



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

**YÜKSEK
LİSANS
TEZİ**

**TAKVİYE EDİCİ GIDALARDA VE BİTKİSEL
ÇAYLARDA PİROLİZİDİN ALKALOİDLERİNİN
MİKTAR TAYİNİ VE TOKSİKOLOJİK AÇIDAN
DEĞERLENDİRİLMESİ**

MERVE NİSA SELCEN GÜRBÜZ

**FARMASÖTİK TOKSİKOLOJİ
ANABİLİM DALI**

AĞUSTOS 2021



**TAKVİYE EDİCİ GIDALARDA VE BİTKİSEL ÇAYLARDA PİROLİZİDİN
ALKALOİDLERİNİN MİKTAR TAYİNİ VE TOKSİKOLOJİK AÇIDAN
DEĞERLENDİRİLMESİ**

Merve Nisa Selcen GÜRBÜZ

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
FARMASÖTİK TOKSİKOLOJİ ANABİLİM DALI**

**GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLER ENSTİTÜSÜ**

Ağustos 2021

ETİK BEYAN

Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

- Tez içinde sunduğum verileri, bilgileri ve dokümanları akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Tüm bilgi, belge, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- Tez çalışmada yararlandığım eserlerin tümüne uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi,
- Kullanılan verilerde herhangi bir değişiklik yapmadığımı,
- Bu tezde sunduğum çalışmanın özgün olduğunu, bildirir, aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim.

Merve Nisa Selcen GÜRBÜZ

31/08/2021

TAKVİYE EDİCİ GIDALARDA VE BİTKİSEL ÇAYLARDA PİROLİZİDİN
ALKALOİDLERİNİN MİKTAR TAYİNİ VE TOKSİKOLOJİK AÇIDAN
DEĞERLENDİRİLMESİ
(Yüksek Lisans Tezi)

Merve Nisa Selcen GÜRBÜZ

GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
Ağustos 2021

ÖZET

Pirolizidin alkaloidleri (PA), dünya çapında 6000'den fazla bitki türünde bulunan ve en yaygın toksik ikincil bitki metabolitleridir. Bu bileşiklerin özellikle 1,2 doymamış bağ yapısına sahip olanları, genotoksik ve kanserojen özellikleriyle insan sağlığı açısından tehdit oluşturmaktadır. Düzenleyici kurumlar arasında PA ile kontamine olmuş ürünlerin tüketilmesi ile ilgili riskler konusunda kaygı ve artan bir farkındalık bulunmaktadır. Çalışmamızda PA varlığı yeşil çay ve yeşil çay takviyeleri, form çayları ve papatya çayları, karışık bitki çayı gibi yapısında PA bulunmayan ürünlerin ve karakafes otu, öksürük otu gibi bu alkaloidleri içeren ürünlerin miktar tayinleri gerçekleştirilmiştir. 28 adet PA analizi Bfr yöntemi temel alınarak kuadropol uçuş zamanlı kütle spektrometresi-sıvı kromatografisine (LC-MS-QTOF) dayalı bir yöntem valide edilerek gerçekleştirilmiştir. Çalışmamızda 34 farklı üründe en çok intermidine ve N-oksiti olmak üzere 11 farklı PA'lara rastlanmıştır. PA için örnekler dışındaki 31 örneğin %44'ünde (14) en az bir PA tespit edilmiştir. En yüksek toplam PA miktarları beklenildiği üzere *Sympytm officinale* örneklerine aittir. Analizi yapılan numunelerde 17'sinde 2,70 ng/g-9,37 µg/g aralığında değişen miktarlarda PA'lara rastlanmıştır. Numunelerde tespit edilen miktarların bazıları izin verilen limit değerlerin üzerinde olduğu görülmüştür. Ülkemizde bulunan farklı tipteki örneklerle ilgili ilk veriler elde edilmiştir.

Bilim Kodu : 1021
Anahtar Kelimeler : LC-MS-QTOF, pirolizidin alkaloid, takviye edici gıdalar, bitkisel çaylar
Sayfa Adedi : 81
Tez Danışmanı : Doç. Dr. Emre Durmaz

QUANTITY DETERMINATION AND TOXICOLOGICAL EVALUATION OF
PYRROLIZIDINE ALKALOIDS IN SUPPLEMENTARY FOODS AND HERBAL TEA
(M. Sc. Thesis)

