias, kriptorşidizm gibi ürogenital anomaliler ve testis kanseri görülme sıklığında artış bildirilmekte ve bu olumsuz gelişmelerde çevresel EB'lara maruziyetin de rolü olabileceği ifade edilmektedir.

İnsanların EB maddelere maruziyeti ana olarak diyetle olmaktadır. Diyet içerisinde östrojenik etkiye sahip bileşenler besinlere bulaşan çevresel kirlilikler olabileceği gibi, üretim ve ambalajlama sırasında bulaşan kontaminantlar ya da tamamen besinin doğal bileşenleri (fitoöstrojenler) olabilmektedir. Fitoöstrojenler, bitkiler içerisinde bulunan biyolojik aktif bileşikler olup etkilerini ana olarak östrojen reseptörü (ER) ile etkileşip östrojene yanıt veren genlerin ekspresyonunu düzenleyerek, östrojen biyosentez ve metabolizmasında yer alan enzimleri inhibe ederek, tiroid hormon biyosentezini etkileyerek, protein kinazları inhibe ederek ve hücre döngüsü ile birlikte proliferasyon, farklılaşma ve apoptoz yollarını etkileyerek, topoizomerazı inhibe ederek ve antioksidan reaksiyonlar ile gösterebilmektedirler (20).

Fitoöstrojenler insan sağlığı üzerinde genellikle olumlu etkileri ile bilinmektedir. Fitoöstrojenlerin menopoz semptomlarının giderilmesi, osteoporozun ve kardiyovasküler hastalıkların önlenmesi ve antikanserojen etkileri olduğunu bildiren çok sayıda çalışma bulunmaktadır (213, 214). Bununla birlikte fitoöstrojenlerin östrojenik etkileri dolayısı ile özellikle prepubertal erkek çocuklar, erkekler ve postmenapozal kadınlarda üreme ve gelişimsel toksisiteye neden olmaları olasılığı da söz konusudur.

Tüm bu veriler ışığında bu tez çalışmasında ülkemizde marketler ve/veya internet ortamında satışa sunulan bitkisel gıda destek ürünlerinden bazıları olası endokrin bozucu etkileri yönünden taranmıştır. Analiz edilen bitkisel gıda destek ürünleri literatür araştırmaları dikkate alınarak östrojenik / antiöstrojenik aktiviteleri araştırılmamış olanlar arasından seçilmiştir. Aynı zamanda bilinen kimyasal içerikleri yönünden EB etkisi saptanan bitkilere benzer oluşları, dolayısı ile potansiyel östrojenik/antiöstrojenik etkiye sahip bitkiler seçimde göz önünde

bulundurulmuştur. Östrojenik etkisi bulunduğu bildirilen bitkilerde izoflavon ve/veya kumestanlar dışında flavon (kersetin ve kamferol gibi) veya flavanonların da (kateşin) etkiden sorumlu olabileceğini ifade eden çalışmalar bulunmaktadır. Dolayısı ile yapılarında bu kimyasal grupları içeren bitkisel ürünler seçimde dikkate alınmıştır. Buna ilave olarak steroidal çekirdeğe sahip moleküllerce zengin olan bitkiler de östrojenik/antiöstrojenik etkiler ihtiva edebileceğinden çalışmaya dahil edilmiştir (*Tribulus*, *Astragalus* vb.). Yaptığımız ön araştırma ile ülkemizde en çok tüketilen ürünler belirlenmiş ve bunlar arasından diğer seçim kriterlerimiz ile çakışanlar belirlenerek analiz edilmesine karar verilmiştir. Bunun yanı sıra fitoöstrojen içeriğinin yüksek olduğu ve EB etkileri bilinen bazı ürünler (Saw Palmetto, Isoflavones, Black Cohosh gibi) pozitif kontrol olarak çalışmaya dahil edilmişlerdir. Tez kapsamında çalışılan bitkisel gıda destek ürünleri (piyasada bulunan orijinal isimleri ile) sırasıyla *Astragalus* Root Extract, Black Cohosh Root Extract, Dong Quai, Grape Seed Extract, Green Tea Leaf Extract, Gotu Kola, Isoflavones, Saw Palmetto Berries, *Spirulina*, St. John's Wort, *Tribulus terrestris* ve Valerian Root Extract'tır.

Endokrin bozucu etki tayini için kullanılan *in vitro* yöntemler arasında yarışmalı ligand bağlanma yöntemi, hücre proliferasyon ölçümleri, rekombinant reseptör analizleri ve maya-temelli tarama yöntemleri sayılabilir. Bu yöntemlerden her biri östrojenik ya da antiöstrojenik etki ile sonuçlanan etki zincirinin farklı bir kısmını ölçmekte ve her bir yöntem farklı avantaj ve dezavantajlar taşımaktadır (215-217). Bu tez çalışması kapsamında floresans bir izleme ligandının kullanıldığı *in vitro* östrojen reseptörüne bağlanma yöntemi ile bitkisel diyet destek ürünlerinin östrojen reseptörüne bağlanma potansiyelini amaçlanmıştır. Yöntem *in vivo* ve diğer *in vitro* biyoölçüm yöntemlerine kıyasla bazı üstünlüklere sahiptir:

1. Deney hayvanı kullanımına alternatif olduğu için deney hayvanı kullanımını azaltmaktadır. Bu üstünlüğü nedeniyle diğer *in vitro* testler gibi ABD ve Avrupa Birliği ülkelerinde özellikle tercih edilmektedir.
2. Reseptöre bağlanma biyoölçüm yöntemlerinde genellikle izleme ligandı olarak radyoaktif bileşikler (radyoligand) kullanılmakta ki bu durum özel çalışma alanı, atıkların özel şartlarda uzaklaştırılması, özel eğitilmiş personel çalıştırılması ve ölçümlerin radyoaktif sayaçlar ile yapılması nedeniyle maliyetin artmasına neden olmakta ve çalışmaları güçleştirmektedir.
3. Geleneksel reseptöre bağlanma biyoölçüm yöntemlerinde genellikle dokulardan izole edilen reseptörler ya da ticari olarak satın alınan östrojen reseptörleri kullanılmaktadır. Bunlardan ilki radyoligand bağlanma yönteminde kullanılabilmekte ancak yüksek protein içeriği nedeniyle florimetrik ölçümlerde kullanılamamaktadır. Ticari olarak satın alınan reseptörler ise çalışmaları yurt dışına bağımlı kılmakta ve yurt dışına büyük miktarlarda para ödemesi yapmayı gerektirmektedir. Ayrıca satın alınan insan reseptörleri dayanıksız oldukları için çoğu zaman transport sırasında bile aktivite kaybedebilmekte ve çalışmalarda sorun oluşturmaktadır. Bu çalışmada ise yurt dışındaki bir merkezden temin edilen “rekombinant-ER ligand bağlanma bölgesi” taşıyan *Escherichia coli* hücreleri çoğaltılarak yüksek miktarlarda reseptör eldesi mümkün olabilmektedir.

Bilinen en potent fitoöstrojenler olan izoflavonlar bitkilerin yapısında glikozitleri şeklinde bulunmaktadır. Canlılar tarafından tüketilmeleri sonrasında hızla metabolize olarak aglikonlarına dönüştükleri ve söz konusu aktiviteden bu metabolitlerin sorumlu olduğu bilinmektedir. Dolayısı ile tez çalışması kapsamında diyet destek ürünlerinin etanolik ekstraksiyonu normal ve asidik hidroliz şeklinde hazırlanmıştır. Asidik hidroliz çalışması yapılmasının amacı insanlardaki

metabolizmasını taklit ederek olası aktif izoflavon aglikonların (varsa) oluşmasına olanak vermektedir.

Tez çalışmasına, bilinen fitoöstrojenler olan genistein ve daidzein içeren “Isoflavones” preparatı pozitif kontrol olarak dahil edilmiştir. “Black Cohosh” ve “Saw Palmetto Berries” örneklerinin ise literatürde östrojenik/antiöstrojenik etkileri olduğunu bildiren çalışmalar olmakla birlikte bu etkinin mekanizması ve etkiden sorumlu aktif moleküllerin neler olduğu yönünde bir veri bulunmamaktadır. “Isoflavones” örneğine ait hem normal hem de asidik hidroliz ekstrelerinin % 40 ve %100'lük metanol fraksiyonlarında ER bağlanma afinitesi olduğu saptanmış, ancak bu etkinin asidik hidroliz örneklerinde daha belirgin olduğu gözlenmiştir. Bu bulgu asidik hidroliz işleminin glikozid yapıda olan genistin, daidzin ve glisitin'in biyolojik olarak aktif aglikonlarına dönüşmelerini sağlamada başarılı olduğunu göstermektedir. “Isoflavones” örneğinin normal ekstresinde de aktivite görülmesi ise preparatın üzerinde de belirtildiği şekilde ‘genistein ve daidzein’ aglikonlarını da içermesi ile açıklanabilir. Tüm taranan bitkisel diyet destek ürünleri arasında “Isoflavones”, “Black cohosh root extract”, “St. John’s Wort”, “Saw palmetto berries” örneklerinin gerek AH gerekse N ekstrelerinin, hem %40 hemde %100 MeOH fraksiyonlarının değişen oranlarda fakat benzer şekilde reseptöre bağlanma afinitesi gösterdiği görülmüştür. Bunlardan “Isoflavones”, “Black cohosh root extract” ve “Saw palmetto berries” literatürde östrojenik/antiöstrojenik etkileri olduğu bildirilen, bu nedenle çalışmaya pozitif kontrol olarak eklediğimiz örneklerdir. Bunlar dışındaki tek örnek “St. John’s Wort” olup hem AH hemde N ekstrelerinin, hem %40 hem de %100 MeOH fraksiyonlarında yüksek bağlanma afinitesi gösterdiği saptanmıştır. SJW örneğinin reseptöre bağlanma affinitesinin %100 MeOH fraksiyonunda daha belirgin olduğu, AH ya da N ekstraksiyon

örnekleri karşılaştırıldığında ise biyolojik aktivitede anlamlı bir farka neden olmadığı saptanmıştır. Bu bulgu olası aktif bileşenlerin suda çözünürlüğünün daha düşük olduğunu düşündürmektedir. Jürgenliemk ve Nahrstedt (218) SJW içindeki fenolik yapıları bileşenler olan flavanoid glikozitlerinin suda iyi çözündüğünü; flavanoid aglikonlarının, hiperisinin azalan oranlarda onları takip ettiğini; hiperforinin ise çok düşük miktarlarda suda çözündüğünü bildirmişlerdir. Bu bilgi, aktiviteden sorumlu bileşenlerin yukarıdaki sıranın tersi yönünde olabileceğini düşündürmektedir. Örneklerden GTLE'nin da ön tarama testlerinde %100 MeOH fraksiyonlarında bağlanma potansiyeline sahip olduğu görülmüştür. Bu etkinin doğrulanması amacıyla aktif olduğu saptanan örneklerin altı farklı konsantrasyonda ER'ne bağlanma potansiyelleri incelenmiş ve bağlanma eğrileri hazırlanmıştır. GTLE ile yapılan doza bağımlı çalışmada gerek AH gerekse N ekstrelerde doza bağımlı bir bağlanma saptanamamıştır (**Şekil III.12**). SJW örneğinin altı farklı konsantrasyonu ile yapılan çalışmada ise hem AH hemde N ekstrele ait %100 MeOH fraksiyonlarında IC₅₀ değerleri sırasıyla 1.58 mg/ml ve 2.2 mg/ml olan bağlanma eğrileri elde edilmiştir (**Şekil III.14**). Sonuç olarak örneklerimiz arasında SJW'nün ER'ne bağlanma afinitesine sahip olduğu ve bu nedenle potansiyel östrojenik / antiöstrojenik etkisi olabileceği saptanmıştır. SJW örneğinin daha sonra farklı solvanlar ile yapılan ekstraksiyon çalışmalarında da benzer bağlanma eğrileri elde edilmiştir (veriler sunulmamıştır).

Fitoöstrojenlerden diyet içerisinde en fazla bulunan ve en yüksek östrojenik etkiye sahip moleküllerin dahil olduğu grup izoflavonlardır. Asya halkı diyetinde yoğun olarak tüketilen soya ve soya bazlı yiyeceklerin (tofu, tempeh, miso gibi) diyet içerisindeki en yüksek fitoöstrojen düzeyine sahip ürünler olduğu bildirilmiştir. Diyet içerisinde yer alan gıdaların fitoöstrojen içerikleri (nitel ve nicel

olarak) gelişmiş ülkelerde yapılan çalışmalar ile belirlenmiş ve popülasyonun maruziyet düzeyleri belirlenerek toksikolojik risk değerlendirmesi için veri tabanları oluşturulmuştur (219-223). Ülkemiz için ise, bildiğimiz kadarı ile benzeri bir veri tabanı oluşturulmamıştır.

Bu eksiklikten hareketle tez çalışmasının bir diğer amacı da seçilen bitkisel diyet destek ürünleri içerisinde izoflavon yapısındaki 8 adet fitoöstrojenin (genistein, daidzein, glycitein, genistin, daidzin, glycitin, formononetin, biochanin A) varlığını ve var ise miktarlarını saptamak olarak belirlenmiştir. Bu amaçla Luthria ve ark.'nın (198) metodu modifiye edilmiş ve labortuvarımız şartlarında uygulanabilir hale gelen HPLC-UV detektör sisteminin kullanıldığı metod ile biyolojik olarak aktif bulunan örnekler analiz edilmiştir. Örneklerimizden sadece “Isoflavones”un asidik hidroliz örneklerinin %100'lük metanol fraksiyonları içinde genistein, genistin, daidzein, daidzin ve glisitein saptanmıştır ki bunlar bilinen soya izoflavonlarıdır ve bu örnek içinde bulunmaları yöntemin başarılı bir şekilde çalıştığını göstermektedir. Daidzin ve genistinin aglikonlarına kıyasla belirgin biçimde düşük konsantrasyonda bulunuyor olması asidik hidroliz işleminin örnek ekstrelerindeki glikozit bağlarını kırarak bağlı izoflavonları aglikonlarına dönüştürmede başarılı olduğunu göstermiştir. Diğer test edilen diyet destek ürünlerinde (BC asit hidroliz örneğindeki glycitein dışında) söz konusu standart maddeler saptanamamıştır. Çalışmamızda ER'ne bağlanma afinitesi en yüksek bulunan St. John's Wort asidik hidroliz örneğinin %100 metanol fraksiyonunununa ait kromatogramda aktiviteden sorumlu olabilecek belirgin bir pik gözlenmiştir ($R_t = 34.48$ dk). Bu pik, analizi yapılan sekiz standart izoflavon ile benzer alıkonma zamanına sahip olmadığı için yapısının ileri teknikler ile belirlenmesi amaçlanmış ve yapılan NMR analizi ile molekülün “biflavonoid” yapısında olduğu

belirlenmiştir. Literatürde St. John's Wort'ün farklı biflavonoidler ve naftodiantronlar içerdiği belirtilmektedir (200). Bunlardan naftodiantron yapısındaki hiperisin ve biflavonoid yapısındaki amentoflavon saf halde ticari olarak temin edilmiş ve ER α -LBB'ye bağlanma potansiyelleri ile HPLC analizleri yapılmıştır. Hiperisin doza bağımlı olarak östrojen reseptörüne artan afinite gösterirken, amentoflavonda benzer bir etkiye rastlanmamıştır (**Şekil III.25**). HPLC ile analizleri yapıldığında ise uygulanan metod ile hiperisin örneği hiçbir pik vermezken amentoflavonun alıkonma zamanı 50.19 dk olan belirgin bir pik verdiği saptanmıştır. Ancak alıkonma zamanı göz önüne alındığında St. John's Wort örnek ekstrelerimizin içindeki aktiviteden sorumlu olabilecek moleküle ait pikin amentoflavon olmadığı saptanmıştır.

Sonuç olarak, bu tez çalışmasında literatürde bildirilen antidepresan etkisinin yanı sıra SJW örneğinin olası bir östrojen reseptörüne bağlanma aracılığı endokrin etkisinin olabileceği saptanmıştır. Bu etkiden sorumlu aktif molekülün biflavanoid yapısında olduğu da bildirilmiştir.

Fitoöstrojenlerce zengin diyetleri yaşamları boyunca tüketen toplumlarda (Japonlar, Çinliler ve Koreliler gibi) toksisite vakası bildirilmediği gibi hormon bağımlı kanser türlerinden meme kanseri görülme sıklığının doğulu kadınlarda batılılara kıyasla 7 kat daha düşük olduğu rapor edilmiştir (201, 224). Bir başka çalışmada ise Asyalı kadınların ABD'e göçünü takiben birkaç nesil içinde değişen yaşam stili ve diyet içeriği ile birlikte meme kanser vakalarında belirgin artış olduğu bildirilmiştir (225). Ancak son yıllarda yapılan epidemiyolojik çalışmalar göstermiştir ki yüksek konsantrasyonlarda soya izoflavonlarına bebeklikten itibaren maruz kalınması durumunda (Asyalılarda olduğu gibi) koruyucu etki gözlenirken yaşamın ileri dönemlerinde başlayan maruziyet durumunda (batılılarda ve

ülkemizde olduğu gibi) yararlı etki görülmediği gibi advers etkilere rastlanabilmektedir (23). Fitoöstrojenlerin doğulu toplumlarda infertiliteyi azaltmayışının nesiller boyu yüksek düzeylerde östrojenik diyet tüketiminin popülasyonda istenmeyen etkilerine karşı rezistans gelişmesi nedeniyle olabileceği düşünülmektedir (34).