Merve Nisa Selcen GÜRBÜZ

GAZI UNIVERSITY
GRADUATE SCHOOL OF HEALTH SCIENCES

August 2021

ABSTRACT

Pyrrolizidine alkaloids (PA) are the most common toxic secondary plant metabolites found in more than 6000 plant species worldwide. These compounds especially those with 1,2 unsaturated bonds, pose a threat to human health with their genotoxic and carcinogenic properties. There is concern and growing awareness among regulators about the risks associated with consuming PA-contaminated products. For this purpose a method based on quadrupole time-of-flight mass spectrometry-liquid chromatography (LC-MS-QTOF) was validated to determine the amount of PA in herbal supplements and teas. 28 PA were analyzed. Quantification of products such as green tea and green tea supplements, form teas and chamomile teas, mixed herbal teas, and products containing PA alkaloids such as comfrey and coltsfoot were performed. In our study, 11 different PAs, mostly intermidine and N-oxide, were found in 34 different products. At least one PA was detected in 44% (14) of 31 samples, excluding PA-containing samples. The highest total PA amounts belong to Symphytum officinale samples, as expected. In the analyzed samples, varying amounts of PAs were found in the range of 2.70 ng/g-9.37 µg/g in 17 of them. It was concluded that some of the amounts detected in the samples were above the allowable limit values. The first data on different types of samples found in our country were obtained.

Science Code : 1021
Key Words : LC-MS-QTOF, Pyrrolizidine Alkaloids, herbal supplements, herbal teas
Page Number : 81
Supervisor : Assoc. Prof. Emre Durmaz

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca bilimsel katkılarını ve emeğini, sabrını, anlayışlılığını esirgemeyen, akademik hayatıma yön veren, birlikte çalışmaktan onur duyduğum saygıdeğer hocam Doç. Dr. Emre DURMAZ'a,

Deneysel aşamadaki yardımları için değerli Uzm. Ayhan İbrahim AYSAL'a,

Akademik süreçte en iyi şekilde yetişmem için gerekli desteği sağlayan Gazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi (BAP)'ne,

Yüksek lisans ders dönemim boyunca bana katkıda bulunan saygıdeğer hocalarım Prof. Dr. İsmet ÇOK, Prof. Dr. Bensu KARAHALİL, Prof. Dr. Sema BURGAZ, Prof. Dr. Ela KADIOĞLU ve Doç. Dr. Esra EMERCE'ye,

Huzurlu bir iş ortamı sağlayan saygıdeğer hocalarıma,

Bu süreçte benim her zaman arkamda duran maddi-manevi desteklerini esirgemeyen başta babam Prof. Dr. Adnan GÜRBÜZ olmak üzere ailem ve arkadaşlarıma,

tüm içtenliğimle teşekkür ederim

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET	viii
ABSTRACT.....	ix
TEŞEKKÜR.....	x
İÇİNDEKİLER	xi
ÇİZELGELERİN LİSTESİ.....	xiv
ŞEKİLLERİN LİSTESİ.....	xv
RESİMLERİN LİSTESİ	xvi
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xvii
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	5
2.1. Pirolizidin Alkaloidlerinin Bitkilerde Oluşumu	5
2.2. Pirolizidin Alkaloidlerinin Toksisitesi	8
2.2.1. Pirolizidin alkaloidlerinin farmakokinetiği	8
2.2.2. Pirolizidin alkaloidlerinin karaciğer toksisitesi.....	11
2.2.3. Pirolizidin alkaloidlerinin teratojenisitesi	13
2.2.4. Pirolizidin alkaloidlerinin pulmoner toksisitesi	14
2.2.5. Pirolizidin alkaloidlerinin kardiyovasküler etkileri	16
2.2.6. Pirolizidin alkaloidlerinin genotoksik ve tümörojenik etkileri	17
2.3. İnsan Maruziyetinde Pirolizidin Alkaloidlerin Ana Kaynakları	23
2.3.1. Arı ürünleri- bal ve polen.....	24
2.3.2. Tahıl kontaminasyonu.....	24
2.3.3. Süt kontaminasyonu.....	25
2.3.4. Tavuk yumurtası kontaminasyonu	25
2.3.5. Et kontaminasyonu.....	26