Bitkisel gıda destek ürünleri biyolojik olarak aktif maddeler içermelerine karşın tüm dünyada ilaçlara kıyasla daha az denetime tabi tutulmakta ve reçetesiz olarak insanlara ulaşmaktadır. Ülkemizde de bu ürünlere ruhsat verme yetkisini 2004 yılından bu yana Sağlık Bakanlığı ile Tarım ve Köy işleri Bakanlığı paylaşmaktadır. Tarım Bakanlığı'nın daha az belge istemesi nedeniyle çok az firma Sağlık Bakanlığı'ndan ruhsat almakta ve Tarım Bakanlığının prosedürleri ürünlerin sağlıklı takibini mümkün kılmamaktadır. Dolayısı ile etken maddeler içeren bu ürünler farmasötik preparatların ruhsat alım öncesi geçmeleri gereken pek çok teste tabi tutulmamakta, gerek zincir marketler gerekse internet üzerinden denetimsiz ve bilgilendirme hizmeti olmaksızın satılmakta, sonuç olarak da bu ürünlerin kullanımı ile istenmeyen/beklenmeyen birçok advers etki bildirilmektedir.

Tez çalışması kapsamında elde ettiğimiz bulgular bu ürünlerin daha sıkı güvenlik değerlendirme çalışmalarına tabi tutulması gerektiğini göstermektedir. Yapılacak advers etki/toksisite profil belirleme çalışmaları sonucunda gerekli uyarıların, ilaçlarda olduğu gibi diyet destek ürünlerinin de üzerinde ürün bilgisi olarak belirtilmesinin toplum sağlığı açısından yararlı olacağı düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

1. Susanne Hiller-Sturmhöfel, Andrzej Bartk. (1998). The Endocrine System. *Alcohol Health & Research World*, Vol. 22, No.3
2. Ernest Hodgson, (2004), *A Textbook Of Modern Toxicology Third edition*, John Wiley & Sons, Chapter 17, pp 299-304
3. Global assessment of the state-of-the-science of endocrine disruptors. *Endocrinology and Endocrine Toxicology*, 2002; WHO/PCS/EDC/02.2, chapter3
4. Carlson R. (2002). Silent Spring. In: Lear L, Wilson EO, eds. 40th ed. Boston: Houghton Mifflin Company
5. Sullivan FM., Barlow SM. (1979). Congenital malformations and other reproductive hazards from environmental chemicals. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 205:91-110
6. Finkelstein JS., Mc Cully WF., MacLaughlin DT., Godine JE., Crowley WF. (1988). The mortician's mystery. Gynecomastia and reversible hypogonadotropic hypogonadism in an embalmer. *N Eng J Med* 318:961-5
7. European Workshop on the Impact of Endocrine Disruptors on Human Health and Wildlife. (1996). *Report of Proceedings, 2–4 December, Weybridge, UK*
8. EPA (U.S. Government Environmental Protection Agency). (1998). *Endocrine Disruptor Screening Testing Advisory Committee (EDSTAC), final report*
9. Hess-Wilson JK., Knudsen KE. (2006). Endocrine disrupting compounds and prostate cancer. *Cancer Letters*. 241(1):1-12
10. T.A. Ternes., P. Kreckel., J. Müller. (1999). Behaviour and occurrence of estrogens in municipal sewage treatment plants — II. Aerobic batch experiments with activated sludge. *Sci. Total Environ*. 225, 91–99

11. T.A. Ternes., M. Stumpf., J. Müller., R.-D. Wilken., K. Haberer., M. Servos. (1999). Behavior and occurrence of estrogens in municipal sewage treatment plants I. Investigations in Germany, Canada and Brazil. *Sci. Total Environ.* 225, 81–90
12. J. Lintelmann et al.(2003). Endocrine Disruptors In The Environment (Iupac Technical Report), *Pure And Applied Chemistry* 75, 631–681
13. W. R. Kelce., C. R. Stone., S. C. Laws., L. G. Gray., J. A. Kemppainen., E. M. Wilson. (1995). Persistent DDT metabolite p,p'-DDE is a potent androgen receptor antagonist. *Nature* 373, 581–585
14. J. C. Cook, L. S. Mullin, S. R. Frame L. B. Biegel. (1993). Interlaboratory comparison of four in vitro assays for assessing androgenic and antiandrogenic activity of environmental chemicals. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 119, 195–204
15. Soontornchat S, Li MH, Cooke PS, Hansen LG. (1994). Toxicokinetic and Toxicodynamic Influences on Endocrine Disruption by Polychlorinated Biphenyls. *Environ Health Perspect.* Jun;102(6-7):568–571
16. Safe and V. Krishnan. (1995). Chlorinated hydrocarbons: estrogens and antiestrogens. *Toxicol. Lett.* 82/83, 731–736
17. C. Bettin., J. Oehlmann., E. Stroben. (1996). Impact of Tributyltin and Triphenyltin on Ivory Shell (*Babylonia japonica*) Populations *Helgol. Meeresunters.* 50, 299–317
18. J. Oehlmann, E. Stroben, U. Schulte-Oehlmann, B. Bauer, P. Fiorini, B. Markert. (1996). Tributyltin biomonitoring using prosobranchs as sentinel organisms. *Fres. J. Anal. Chem.* 354, 540–545
19. S. Safe, F. Wang, W. Porter, R. Duan, A. McDougal. (1998). In vitro estrogenicity of polybrominated diphenyl ethers, hydroxylated PDBEs, and polybrominated bisphenol A compounds. *Toxicol. Lett.* 102–103, 343–347

20. UK Committee on Toxicity. (2003). Phytoestrogens and health. *UK: Committee on Toxicity of Chemicals in Food, Consumer Products and the Environment.*
21. Cao G., Sofic E., Prior R.L. (1997). Antioxidant and prooxidant behavior of flavonoids: structure-activity relationships. *Free Radic Biol Med*, 22(5):749-60
22. Manach C., Scalbert A., Morand C., Rémésy C., Jiménez L. (2004). Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am J Clin Nutr*, 79(5):727-47
23. Teresa Cornwell, Wendie Cohick, Ilya Raskin. (2004). Dietary phytoestrogens and health. *Phytochemistry* 65 pp 995–1016
24. Kitaoka M, Kadokawa H, Sugano M, Ichikawa K, Taki M, Takaishi S, Iijima Y, Tsutsumi S, Boriboon M, Akiyama T. (1998). Prenylflavonoids: a new class of non-steroidal phytoestrogen (Part1). Isolation of 8-isopentenylnaringenin and an initial study on its structure-activity relationship. *Planta Med.* 1998, 64:511-515
25. Milligan SR, Kalita JC, Heyerick A, Rong H, De Cooman L, De Keukeleire D. (1999). Identification of a potent phytoestrogen in hops (*Humulus lupulus* L.) and beer. *J Clin Endocrinol Metab.* 84:2249-2252.
26. Miyamoto M, Matsushita Y, Kiyokawa A, Fukuda C, Iijima Y, Sugano M, Akiyama T. (1998). Prenylflavonoids: a new class of non-steroidal phytoestrogen (Part 1). Estrogenic effects of 8-isopentenylnaringenin on bone metabolism. *Planta Medica* 64:516-519.
27. Adlercreutz H. (2002). Phyto-oestrogens and cancer. *Lancet Oncol*, 3(6):364-73
28. Bingham S.A., Atkinson C., Liggins J., Bluck L., Coward A. (1998). Phyto-oestrogens: where are we now? *Br J Nutr*, 79(5):393-406
29. Setchell K.D., Cassidy A. (1999). Dietary isoflavones: biological effects and relevance to human health. *J Nutr.* 129(3):758S-767S

30. Safe S.H. (1995). Environmental and dietary estrogens and human health: is there a problem? *Environ. Health Perspect.* 103: 346–351
31. Setchell K.D., Cassidy A. (1999). Dietary isoflavones: biological effects and relevance to human health. *J Nutr.* 129(3):758S-767S
32. Safe S.H. (1995). Environmental and dietary estrogens and human health: is there a problem? *Environ. Health Perspect.* 103: 346–351.
33. Büyüktuncer Z., Başaran A.A. (2005). Fitoöstrojenler ve sağlıklı yaşamdaki önemleri. *Hacettepe Üniv Eczacılık Fak Derg*;25:79-94
34. West M.C., Anderson L., McClure N., Lewis S.E. (2005). Dietary oestrogens and male fertility potential. *Hum Fertil (Camb)*, 8(3):197-207
35. Tomar R.S., Shiao R. (2008). Early life and adult exposure to isoflavones and breast cancer risk. *J Environ Sci Health C Environ Carcinog Ecotoxicol Rev.* 26(2):113-73
36. Coxam V. (2008). Phyto-oestrogens and bone health. *Proc Nutr Soc*, 67(2):184-95.
37. Dang ZC, Lowik C. (2005). Dose-dependent effects of phytoestrogens on bone. *Trends Endocrinol Metab*,16(5):207-13
38. Setchell K.D. (2006). Assessing risks and benefits of genistein and soy. *Environ Health Perspect*, 114(6):A332-3
39. Sirtori C.R (2005). Phytoestrogens: end of a tale? *Ann Med*, 37(6):423-38
40. Mikkola T.S., Clarkson T.B. (2002). Estrogen replacement therapy, atherosclerosis, and vascular function. *Cardiovasc Res*, 53(3):605-19
41. Duncan A.M., Phipps W.R., Kurzer M.S. (2003). Phyto-oestrogens. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*, 17(2):253-71

42. Van der Schouw Y.T., Pijpe A., Lebrun C.E., Bots M.L., Peeters P.H., van Staveren W.A., Lamberts S.W., Grobbee D.E. (2002). Higher usual dietary intake of phytoestrogens is associated with lower aortic stiffness in postmenopausal women. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 22(8):1316-22
43. Anderson J.W., Johnstone B.M., Cook-Newell M.E. (1995). Meta-analysis of the effects of soy protein intake on serum lipids. *N Engl J Med*. 333(5):276-82
44. Jenkins D.J., Kendall C.W., Jackson C.J., Connelly P.W., Parker T., Faulkner D., Vidgen E., Cunnane S.C., Leiter L.A., Josse R.G. (2002). Effects of high- and low-isoflavone soyfoods on blood lipids, oxidized LDL, homocysteine, and blood pressure in hyperlipidemic men and women. *Am J Clin Nutr*, 76(2):365-72
45. Lichtenstein A.H. (1998). Soy protein, isoflavones and cardiovascular disease risk. *J Nutr*, 128(10):1589-92
46. Dai Q., Shu X.O., Jin F., Potter J.D., Kushi L.H., Teas J., Gao Y.T., Zheng W. (2001). Population-based case-control study of soyfood intake and breast cancer risk in Shanghai. *Br J Cancer*, 85(3):372-8
47. Wu A.H., Wan P., Hankin J., Tseng C.C., Yu M.C., Pike M.C. (2002). Adolescent and adult soy intake and risk of breast cancer in Asian-Americans. *Carcinogenesis*, 23(9):1491-6
48. Wuttke W., Jarry H., Seidlová-Wuttke D. (2007). Isoflavones safe-food additives or dangerous drugs? *Ageing Res Rev*. 6(2):150-88
49. Lamartiniere C.A., Cotroneo M.S., Fritz W.A., Wang J., Mentor-Marcel R., Elgavish A. (2002). Genistein chemoprevention: timing and mechanisms of action in murine mammary and prostate. *J Nutr*, 132(3):552S-558S
50. Wang T.T, Sathyamoorthy N., Phang J.M.(1996). Molecular effects of genistein on estrogen receptor mediated pathways. *Carcinogenesis*, 17(2):271-5

51. Sirtori C.R (2005). Phytoestrogens: end of a tale? *Ann Med*, 37(6):423-38
52. Guo J.M., Xiao B.X., Liu D.H., Grant M., Zhang S., Lai Y.F., Guo Y.B., Liu Q. (2004). Biphasic effect of daidzein on cell growth of human colon cancer cells. *Food Chem Toxicol* 42(10):1641-6
53. Goodman M.T., Wilkens L.R., Hankin J.H., Lyu L.C., Wu A.H., Kolonel L.N. (1997). Association of soy and fiber consumption with the risk of endometrial cancer. *Am J Epidemiol*, 146(4):294-306
54. Endocrine Disruptor Screening and Testing Advisory Committee (EDSTAC) Final Report (1998) . www.epa.gov/endo/pubs/edspoverview/finalrpt.htm
55. Oecd Guideline For Testing Of Chemicals. TG 415. One-Generation Reproduction Toxicity Study. www.oecd.org/dataoecd/18/12/1948458.pdf
56. Oecd Guideline For Testing Of Chemicals. TG 416. Two-Generation Reproduction Toxicity. 22 January 2001
57. Oecd Guideline For Testing Of Chemicals. TG 407. Repeated Dose 28-day Oral Toxicity Study in Rodents. 3 October 2008
58. N.M. Saarinen, P. Penttinen. (2006) Tools to evaluate estrogenic potency of dietary Phytoestrogens: a consensus paper from The eutheumatic network “phytohealth”, *genes & nutrition vol. 1, no. 3/4, pp. 143-158*
59. Wenlin Shao and Myles Brown. (2003). Advances in estrogen receptor biology: prospects for improvements in targeted breast cancer therapy. *Breast Cancer Research Vol 6 No 1*
60. Aedin Cassidy and Marian Faughnan, (2000), Phyto-oestrogens through the life cycle, *Proceedings of the Nutrition Society* 59, 489–496

61. George G. J. M. Kuiper. (1997). Comparison of the Ligand Binding Specificity and Transcript Tissue Distribution of Estrogen Receptors {alpha} and {beta} *Endocrinology* 138: 863-870
62. George G. J. M. Kuiper. (1998). Interaction of Estrogenic Chemicals and Phytoestrogens with Estrogen Receptor β - - *Endocrinology* 139: 4252-4263
63. Nagel SC (1998). The effective free fraction of estradiol and xenoestrogens in human serum measured by whole cell uptake assays: physiology of delivery modifies estrogenic activity. *Proc Soc Exp Biol Med.* ;217(3):300-9.
64. Paige, L. A., Christensen, D. J., Gron, H., Norris, J. D., Gottlin, E. B., Padilla, K. M., Chang, C. Y., Ballas, L. M., Hamilton, P. T., McDonnell, D. P. et al. (1999). Estrogen receptor (ER) modulators each induce distinct conformational changes in ER alpha and ER beta. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96, 3999-4004
65. Ashini L. Wijayaratne, Susan C. Nagel, Lisa A. Paige, Dale J. Christensen, John D. Norris, Dana M. Fowlkes and Donald P. McDonnell. (1999). Comparative Analyses of Mechanistic Differences Among Antiestrogens. *Endocrinology* Vol. 140, No. 12
66. Norris, J.D., Paige, L.A., Christensen, D.J., Chang, C.Y., Huacani, M.R., Fan, D.J., Hamilton, P.T., Fowlkes, D.M., and McDonnell, D.P. (1999) Peptide antagonist of the human estrogen receptor. *Science* 285, 744-746.
67. Hyder, S.M., Chiappetta, C., and Stancel, G.M. (1999) Interaction of human estrogen receptors alpha and beta with the same naturally occurring estrogen response elements. *Biochemical Pharmacology* 57, 597-601.
68. Nikov, G.N., Hopkins, N.E., Boue, S., and Alworth, W.L. (2000) Interaction of dietary estrogens with human estrogen receptors and the effect on estrogen receptor-estrogen response element complex formation. *Environmental Health*

Perspectives 108, 867-872. Boyer, M., Poujol, N., Margeat, E., and Royer, C.A. (2000)

69. Quantitative characterization of the interaction between purified human estrogen receptor alpha and DNA using fluorescence anisotropy. *Nucleic Acids Research* 28, 2494-2502.

70. Curtis, S.W., and Korach, K.S. (1990) Uterine estrogen receptor interaction with estrogen-responsive DNA sequences in vitro: effects of ligand binding on receptor-DNA complexes. *Molecular Endocrinology* 4, 276-286.

71. Nishikawa, J., Saito, K., Goto, J., Dakeyama, F., Matsuo, M., and Nishihara, T. (1999) New screening methods for chemicals with hormonal activities using interaction of nuclear hormone receptor with coactivator. *Toxicology and Applied Pharmacology* 154, 76-83.

72. McDonnell, D.P., Clemm, D.L., Hermann, T., Goldman, M.E., and Pike, J.W. (1995) Analysis of estrogen receptor function in vitro reveals three distinct classes of antiestrogens. *Molecular Endocrinology* 9, 659-669.

73. Shelby, M.D., Newbold, R.R., Tully, D., Chae, K., and Davis, V.L. (1996) Assessing environmental chemicals for estrogenicity using a combination of in vitro and in vivo assays. *Environmental Health Perspectives* 104, 1296-1300.

74. McDonnell, D.P. (1999) The molecular pharmacology of SERMs. *Trends Endocrinology and Metabolism* 10, 301-311.

75. Mueller, S.O. (2002) Overview of in vitro tools to assess the estrogenic and antiestrogenic activity of phytoestrogens. *Journal of Chromatography B* 777, 155-165.