2.3.6. Salatalar, çaylar ve takviye edici gıdalar	26
2.3.7. <i>Tussilago farfara</i> L. (Öksürükotu, Asteraceae)	27
2.3.8. <i>Symphytum officinale</i> L. (Karakafes otu, Boraginaceae)	28
2.3.9. <i>Camellia sinensis</i> (L.) Kuntze (Yeşil Çay, Theaceae)	28
2.4. PA veya PA İçeren Ürünlerin Yasal Durumu ve Değerlendirmesi.....	29
2.4.1. Bitkisel tıbbi ürünlerde PA kontaminasyonu ve limit değerler.....	31
2.4.2. Bitkisel ilaçlar	33
2.4.3. Gıda maddeleri	34
2.4.4. Diğer Yaklaşımlar	35
2.5. Pirolizidin Alkaloid Bileşiklerinin Bitkilerden Ekstraksiyonu	36
2.6. Pirolizidin Alkaloid Bileşiklerinin Analizlerinde Kullanılan Yöntemler	37
3. GEREÇ VE YÖNTEM	39
3.1. Yöntemin Amaç ve Prensipleri	39
3.2. Kullanılan Maddeler ve Diğer Sarf Malzemeler	40
3.3. Kullanılan Kimyasallar, Alet ve Cihazlar	40
3.4. Kullanılan Kimyasallar Numunelerin Temin Edilmesi.....	41
3.5. Alkaloid Ekstraksiyonu	43
3.5.1. Çözeltilerin hazırlanması	43
3.6. Numune Hazırlama	43
3.7. Alkaloid Ekstraksiyonu Katı Faz Uygulaması (SPE)	44
3.8. LC-MS Q-TOF Analizi	45
4. BULGULAR	49
4.1. PA'ların ve N-oksitlerinin LC-MS QTOF Cihazından Elde Edilen Bulgular	49
4.2. PA'ların ve N-oksitlerinin LC-MS QTOF Cihazından Elde Edilen Kromatogramlar	54
5. TARTIŞMA	61
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	69

KAYNAKLAR	72
ÖZGEÇMİŞ	81



ÇİZELGELERİN LİSTESİ

Çizelge	Sayfa
Çizelge 2.1. PA önerilen referans değer örnekleri (HMPC, 2020).....	33
Çizelge 3.1. Kullanılan numunelerin kodlandırılması	41
Çizelge 3.2. LC Parametreleri.....	46
Çizelge 3.3. MS Parametreleri	47
Çizelge 4.1. PA'ların ve N-oksitlerinin kütle verileri ve alıkonma süreleri	49
Çizelge 4.2. Kodlanmış numunelerde tespit edilen PA'lar ve N-oksitleri (µg/g).....	50
Çizelge 4.3. Kodlanmış numunelerde tespit edilen PA'lar ve N-oksitleri (ng/g).....	52
Çizelge 6.1. Analizi yapılan numunelerin PA tipindeki sayısı	70

ŞEKİLLERİN LİSTESİ

Şekil	Sayfa
Şekil 2.1. PA'nın yapısı ve farklı biçimleri. R1 ve R2, farklı nekin asitlere karşılık gelmektedir (Schrenk ve diğerleri, 2020)	6
Şekil 2.2. Başlıca 1,2-doymamış PA türleri (Schrenk ve diğerleri, 2020).....	6
Şekil 2.3. Pirolizidin alkaloid örnekleri. Üst sıra: 1,2 doymamış bir nekin bazı ve 1,2-doymamış mono- ve açık zincirli di-esterler; PA'lar tipik olarak Boraginaceae ve Eupatorieae'de bulunur. Orta sıra: 1,2-doymamış siklik di-esterler; tipik olarak Senecioneae ve Crotalariae'de bulunur. Alt sıra: toksik olmayan 1,2 doymuş PA'lar. Sağ alt: bir dehidro-PA, memelilerde oluşan, ancak bitkilerde bulunmayan reaktif metabolit (Schrenk ve diğerleri, 2020)	7
Şekil 2.4. PA'ların metabolizması (Moreira, 2018).....	10
Şekil 2.5. PA karsinogenезinin varsayılan mekanizması (Chen ve diğerleri, 2010)	23
Şekil 4.1. LC-MC QTOF standart kromatogramı (EIC).....	54
Şekil 4.2. LC-MC QTOF ekstraksiyonların standart kromatogramı	55
Şekil 4.3. Matris eşleştirme, 7 noktalı örnek kalibrasyon eğrisi	56
Şekil 4.4. Tipik numune kromatogramı (<i>Symphytum officinale</i>).....	57
Şekil 4.5. Intermedine (orta) ve europine (alt) PA'larına ait kromatogramları	57
Şekil 4.6. CKBT kodlu tablet numunesi standart kromatogramı ve Monocrotaline N-oksit	58
Şekil 4.7. Papatya çayı numunesinde standart kromatogramı (EIC) ve senecionine.....	58

RESİMLERİN LİSTESİ

Resim	Sayfa
Resim 3.1. Örneklerin hazırlanması.....	43
Resim 3.2. Hazırlanmış numuneler.....	44
Resim 3.3. Katı faz ekstraksiyonunun örnek yüklenmiş aşaması	44
Resim 3.4. Azot jeneratörlü Turbovap cihazına yüklenmiş numuneler.....	45
Resim 3.5. LC-MS QTOF cihazı	47



SİMGELER VE KISALTMALAR

Bu çalışmada kullanılmış simgeler ve kısaltmalar, açıklamaları ile birlikte aşağıda sunulmuştur.

Simgeler

Açıklamalar

%	Yüzde
°C	Santigrat
µg	Mikrogram
A	Amper
bw	Vücut ağırlığı
dk	Dakika
g	Gram
kg	Kilogram
M	Molar
M	Molar
mg	Miligram
ml	Mililitre
ng	Nanogram
psi	İnçkare başına libre
rpm	Dakikadaki Devir Sayısı
V	Volt

Kısaltmalar

Açıklamalar

AB	Avrupa Birliği
AIC	Akaike Bilgi Kriteri
ANZFA	Avustralya Yeni Zelanda Gıda Kurumu
ARfD	Akut Referans Doz
BfArM	Alman Federal İlaç ve Tıbbi Cihaz Enstitüsü
BfR	Alman Federal Risk Değerlendirme Enstitüsü
BGA	Bundesgesundheitsamt
BMD	Benchmark Doz

Kısaltmalar	Açıklamalar
BMDL10	Doz seviyesinin, arka plan seviyesinin üzerinde %10 fazladan kanser insidansı ile sonuçlanan daha düşük güven sınırı
BMP	Kemik Morfojenik Proteini
BMPR2	BMP reseptörü II
CHO	Çin Hamster Yumurtalık
CoP	Uygulama Kuralları
T.C.	Türkiye Cumhuriyeti
COT	İngiliz Gıda, Tüketici Ürünleri ve Çevresindeki Kimyasalların Toksikite Komitesi
CPMP	Beşeri Tıbbi Ürünler Komitesi
CYP450	Sitokrom P450 monooksijenazlar
DHP	Dehidro-pirolizidin
DHPA	Dehidropirolizidin alkaloidleri
DNA	Deoksiribonükleik asit
EFSA	Avrupa Gıda Güvenliği Kurumu
FAO	Gıda ve Tarım Örgütü
FSANZ	Avustralya Yeni Zelanda Gıda Standartları
GACP	İyi Tarım ve Toplama Uygulaması
GC-MS	Gaz Kromatografisi-Kütle Spektrometresi
GSH	Glutatyona
HepG2	İnsan Hepatoma Hücreleri
HMP	Bitkisel Tıbbi Ürünler
HMPC	Bitkisel Tıbbi Ürünler Komitesi
HSOS	Hepatik sinüzoidal tıkanma sendromu
HVOD	Hepatik veno-tıkanıcı hastalık
IARC	Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı
iREP	Ara Bağlı Potansiyel Faktörlerini
iREP	Göreceli Etki Faktörleri
İTK	İnce Tabaka Kromatografisi
JECFA	Gıda Katkı Maddeleri Uzman Komitesi
Kategori 2B	Muhtemel kanserojen olan sınıf
Kategori 3	Kanserojen olarak sınıflandırmada yetersiz veri

Kısaltmalar	Açıklamalar
LC-MS QTOF	Kuadropol Uçuş Zamanlı Kütle Spektrometresi-Sıvı Kromatografisine
LC-MS/MS	Sıvı kromatografi-kütle spektrometresi/kütle spektrometresi
MCT	Monokrotalin
MOE	Maruz Kalma Marjı
NMR	Nükleer Manyetik Rezonans
NOEL	Gözlenen etki düzeyi yok
NTP	Ulusal Toksikoloji Programı
PA	Pirolizidin Alkaloid
PAH	Pulmoner Arteriyel Hipertansiyon
PANO	Pirolizin Alkaloidlerin N-Oksit formu
PBPK	Fizyolojik Temelli Farmakokinetik
PTDI	Geçici olarak tolere edilebilir günlük alım
PXR	Pregnane X reseptörü
RASFF	Gıda ve Yem Güvenliği Uyarıları Portalı
RIVM	Hollanda Ulusal Halk Sağlığı ve Çevre Enstitüsü
RP-HPLC	Ters Faz- Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi
RV	Sağ Ventriküler
SCE	Kardeş Kromatid Değişimleri
SPE	Katı Faz Ekstraksiyonu
SPE-LC-MS/MS	Sıvı Kromatografi Tandem Kütle Spektrometrisi ile Birleştirilmiş Katı Faz Ekstraksiyonu
TDI	Tolere Edilebilir Bir Günlük Alım
UDS	Planlanmamış DNA Sentezi
UF	Belirsizlik faktörü
WHO	Dünya Sağlık Örgütü