- 76.** Kanno, S., Hirama, S., and Kayano, F. (2004) Effects of the phytoestrogen coumestrol on RANK-ligand-induced differentiation of osteoclasts. *Toxicology* 203, 211-220.
- 77.** Markiewicz, L., Garey, J., Adlercreutz, H., and Gurbide, E. (1993) In vitro bioassays of non-steroidal phytoestrogens. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 45, 399-405.
- 78.** Rosenberg Zand, R.S., Jenkins, D.J., Brown, T.J., and Diamandis, E.P. (2002) Flavonoids can block PSA production by breast and prostate cancer cell lines. *Clinical Chimica Acta* 317, 17-26.
- 79.** Pelissero, C., Lenczowski, M.J., Chinzi, D., Davail-Cuisset, B., Sumpter, J.P., and Fostier, A. (1996). Effects of flavonoids on aromatase activity, an in vitro study. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 57, 215-223.
- 80.** Gray, L.E., Ostby, J., Sigmon, R., Ferrell, J., Rehnberg, G., Linder, R., Cooper, R., Goldman, J., and Laskey, J. (1988) The development of a protocol to assess reproductive effects of toxicants in the rat. *Reproductive Toxicology* 2, 281-287.
- 81.** Soto, A.M., Sonnenschein, C., Chung, K.L., Fernandez, M.F., Olea, N., and Serrano, F. (1995) The E-SCREEN assay as a tool to identify estrogens: an update on estrogenic environmental pollutants. *Environmental Health Perspectives* 103, 113-122.
- 82.** Soto, A.M., Michaelson, C.L., Prechtel, N.V., Weill, B.C., Sonnenschein, C., Serrano, F., and Olea, N. (1998) Assays to measure estrogen and androgen agonists and antagonists. *Advances in Experimental Medicine and Biology* 444, 9-23.
- 83.** Cotroneo, M.S., Wang, J., Eltoum, I.-E.A., and Lamartiniere, C.A. (2001) Sex steroid receptor regulation by genistein in the prepubertal rat uterus. *Molecular and Cellular Endocrinology* 173, 135-145

- 84.** Newbold, R.R., Jefferson, W.N., Padilla-Banks, E., Walker, V.R., and Pena, D.S. (2001) Cell response endpoints enhance sensitivity of the immature mouse uterotrophic assay. *Reproductive Toxicology* 15, 245-252
- 85.** Jefferson, W.N., Padilla-Banks, E., Clark, G., and Newbold, R.R. (2002) Assessing estrogenic activity of phytochemicals using transcriptional activation and immature mouse uterotrophic responses. *Journal of Chromatography B* 77, 179-189.
- 86.** Diel, P., Thomae, R.B., Caldarelli, A., Schmidt, S., Laudenbach- Leschowski, U., and Vollmer, G. (2004) The differential ability of the phytoestrogen genistein and of estradiol to induce uterine weight and proliferation in the rat is associated with a substance specific modulation of uterine gene expression. *Molecular and Cellular Endocrinology* 221, 21-32.
- 87.** Ashby, J., Lefevre, P.A., Tinwell, H., Odum, J., and Owebs, W. (2004) Testosterone-stimulated weanlings as an alternative to castrated male rats in the Hershberger anti-androgenic assay. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 39, 229-238.
- 88.** Suzuki, T., Kitamura, S., Khota, R., Sugihara, K., Fujimoto, N., and Ohta, S. (2005) Estrogenic and antiandrogenic activities of 17 benzophenone derivatives used as UV stabilizers and sunscreens. *Toxicology and Applied Pharmacology* 203, 9-17.
- 89.** Stroheker, T., Cabaton, N., Berges, R., Lamothe, V., Lhuguenot, J.-C., and Chagnon, M.-C. (2003) Influence of dietary soy isoflavones on the accessory sex organs of the Wistar rat. *Food Chemistry and Toxicology* 41, 1175-1183.
- 90.** Yamada, T., Kunimatsu, T., Miyata, K., Yabushita, S., Sukata, T., Kawamura, S., Seki, T., Okuno, Y., and Mikami, N. (2004) Enhanced rat Hershberger assay

appears reliable for detection of not only (anti) androgenic chemicals but also thyroid hormone modulators. *Toxicology Science* 79, 64-74.

91. Gray, L.E., Ostby, J., Wilson, V., Lambright, C., Bobseine, K., Hartig, P., Hotchkiss, A., Wolf, C., Furr, J., Price, M., Parks, L., Cooper, R.L., Stoker, T.E., Laws, S.C., Degitz, S.J., Jensen, K.M., Kahl, M.D., Korte, J.J., Mäkinen, E.A., Tietge, J.E., and Ankley, G.T. (2002) Xenoendocrine disrupters-tiered screening and testing. Filling key datagaps. *Toxicology* 181-182, 371-382.

92. Upton R. Astragalus. (2010). Encyclopedia of Dietary Supplements. *Second Edition*, pp. 29-36

93. Upton R. ed. Astragalus Root. Monograph. Santa Cruz, CA: American Herbal Pharmacopoeia, 1999.

94. Dan Su, Han-Yi Li, Hao-Ran Yan, Peng-Fei Liu, Liu Zhang and Jian-Hua Cheng (2009). Astragalus improved cardiac function of adriamycin-injured rat hearts by upregulation of SERCA2a expression. *The American Journal of Chinese Medicine*, Vol. 37, No. 3, 519–529

95. Chu DT, Wong WL, Mavligit GM. (1988). Immunotherapy with Chinese medicinal herbs I: immune restoration of local xenogeneic graft-versus-host reaction in cancer patients by fractionated *Astragalus membranaceus* in vitro. *J Clin Lab Immunol* 25(3):119–123

96. Shimizu N, Tomoda M, Kanari M, et al. (1991). An acidic polysaccharide having activity on the reticuloendothelial system from the root of *Astragalus mongholicus*. *Chem Pharm Bull* 39(11):2969–2972

97. Tomoda M, Shimuzu N, Ohara N and et al. A reticuloendothelial system-activating glycan from the roots of *Astragalus membranaceus*. *Phytochemistry* 1992; 31(1):63–66

98. Rou M, Renfu X. (1983). The effect of Radix Astragali on Mouse marrow hemopoiesis. *J Tradit Chin Med* 3(3):199–204
99. Na D, Liu FN, Miao ZF, et al. (2009). Astragalus extract inhibits destruction of gastric cancer cells to mesothelial cells by antiapoptosis. *World J Gastroenterol* 15(5):570–577
100. Wagner H, Bauer R, Peigen X, et al. (1997). Radix Astragali [Huang Qi]. *Chin Drug Monogr Anal* 1(8):18
101. Chu DT, Lepe-Zuniga J, Wong WL, et al. (1988). Fractionated extract of Astragalus membranaceus, a Chinese medicinal herb, potentiates LAK cell cytotoxicity generated by low dose of recombinant interleukin-2. *J Clin Lab Immunol* 26(3):183–187
102. Chang HM, But P. (1987). Pharmacology and Applications of Chinese Materia Medica.
103. McKenna DJ, Jones K, Humphrey S, Hughes K. (2001). Black cohosh: efficacy, safety, and use in clinical and preclinical applications. *Alter Ther* 7: 93–100
104. Compton JA, Culham A, Jury SLP. (1998). Reclassification of *Actaea* to include *Cimicifuga* and *Souliea* (Ranunculaceae): phylogeny inferred from morphology, nrDNA ITS, and cpDNA trnL - F sequence variation. *Taxon* 4:593–634.
105. Daniel S. Fabricant, Elizabeth C. Krause, and Norman R. Farnsworth (2010). Black Cohosh. *Encyclopedia of Dietary Supplements. Second Edition*, pp 60-74
106. Nuntanakorn P, Jiang B, Einbond LS, Yang H, Kronenberg F, Weinstein IB, Kennelly EJ. (2006). Polyphenolic constituents of *Actaea racemosa*. *J Nat Prod* 69:314–318

107. Stromeier S, Petereit F, Nahrstedt A. (2005). Phenolic esters from the rhizomes of *Cimicifuga racemosa* do not cause proliferation effects in MCF - 7 cells. *Planta Med*; 71:495–500
108. Chen SN, Li W, Fabricant DS, Santarsiero BD, Mesecar A, Fitzloff JF, et al. (2002). Isolation, structure elucidation, and absolute configuration of 26 - deoxyacteol from *Cimicifuga racemosa* and clarification of nomenclature associated with 27 - deoxyacteol. *J Nat Prod*; 65:60 –605
109. Bedir E, Khan IA. (2000). Cimicifugoside A: a new cycloartanol xyloside from the rhizome of *Cimicifuga racemosa*. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*; 48:425–427
110. Chen SN, Lankin DC, Nikolic D, et al. (2007). Chlorination diversifies *Cimicifuga racemosa* triterpene glycosides. *J Nat Prod* 70(6):1016–102
111. Wang HK, Sakurai N, Shih CY, et al. (2005). LC/TIS-MS fingerprint profiling of *Cimicifuga* species and analysis of 23-epi-26- deoxyacteol in *Cimicifuga racemosa* commercial products. *J Agric Food Chem*; 53(5):1379–1386
112. Sun LR, Qing C, Zhang YL, et al. (2007). Cimicifoetisides A and B, two cytotoxic cycloartane triterpenoid glycosides from the rhizomes of *Cimicifuga foetida*, inhibit proliferation of cancer cells. *Beilstein J Org Chem* 3:3
113. Tsukamoto S, Aburatani M, Ohta T. (2005). Isolation of CYP3A4 inhibitors from the black cohosh (*Cimicifuga racemosa*). *Evid Based Complement Alternat Med* 2(2):223–226
114. Kennelly EJ, Baggett S, Nuntanakorn P, Ososki AL, Mori SA, Duke J, et al. (2002). Analysis of thirteen populations of black cohosh for formononetin. *Phytomedicine* 9:461–467