1. GİRİŞ

Takviye edici gıdalar arasında yer alan bitkisel ürünler ve kültüründe bir parçası olan bitkisel çaylar dünya genelinde yaygın olarak kullanılmakta ve tüketimleri artmaktadır. Temel kullanım amaçları genel sağlık durumunu korumak olan bu ürünlerin, 'doğalın güvenli olduğu' genel algısı nedeniyle, alımlarıyla ilişkili riskler genellikle tüketiciler tarafından önemsenmemektedir. Çok uzun yıllara dayanan kullanım alışkanlıklara ve artan kullanıma rağmen bu ürünlerle ilgili özellikle uzun dönem kullanımlarına ait kısıtlı bilgi, etkinliği ve güvenliği konusunda ise çok az bilimsel fikir birliği bulunmaktadır. Bitkisel kaynaklı ürünlerin biyolojik olarak birçok farklı aktif madde içerdiği iyi bilinmektedir. Bu aktif bileşikler içerisinde endişe kaynağı olan genotoksik ve karsinogenik özellikte bileşikler de bulunmaktadır. Bu bileşiklerden bir grup da pirolizidin alkaloidleridir (PA).

Alkaloidler, bitkilerde, hayvanlarda veya mikroorganizmalarda meydana gelen, doğada çok çeşitli roller sergileyen çeşitli amino asit türevlerinden türetilmiş ve azot taşıyan molekül grubudur. Bu alkaloidlerden bazıları belirgin toksisite veya güçlü farmakolojik özelliklere sahiptirler (Moreira ve diğerleri, 2018). PA'lar da alkaloid ailesinin üyeleridir (Chen ve diğerleri, 2021).

PA'lar aralarında tıbbi amaçlar için kullanılan bitkiler de dâhil olmak üzere dünya çapında yaklaşık 6000 bitki türünün doğal bileşenleridir. Bu türlerde 600'den fazla farklı PA tespit edilmiştir. Genellikle Asteraceae (Senecioneae, Eupatorieae), Apocynaceae, Fabaceae (Crotalariaeae) ve Boraginaceae familyalara ait belirli türler tarafından biyosentezlerinin gerçekleştiği ve tüm çiçekli bitkilerin yaklaşık %3'lük kısmının bu bileşikleri sentezlediği belirtilmektedir. Bu bileşiklere maruziyet riski sadece PA sentezleyen bitkilerin tüketilmesinden kaynaklanmamaktadır. Dikkatsiz hasat veya sonraki işlemler sırasında yetersiz uzaklaştırma sonucunda bitkisel preparatlar PA içeren bitkilerle kontamine olabilir.

Tespit edilen PA'ların yarısından fazlasının, akut veya uzun süreli tüketimleri sonucunda başta hepatotoksisite olmak üzere, karsinogenisite ve genotoksisiteye yol açabileceği ifade edilmektedir (Chen ve diğerleri, 2021). Bitkilerin herbivorlara karşı savunma mekanizması olarak ürettikleri ikincil metabolitleri olan PA'ların toksikolojik özelliklerinden kaynaklanan endişeler nedeniyle bu bileşiklere ilgi artmaktadır. Dünya çapında her tür gıda maddesinde bu bileşiklerin kontaminasyonu konusunda artan farkındalık ve yapılan

alışmalar bu konuyla ilgili ilgiyi ve endişeleri haklı çıkarmaktadır (Moreira ve diğeri, 2018).

İnsanlarda PA'ların toksisitesi doza bağlı olarak akut, subakut ve kronik olarak üç düzeyde tanımlanabilir. Akut zehirlenmeler çok nadir durumlarda bildirilmiştir; özellikle çocuklar daha yüksek duyarlılıklarından dolayı etkilenmektedir (Wiedenfild, 2011a). PA'lar akut olarak geri dönüşü olmayan karaciğer hasarına ve ölümle sonuçlanabilen yetmezliğine neden olur; toksisite belirtileri, bozulmuş karaciğer fonksiyonunun bir sonucudur (Cheeke, 1988). Sub-akut toksisite hepatomegali ve tekrarlayan assitlerle karakterizedir; hepatik venlerin tıkanmasına yol açan endotel proliferasyonu ve medial hipertrofi son aşamada sentrilobüler tıkanıklığa, nekroz, fibröz ve karaciğer sirozuna neden olur (Fu ve diğeri, 2004; Wiedenfild, 2011b). Karaciğere zarar veren diğeri durumların varlığında ise karaciğer hasarının şiddeti ve olasılığının artacağı unutulmamalıdır. Diğeri organlarında bu durumdan etkilenebileceği düşünölmektedir. Test edilen çok sayıda PA'nın akciğer lezyonları oluşturabileceği gösterilmiştir (Culvenor ve diğeri, 1976). Pulmoner hasarın uzun süreli ve düşük düzeyde maruziyetten kaynaklandığı tahmin edilmektedir (IPCS,1989).