- 115.** Nuntanakorn P, Jiang B, Yang H, Cervantes - Cervantes M, Kronenberg F, Kennelly EJ. (2007). Analysis of polyphenolic compounds and radical scavenging activity of four American *Actaea* species. *Phytochem Anal* 18:219 – 228
- 116.** Onorato J, Henion JD. (2001). Evaluation of triterpene glycoside estrogenic activity using LC/MS and immunoaffinity extraction. *Anal Chem* 73(19):4704–4710
- 117.** Kruse SO, Lohning A, Pauli GF, et al. (1999). Fukiic and piscidic acid esters from the rhizome of *Cimicifuga racemosa* and the in vitro estrogenic activity of fukinolic acid. *Planta Med* 65(8):763–764
- 118.** Okamoto R, Sakamoto S, Noguchi K.(1976). Effects of ferulic acid on FSH, LH and prolactin levels in serum and pituitary tissue of male rats (author's transl). *Nippon Naibunpi Gakkai Zasshi* 52(9):953–958
- 119.** de Man E, Peeke HV. (1982). Dietary ferulic acid, biochanin A, and the inhibition of reproductive behavior in Japanese quail (*Coturnix coturnix*). *Pharmacol Biochem Behav* 17(3):405–411
- 120.** Gorewit RC. (1983). Pituitary and thyroid hormone responses of heifers after ferulic acid administration. *J Dairy Sci* 66(3):624–629
- 121.** Ozaki Y, Ma JP. (1990). Inhibitory effects of tetramethylpyrazine and ferulic acid on spontaneous movement of rat uterus in situ. *Chem Pharm Bull (Tokyo)* 38(6):1620–1623
- 122.** Ruhlen RL, Haubner J, Tracy JK, et al. (2007). Black cohosh does not exert an estrogenic effect on the breast. *Nutr Cancer* 59(2):269–277
- 123.** Kretzschmar G, Nisslein T, Zierau O, et al. (2005). No estrogen-like effects of an isopropanolic extract of rhizoma *Cimicifugae racemosae* on uterus and vena cava of rats after 17 day treatment. *J Steroid Biochem Mol Biol* 97(3):271–2

124. Düker EM, Kopanski L, Jarry H, et al. (1991). Effects of extracts from *Cimicifuga racemosa* on gonadotropin release in menopausal women and ovariectomized rats. *Planta Med* 57(5):420–424
125. Jarry H, Harnischfeger G, Duker E. (1985). The endocrine effects of constituents of *Cimicifuga racemosa*. 2. In vitro binding of constituents to estrogen receptors. *PlantaMed* (4):316–319.
126. Liu ZP, Yu B, Huo JS, et al. (2001). Estrogenic effects of *Cimicifuga racemosa* (black cohosh) in mice and on estrogen receptors in MCF-7 cells. *J Med Food* 4(3):171–178
127. Lohning A, Verspohl E, Winterhoff H. (1999). Pharmacological studies on the dopaminergic activity of *C. racemosa*. In: *23rd International LOF-Symposium on “Phyto- Oestrogens”*. Belgium
128. Zhu DP. (1987). Dong quai. *Am J Chin Med* 15:117–125
129. Kupfersztain C, Rotem C, Fagot R, Kaplan B. (2003). The immediate effect of natural plant extract, *Angelica sinensis* and *Matricaria chamomilla* (Climex) for the treatment of hot flushes during menopause. A preliminary report. *Clin Exp Obstet Gynecol* 30:203–206
130. Yim TK, Wu WK, Pak WF, Mak DH, Liang SM, Ko KM. (2000). Myocardial protection against ischaemia –reperfusion injury by a *Polygonum multiflorum* extract supplemented “ Dang - Gui decoction for enriching blood”, a compound formulation, *ex vivo*. *Phytother Res* 14:195–199
131. Hirata JD, Swiersz LM, Zell B, Small R, Ettinger B. (1997). Does dong quai have estrogenic effects in postmenopausal women? A double - blind, placebo - controlled trial. *Fertil Steril* 68:981 – 986

132. Dong ZB, Li SP, Hong M, Zhu Q. (2005). Hypothesis of potential active components in *Angelica sinensis* by using biomembrane extraction and high performance liquid chromatography. *J Pharm Biomed Anal* 38:664 – 669
133. Lu G - H, Chan K, Leung K, Chan C - L, Zhao Z - Z, Jiang Z - H. (2005). Assay of free ferulic acid and total ferulic acid for quality assessment of *Angelica sinensis*. *J Chromatogr A* 1068: 209 – 219
134. Song-gang J, Yi-feng C, Yu-tian W, Xue-ping Y, Dong sheng L. (1999). Determination of ferulic acid in *Angelica sinensis* and Chuanxiong by capillary zone electrophoresis. *Biomed Chromatogr* 13:333-334.
135. Zhu DP. (1987). Dong quai . *Am J Chin Med* 15: 117 – 125.
136. Liu J, Burdette JE, Xu H, Gu C, van Breemen RB, Bhat KP, et al. (2001). Evaluation of estrogenic activity of plant extracts for the potential treatment of menopausal symptoms. *J Agric Food Chem* 49:2472–2479
137. Ko FN, Wu TS, Liou MJ, Huang TF, Teng CM. (1989). Inhibition of platelet thromboxane formation and phosphoinositides breakdown by osthole from *Angelica pubescens*. *Thromb Haemost* 62:996 – 999
138. Goh SY, Loh KC. (2001). Gynaecomastia and the herbal tonic “ dong quai”. *Singapore Med J* 42:115–116
139. Page RL II, Lawrence JD. (1999). Potentiation of warfarin by dong quai. *Pharmacotherapy* 19:870- 876
140. Song-gang J, Yi-feng C, Yu-tian W, Xue-ping Y, Dong sheng L. (1999). Determination of ferulic acid in *Angelica sinensis* and Chuanxiong by capillary zone electrophoresis. *Biomed Chromatogr* 13:333-334.
141. Mills S, Bone K. (2000) .Principles and Practice of Phytotherapy. Edinburg
142. Zhu DPQ. (1987). Dong quai. *Am J Chin Med* 15(3, 4):117–125

- 143.** Yang HY, Chen CF. (1992). Acute toxicity and bioactivity evaluation of commonly used Chinese drugs: Analgesic Chinese drugs. *J Chin Med* 3(2):41–59
- 144.** Zhu YZ, Yang QL, Zhang PY. (1989). Antiarrhythmic effect of the total acid of *Angelica sinensis*. *Lanzhou Med Coll* 15(3):125–128
- 145.** Ozaki Y, Ma JP. (1990). Inhibitory effects of tetramethylpyrazine and ferulic acid on spontaneous movement of rat uterus in situ. *Chem Pharm Bull (Tokyo)* 38(6):1620–1623
- 146.** Xie FX, Tao JY. (1985). Central inhibitory effect of ligustilide of *Angelica sinensis*. *Shanxi Zazhi* 14(8):59-62
- 147.** Page RL, Lawrence JD. (1999). Potentiation of warfarin by dong quai. *Pharmacotherapy* 19(7):870–876
- 148.** Tyagi A, Agarwal R, Agarwal C. (2003). Grape seed extract inhibits EGF-induced and constitutively active mitogenic signaling but activates JNK in human prostate carcinoma DU145 cells: possible role in antiproliferation and apoptosis. *Oncogene* 22(9):1302–1316
- 149.** Wang YJ, Thomas P, Zhong JH, et al. (2009). Consumption of grape seed extract prevents Amyloid-beta deposition and attenuates inflammation in brain of an Alzheimer's disease mouse. *Neurotox Res* 15(1):3–14
- 150.** Tebib K, Besancon P, Rouanet J-M. (1994). Dietary grape seed tannins affect lipoproteins, lipoprotein lipases and tissue lipids in rats fed hypercholesterolemic diets. *J Nutr* 124(12):2451–245
- 151.** Stefanovic V, Savic V, Vlahovic P, et al. (2000). Reversal of experimental myoglobinuric acute renal failure with bioflavonoids from seeds of grape. *Ren Fail* 22(3):255–266

152. Takahashi T, Kamiya T, Hasegawa A, et al. (1999). Procyanidin oligomers selectively and intensively promote proliferation of mouse hair epithelial cells in vitro and activate hair follicle growth in vivo. *J Invest Dermatol* 112(3):310–316
153. Seo K, Jung S, Park M, et al. (2001). Effects of leucocyanidines on activities of metabolizing enzymes and antioxidant enzymes. *Biol Pharm Bull* 24(5):592–593
154. Bagchi D, Ray SD, Patel D, et al. (2001). Protection against drug and chemical-induced multiorgan toxicity by a novel IH636 grape seed proanthocyanidin extract. *Drugs Exp Clin Res* 27(1):3–15
155. Yamakoshi J, Saito M, Kataoka S, et al. (2002). Safety evaluation of proanthocyanidin-rich extract from grape seeds. *Food Chem Toxicol* 40(5):599–607
156. Shengmin Sang, Joshua D. Lambert, Chi-Tang Ho, and Chung S. Yang. (2010). Green Tea Polyphenols. *Encyclopedia of Dietary Supplements Second Edition*, pp402-410
157. M.Obayed Ulah. (2009). Antimicrobial, Cytotoxic and Antioxidant Activity of *Centella asiatica*, *European Journal of Scientific Research Vol.30 No.2* pp.260-264
158. Sushma Tiwari, Sangeeta Gehlot, Gambhir I.S. (2011). *Centella Asiatica*: A Concise Drug Review With Probable Clinical Uses. *Journal of Stress Physiology & Biochemistry*, Vol. 7 No. 1 pp. 38-44
159. Mark Messina. (2010). Isoflavones. *Encyclopedia of Dietary Supplements Second Edition*, pp. 439-449
160. Edward M. (2010). Croom and Michael Chan. Saw Palmetto Berries. *Encyclopedia of Dietary Supplements Second Edition*, pp. 700-710

161. Jensen GS, Ginsberg MS, Drapeau C. (2001). Blue-green algae as an immuno-enhancer and biomodulator. *JANA* 3(4):24–30
162. Bauersachs T, Compaor'e J, Hopmans EC, et al. (2009). Distribution of heterocyst glycolipids in cyanobacteria. *Phytochemistry* 70:2034–2039
163. Greeson JM, Sanford B, Monti DA. (2001) . St. John's wort (*Hypericum perforatum*): a review of the current pharmacological, toxicological, and clinical literature. *Psychopharmacology* 153: 402– 414 Greeson JM
164. Field HL, Monti DA, Greeson JM, Kunkel EJ. (2000). St. John's wort. *Int J Psychiatry Med* 30:203-219
165. Barnes J, Anderson LA, Phillipson JD. (2001). St. John's wort (*Hypericum perforatum* L.) A review of its chemistry, pharmacology and clinical properties. *J Pharm Pharmacol* 53:583–600
166. Schwarz JT, Cupp MJ. (2000). St. John's Wort. *Toxicology and clinical pharmacology of herbal products*. Totowa, NJ: Humana Press; 67–78
167. Cosmetic Ingredient Review Expert Panel. Final report on the safety assessment of *Hypericum perforatum* extract and *Hypericum perforatum* oil. (2001). *Int J Toxicol* 20 (Suppl2): 31–39
168. Deltito J, Beyer D. (1998). The scientific and popular literature on the use of St. John ' s wort in the treatment of depression. *J AffectDisord* 51:345–351
169. Kim HL, Streltzer J, Goebert D. (1999). St. John's wort for depression: a meta-analysis of well-defined clinical trials. *J Nerv Ment Dis* 187:532–538
170. Hypericum Depression Trial Study Group. (2002). Effect of *Hypericum perforatum* (St John's Wort) in major depressive disorder a randomized controlled trial. *JAMA* 287:1807–1814

171. Nahrstedt A, Butterweck V. (1997) . Biologically active and other chemical constituents of the herb *Hypericum perforatum* L. *Pharmacopsychiatry* 30; 129 – 134
172. Draves AH, Walker SE. (2003). Analysis of the hypericin and pseudohypericin content of commercially available St. John's Wort preparations. *Can J Clin Pharmacol* 10 114 –118
173. von Eggelkraut-Gottanka SG, Abu Abed S, Muller W, Schmidt PC. (2002). Quantitative analysis of the active components and the by - products of eight dry extracts of *Hypericum perforatum* L. *Phytochem Anal* 13; 170–176
174. Wagner H, Bladt S. (1994). Pharmaceutical quality of *Hypericum* extracts. *J Geriatr Psychiatry Neurol* 7 (Suppl 1) 34 –38
175. Jerry M. Cott. (2010). St. John's Wort. *Encyclopedia of Dietary Supplements Second Edition*, pp 727-737
176. Izzo AA. (2004). Drug interactions with St. John's Wort (*Hypericum perforatum*): a review of the clinical evidence. *Int J Clin Pharmacol Ther* 42: 139–148
177. Kostova & D. Dinchev. (2005). Saponins in *Tribulus terrestris* – chemistry and bioactivity. *Phytochemistry Reviews* 4: 111–137
178. A Bashir, M Tahir, W Samee and B Munir. (2009). Effects of *tribulus terrestris* on testicular development of immature albino rats, *Biomedica* vol.25
179. S. Grigorova, B. Kashamov, V. Sredkova, S. Surdjiiska, H. Zlatev. (2008). Effect Of *Tribulus Terrestris* Extract On Semen Quality And Serum Total Cholesterol Content In White Plymouth Rock-Mini Cocks. *Biotechnology in Animal Husbandry* 24 (3-4), p 139-146
180. Upton R. (2001). *Valeriana officinalis*. *J Altern Complement Med* 7: 15–11

- 181.** Barceloux D. G. (2008). *Medical Toxicology of Natural Substances*, ch94, p.628-633
- 182.** Lefebvre T, Foster BC, Drouin CE, Krantis A, Arnason JT, Livesey JF, Jordan SA. (2004). *In vitro* activity of commercial valerian root extracts against human cytochrome P450 3A4. *J Pharm Pharmaceut Sci* 7: 265–273
- 183.** Dharmaratne HR, Dhammika Nanayakkara NP, Khan IA. (2002). Epoxyvalerenic acid from *Valeriana officinalis*. *Planta Med* 68: 661–662
- 184.** Gao XQ, Bjork L.(2000). Valerenic acid derivatives and valepotriates among individuals, varieties and species of *Valeriana*. *Fitoterapia* 71:19–24
- 185.** Hazelhoff B, Jellema R, Grobben H, Malingre TM. (1982). Separation of valtrate and isovaltrate by means of preparative liquid chromatography. *Pharm Weekbl Sci* 4: 21–24
- 186.** Marder M, Viola H, Wasowski C, Fernandez S, Medina JH, Paladini AC. (2003). 6-Methylapigenin and hesperidin: new valeriana flavonoids with activity on the CNS. *Pharmacol Biochem Behav* 75: 537–545
- 187.** World Health Organization. (1999). *WHO monographs on selected medicinal plants. Volume I. Geneva: World Health Organization*; 267–276
- 188.** Violon C, Van Cauwenbergh N, Vercruysse A. (1983). Valepotriate content in different *in vitro* cultures of Valerianaceae and characterization of *Valeriana officinalis* L. callus during a growth period. *Pharm Weekbl Sci* 5: 20 –209
- 189.** Mikell JR, Ganzera M, Khan IA. (2001). Analysis of sesquiterpenes in *Valeriana officinalis* by capillary electrophoresis. *Pharmazie* 56: 946 – 948
- 190.** Shohet D, Willis RB, Stuart DL. (2001). Valepotriates and valerenic acids in commercial preparations of valerian available in Australia. *Pharmazie* 56: 860–863

- 191.** Taibi DM, Landis CA, Petry H, Vitiello MV. (2007). A systematic review of valerian as a sleep aid: safe but not effective. *Sleep Med Rev* 11: 209–230
- 192.** Lindahl O, Lindwall L. (1989). Double blind study of a valerian preparation. *Pharmacol Biochem Behav* 32: 106–1066
- 193.** Leathwood PD, Chauffard F. (1985). Aqueous extract of valerian reduces latency to fall asleep in man. *Planta Med* 51:144–148
- 194.** Balderer G, Borbely AA. (1985). Effect of valerian on human sleep. *Psychopharmacology (Berl)* 87: 406–409
- 195.** Marder M, Viola H, Wasowski C, Fernandez S, Medina JH, Paladini AC. (2003). 6 - Methylapigenin and hesperidin: new valeriana flavonoids with activity on the CNS. *Pharmacol Biochem Behav* 75:537–545
- 196.** Bodesheim U, Holzl J. (1997). [Isolation and receptor binding properties of alkaloids and lignans from *Valeriana offi cinalis* L.] *Pharmazie* 52: 386–391. [German].
- 197.** Gurer-Orhan H., Kool J., Vermeulen Nico P., Meerman John.H. (2005). A novel microplate reader-based high-throughput assay for estrogen receptor binding. *International Journal of Environmental and Analytical Chemistry* Vol.85 No.3 pp.149-161
- 198.** Devenand L. Luthria, Ronita Biswas, Savithiry Natarajan. (2007). Comparison of extraction solvents and techniques used for the assay of isoflavones form soybean, *Food Chemistry* 105:p.325–333
- 199.** Ji-Hu Zhang, Thomas D. Y. Chung and Kevin R. Oldenburg. (1994). A Simple Statistical Parameter for Use in Evaluation and Validation of High Throughput Screening Assays. *Biomol Screen* 4: 67