PA'ların kendilerinin toksisiteleri düşöktür, vücuda alındıktan sonra protein ve deoksiribonökleik asit (DNA) ile katım ürünleri oluşturan reaktif alkilleyici bileşiklere metabolize edilirler. PA'ların toksisitesinin neredeyse tamamı metabolitleri ile ilişkilidir. PA'ların dehidro-pirolizidin (DHP) esterlerine metabolik aktivasyonundan sonra protein ve DNA ile katım ürünleri oluşmaktadır. Uzun dönem maruziyetlerinde, özellikle pirolizidin halka sisteminin 1,2 konumunda bir çift bağa sahip olan proteinlerle kolayca reaksiyona girebilen ve DNA katım ürünleri oluşturabilen 1,2-doymamış pirolizidin alkaloidleri metabolik aktivasyona girme ve reaktif pirol oluşturma potansiyelleri, tümörlerin indöklenebilmesi ve yüksek toksisiteleri nedeniyle endişe kaynağıdır. PA'ların DNA ile katım ürünleri oluşturmaı karsinojen etkilerinin ana nedeni olarak kabul edilmektedir. Özellikle 1,2-doymamış PA'lardan lasiokarpin, monokrotalin ve ridellin insanlar için genotoksik ve olası karsinojenler olarak kabul edilir. Çok sayıda PA'nın metabolik oksidasyon yoluyla bakteri ve memeli hücrelerinde güçlü genotoksik etki gösteren maddeler olduğu ortaya koyulmuştur (EFSA,2017; IARC 2012).

PA'ların karsinogenite potansiyeli bu bileşiklerin beslenmede düşük seviyelerde maruziyetinin rapor edilmesiyle birlikte kronik riskler açısından da endişe yaratmaktadır. Bu endişeler daha çok demlenmiş çay, bitkisel çay ve bal tüketimine yöneliktir. Takviye edici gıdalar ya da çaylar, PA içeren bitkilerle ya da bu bitkiler ile kontamine olmuş olanlarla hazırlandıklarında bu bileşikleri içerirler. PA'ların gıda ve bitkisel ilaçlarda kirletici veya bileşen olarak yüksek miktarlarda bulunmasına rağmen toksikolojik veriler sınırlıdır. Bitkisel çay ve ilaçların alımının, insanlardaki maruziyeti için önemli bir yol olduğu gösterilmiştir. Bu bileşiklerin çoğu durumda tüketim seviyeleri akut zehirlenmeye neden olmak için yetersiz olsa da önerilen günlük maksimum alım miktarını aşan miktarlarda tüketilebilirler ve bu da kronik hastalıklara katkıda bulunan bir faktör olabilir (Dusemund ve diğerleri, 2018; Schrenk ve diğerleri, 2020; Mulder ve diğerleri, 2015). Her bir PA'nın toksikolojik potansiyeli diğerinden farklı olmakla birlikte bu bileşiklerin günlük hayatta kullandığımız ürünlerdeki seviyelerinin tespit edilerek, risk düzeylerini belirlemek toksikolojinin önemli görevlerinden birisi olacaktır.

Dünyada PA ile ilgili artan farkındalık ve çok sayıda düzenleme bulunmaktadır. Avrupa'da PA'lar için oluşan farkındalık sonrası yapılan düzenlemeler bu bileşiklerin tüketilen gıda ve takviyelerde miktarlarının azaldığını göstermektedir. Maruziyetin en aza indirilmesi bu bileşikler için hedef olacaktır. Bu nedenle bu bileşiklerin düzeylerini izlemek önemlidir.

Çalışmamızda bu bilgiler doğrultusunda internet ve aktarlardan temin edilen zayıflamaya yönelik takviyeler ve form çayları, yeşil çay ve papatya çayları ve karışık bitki çayı gibi ürünlerin miktar tayinleri gerçekleştirilmiştir. Ayrıca aktarlardan temin edilen karakafes otu (*Symphytum officinale*), öksürük otu (*Tussilago Farfara*) gibi bu alkaloidleri içeren bitkiler yine bitkisel çay olarak aktardan satın alınmış ve ölçümleri gerçekleştirilmiştir.



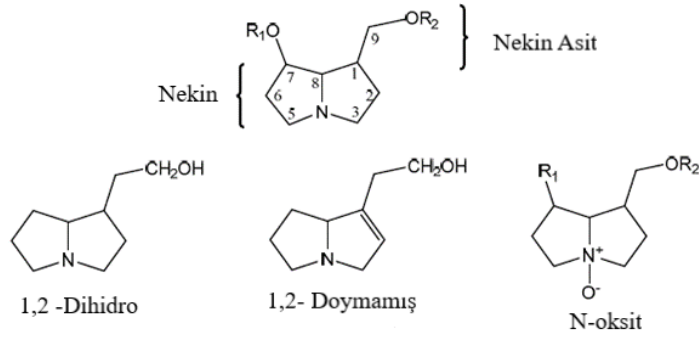
2. GENEL BİLGİLER

2.1. Pirolizidin Alkaloidlerinin Bitkilerde Oluşumu

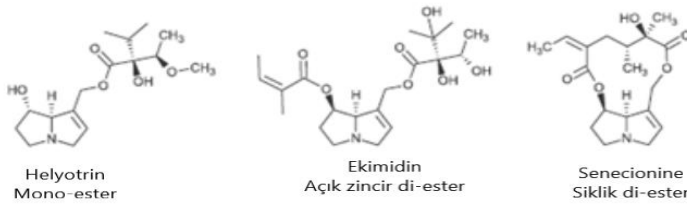
Alkaloitler, bitkilerde, hayvanlarda veya mikroorganizmalarda meydana gelen, doğada çok çeşitli roller sergileyen çeşitli amino asit türevleri ve azot taşıyan molekül grubudur. Bu alkaloitlerden bazıları belirgin toksisite veya güçlü farmakolojik özelliklere sahiptirler (Moreira ve diğerleri, 2018). Alkaloit ailesinden Pirolizidin alkaloidleri (PA), bitkilerin herbivorlara karşı savunma mekanizması olarak ürettikleri ikincil metabolitlerdir. Dünya çapında 6000'den fazla bitkide 600'den fazla PA tespit edilmiştir. Genellikle Asteraceae (Senecioneae, Eupatorieae), Apocynaceae, Fabaceae (Crotalarieae) ve Boraginaceae familyalarında yer alan belirli türler tarafından biyosentezlerin gerçekleştiği ve bunun tüm çiçekli bitkilerin yaklaşık %3'lük kısmını kapsadığı belirtilmektedir (Chen ve diğerleri, 2021). PA bitkinin tüm organlarında bulunmakla birlikte genellikle sentezlendiği köklerde yapraklara göre daha fazla bulunur (Hartmann ve diğerleri, 1989). Küçük, genç yapraklar büyük, yaşlı yapraklardan daha fazla PA içerirler (Mattocks, 1980). Bununla birlikte bazı PA'lar köklerden taşınarak, periferik dokular ve üreme organları gibi, bitkinin yalnızca belirli bir organında bulunabilir (Hartmann ve diğerleri, 1989).

PA'nin kimyasal yapılarına bakıldığında çoğunluğu nekin bazı olarak bilinen bazik yapıdaki alkollerin esterlerinden türetilen heterosiklik bileşiklerdir. PA'nin hidrolizi sonucunda nekin bazı ve nekin asidi elde edilmektedir (Fu ve diğerleri, 2004). PA'nin biyosentezine bakıldığında; nekin asitlerinin sentezinde izolösinin, nekin bazlarının sentezinde ise homospermidinin başlangıç molekülü olarak önemli rol oynadığı görülmektedir. Nekin bazları tamamen doymuş yapıda olabildiği gibi 1,2 doymamış bağ içeren yapılar şeklinde de olabilmektedir. PA bitkilerde baskın şekilde N-oksit formunda (PANO) bulunsa da üçüncül amin formundaki yapılar da mevcuttur (bkz. Şekil 2.1). PA kimyasal yapıları, nekin bazlarının tipine ve bunların esterleşme şekillerine göre farklılaşabilmektedir. Buna bağlı olarak mono-ester, açık zincirli di-ester ve siklik di-ester türlerinin meydana geldiği belirtilmiştir (bkz. Şekil 2.2). PA nekin bazının bir veya iki nekin asidi ile esterleşmesi neticesinde muazzam yapısal çeşitlilik (bkz. Şekil 2.3) gösterebilmektedir (Schrenk ve diğerleri, 2020).