200. Zeb Saddiqe, Ismat Naeem, Alya Maimoona. (2010). A review of the antibacterial activity of *Hypericum perforatum* L. *Journal of Ethnopharmacology* 131 511–521
201. Darbre PD (2006) Environmental oestrogens, cosmetics and breast cancer. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 20: 121-43.
202. Colborn T, vom Saal FS, Soto AM. (1993) Developmental effects of endocrine-disrupting chemicals in wildlife and humans. *Environ Health Perspect.* 101: 378-384.
203. Schlumpf, M., Jarry, H., Wuttke, W., Ma, R., Lichtensteiger, W. (2004) Estrogenic activity and estrogen receptor beta binding of the UV filter 3-benzylidene camphor. Comparison with 4-methylbenzylidene camphor. *Toxicology* 199: 109–120.
204. Toppari J, Larsen JC, Christiansen P, Giwercman A, Grandjean P, Guillette LJ Jr, Jégou B, Jensen TK, Jouannet P, Keiding N, Leffers H, McLachlan JA, Meyer O, Müller J, Rajpert-De Meyts E, Scheike T, Sharpe R, Sumpter J, Skakkebaek NE. (1996) Male reproductive health and environmental xenoestrogens. *Environ Health Perspect.* 104 Suppl 4: 741–803.
205. McLachlan JA, Simpson E, Martin M. (2006) Endocrine disrupters and female reproductive health. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 20: 63-75.
206. Hoyer PB (2001) Reproductive toxicology: current and future directions. *Biochem. Pharmacol.* 62: 1557-1564.
207. Akingbemi BT, Ge R, Klinefelter GR, Zirkin BR, Hardy MP (2004) Phthalate-induced Leydig cell hyperplasia is associated with multiple endocrine disturbances. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101: 775–780.

- 208.** Higuchi TT, Palmer JS, Gray Jr LE, Veeramachaneni DN. (2003). Effects of dibutyl phthalate in male rabbits following in utero, adolescent or post pubertal exposure. *Toxicol. Sci.* 72: 301–313.
- 209.** Tan BL, Kassim, NM, Mohd MA (2003). Assessment of pubertal development in juvenile male rats after sub-acute exposure to bisphenol-A and nonylphenol. *Toxicol. Lett.* 143: 261–270.
- 210.** Schlumpf, M., Jarry, H., Wuttke, W., Ma, R., Lichtensteiger, W. (2004) Estrogenic activity and estrogen receptor beta binding of the UV filter 3-benzylidene camphor. Comparison with 4-methylbenzylidene camphor. *Toxicology* 199: 109–120.
- 211.** Giwercman A, Skakkebaek NE. (1992) The human testis-an organ at risk? *Int J Androl* 15: 373-375.
- 212.** Sharpe RM, Skakkebaek NE. (1993) Are oestrogens involved in falling sperm counts and disorders of the male reproductive tract? *Lancet* 341: 1392-1395.
- 213.** Dixon RA (2004) Phytoestrogens. *Annu Rev Plant Biol.* 55: 225-261.
- 214.** Cassidy A. (2005) Dietary phyto-oestrogens: molecular mechanisms, bioavailability and importance of menopausal health. *Nutr Res Rev* 18: 183-201.
- 215.** Mueller SO (2004) Xenoestrogens: mechanisms of action and detection methods. *Anal Bioanal Chem.* **378**: 582-527.
- 216.** Soto AM, Maffini MV, Schaeberle CM, Sonnenschein C. (2006) Strengths and weaknesses of in vitro assays for estrogenic and androgenic activity. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* **20**: 15-33.
- 217.** Fang H, Tong W, Perkins R, Soto AM, Prechtel NV, Sheehan DM. (2000) Quantitative comparisons of in vitro assays for estrogenic activities. *Environ Health Perspect.* 108: 723-729.

218. Jürgenliemk G, Nahrstedt A. (2003). Dissolution, solubility and cooperativity of phenolic compounds from *Hypericum perforatum* L. in aqueous systems. *Pharmazie. Mar*;58(3):200-3.
219. USDA (United States Department of Agriculture) (2002) USDA-Iowa State University Database on Isoflavone Content of Foods. <http://www.nal.usda.gov/fnic/foodcomp/Data/isoflav/isoflav.html>
220. Pillow PC, Duphorne CM, Chang S, Contois JH, Strom SS, Spitz MR, Hursting SD (1999) Development of a database for assessing dietary phytoestrogen intake. *Nutr Cancer.*, 33 :3-19.
221. Horn-Ross PL, Barnes S, Lee M, Coward L, Mandel JE, Koo J, John EM, Smith M. (2000) Assessing phytoestrogen exposure in epidemiologic studies: development of a database (United States). *Cancer Causes Control* 11: 289-298.
222. FSA (Food Standards Agency), *Working Group on Phytoestrogen Paper PEG/2001/24: Amendment to the Isoflavone intake Assessment, 2001*
223. Thomson BM, Cressey PJ, Shaw IC (2003) Dietary exposure to xenoestrogens in New Zealand. *J Environ Monit.* 5: 229–235.
224. Bouker KB, Hilakivi-Clarke L (2000) Genistein: does it prevent or promote breast cancer? *Environ Health Perspect* 108: 701-708.
225. Ziegler RG, Hoover RN, Pike MC, Hildesheim A, Nomura AM, West DW, Wu-Williams AH, Kolonel LN, Horn-Ross PL, Rosenthal JF (1993) Migration patterns and breast cancer risk in Asian-American women. *J Natl Cancer Inst* 85: 1819-1827.

ÖZET

BİTKİSEL GIDA DESTEK ÜRÜNLERİNİN ENDOKRİN BOZUCU ETKİ POTANSİYELLERİNİN *IN VITRO* OLARAK BELİRLENMESİ

Endokrin sistem fonksiyonlarını değiştirerek maruz kalan organizma ve/veya gelecek nesiller üzerinde olumsuz sağlık etkilerine neden olan kimyasal maddelere genel olarak endokrin bozucular (EB) denmektedir. Son 30 yıldır yapılan çalışmalar EB’ın insanlarda ve hayvanlarda neden oldukları olumsuz sağlık etkilerini detaylı bir biçimde ortaya koymaktadır. Son yıllarda tüketimleri hızla artan, bitkisel kaynaklı oldukları için zararsız oldukları düşünülen ve yeterli denetim olmadığı için bilinçsizce kullanılan bitkisel gıda destek ürünlerinin olası EB etkileri konusunda fazla araştırma yapılmamaktadır. Bu tez kapsamında ülkemiz piyasasında yer alan bazı bitkisel gıda destek ürünlerinin potansiyel EB etkinliği araştırılmıştır. Bu amaçla floresans bir izleme ligandının kullanıldığı *in vitro* ‘östrojen reseptörüne bağlanma’ yöntemi ile bitkisel gıda destek ürünlerinin reseptöre bağlanma afiniteleri taranmıştır. Taranan on iki örnek arasında reseptöre bağlanma afinitesi yüksek bulunan St. John’s Wort örneğinde bulunan aktif madde/maddelerin yapısı aydınlatılmaya çalışılmıştır. Bunun yanı sıra aktif olduğu saptanan örneklerde aktiviteden sorumlu olabilecek izoflavonların da varlığı araştırılmıştır.

Anahtar sözcükler: Bitkisel diyet destek ürünleri, endokrin bozucu etki, fitoöstrojenler, östrojen reseptörüne bağlanma yöntemi

ABSTRACT

IN VITRO SCREENING OF ENDOCRINE DISRUPTING EFFECT OF SEVERAL DIETARY SUPPLEMENTS

Endocrine disruptors (ED) are chemicals that may change functions of the endocrine system and cause adverse health effects on the exposed organism or its future generations. Investigations that have been performed for last 30 years reveal adverse health effects of the endocrine disrupting chemicals in humans and animals. In recent years, consumption of the herbal dietary supplements has dramatically increased. Since these supplements have natural origins, they are believed to be harmless and they are used unconsciously without going through sufficient “safety assessments”. Moreover there are limited numbers of scientific research on the endocrine disrupting effects of herbal dietary supplements. In the present study, the potential endocrine disrupting effects of some herbal dietary supplements collected from the market were evaluated. For this aim, a fluorescence tracer ligand was used in an *in vitro* 'estrogen receptor binding' assay and the receptor binding affinities of the herbal dietary supplements were screened. St. John's Wort was found to have the highest receptor binding affinity amongst twelve the studied samples. Furthermore the substance that responsible for the bioactivity of St. John's Wort was isolated and its structure was determined. In addition, the presence of active isoflavones that might be responsible for the receptor binding activity were investigated in the active samples.

Keywords: *Herbal dietary supplements, endocrine disrupting effect, phytoestrogens, estrogen receptor binding assay*

ÖZGEÇMİŞ

1986 yılında İzmir’de doğdum. İlköğretim ve lise öğrenimimi Karşıyaka’da tamamladım. 2003 yılında Ege Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Biyomühendislik Bölümü’nde başladığım lisans eğitimimi hazırlık yılı dahil olmak üzere 2008 yılında tamamladım. Lisans eğitimimin ardından Moskova-Rusya’da bir ilaç şirketinde teknik uzman olarak 6 ay deneyim kazandıktan sonra, Eylül 2009’da Ege Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Toksikoloji Anabilim Dalı’nda yüksek lisans çalışmalarına başladım.