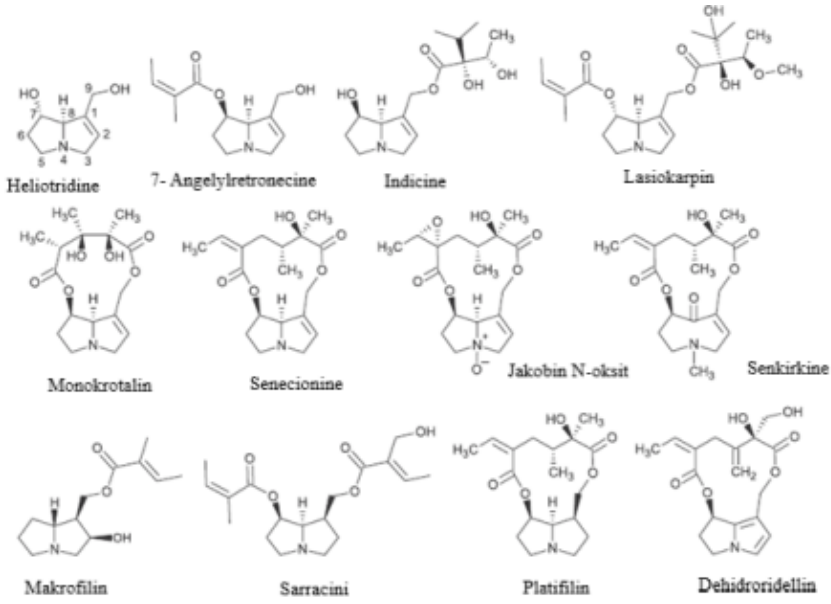
PA'nin Asteraceae (Compositae), Boraginaceae ve Fabaceae (Leguminosae) ailelerinde yoğunlukla bulunduğu doğrulanmıştır. Fakat üç bitki ailesinde çoğunlukla bulunmaları, bu ailelere ait tüm türlerin PA ürettiği anlamına gelmemektedir. Fabaceae'de (950 cins, 24.000 tür), PA üreten bitkiler Crotalariae kabilesi içinde sadece 4 cins (900 tür) ile sınırlıdır, bunların arasında *Crotalaria* (700 tür) en önemlisidir.



Şekil 2.1. PA'nın yapısı ve farklı biçimleri. R1 ve R2, farklı nekin asitlere karşılık gelmektedir (Schrenk ve diğerleri, 2020)



Şekil 2.2. Başlıca 1,2-doymamış PA türleri (Schrenk ve diğerleri, 2020)



Şekil 2.3. Pirolizidin alkaloit örnekleri. Üst sıra: 1,2 doymamış bir nekin bazı ve 1,2-doymamış mono- ve açık zincirli di-esterler; PA'lar tipik olarak Boraginaceae ve Eupatorieae'de bulunur. Orta sıra: 1,2-doymamış siklik di-esterler; tipik olarak Senecioneae ve Crotalariaeae'de bulunur. Alt sıra: toksik olmayan 1,2 doymuş PA'lar. Sağ alt: bir dehidro-PA, memelilerde oluşan, ancak bitkilerde bulunmayan reaktif metabolit (Schrenk ve diğerleri, 2020)

Asteraceae ailesi (32.000 tür) daha fazla PA üreten bitkileri (60 cins, 3200 tür) içermesine rağmen bu aileye atfedilen türlerin sadece %10'unu kapsamaktadır. PA üreten bitkilerin çoğu Senecioneae oymağında (1600 tür) yer almaktadır ve en önemli cinsi Senecio'dur. Diğer PA üreten bitkiler Eupatorieae oymağında bulunmaktadır. Boraginaceae ailesi (2700 tür) diğer iki aileden daha küçüktür, ancak nispeten yüksek sayıda PA üreten bitki (40 cins, 1700 tür) içermektedir. Heliotropioideae alt ailesi önemli *Heliotropium* cinsini (160 tür) içerirken, Boraginoideae alt ailesi de *Echium*, *Symphytum* ve *Cynoglossum* gibi cinsleri içermektedir. Farklı yapıya sahip olan PA tiplerinin bir dereceye kadar, belirli bir bitki ailesinin birçok türü için karakteristik olduğu bildirilmiştir. Ayrıca büyük aileler arasında bir miktar örtüşmenin söz konusu olduğu da bilinmektedir. Crotalariaeae da büyük ölçüde monokrotalin tipi siklik di-esterler ağırlıktadır. Bunun yanında mono-esterler ve retronesinden türetilen açık zincirli di-esterler de görülmektedir. Senecioneae için senecionin ve senkirkine tipinden siklik di-esterler karakteristik olsa da 1,2 doymuş PA bitkilerinin yanı sıra retronesin tipi mono- ve açık zincirli di-esterlerde bulunmaktadır. Heliotropioideae türlerine bakıldığında heliotridinden türetilmiş mono ve açık zincirli di-esterler dikkat çekmektedir. Bu PA Boraginoideae ve Eupatorieae'de de bulunabilmektedir.

Boraginaceae ve Eupatorieae türlerinde bulunan mono- ve di esterle de büyük ölçüde örtüşme gözlenmektedir (Schrenk ve diğerleri, 2020).

Bitkilerde PA konsantrasyonları, türden türe ve bitkinin kısımlarına göre geniş ölçüde değiştiği gibi (Schrenk ve diğerleri, 2020), iklim ve toprak yapısı gibi çevresel faktörlere göre de farklılık göstermektedir (Fu ve diğerleri, 2001). Bununla beraber, başta köklerde olmak üzere, en fazla kök ve yapraklarda bulunduğu belirtilmiştir (Hartmann ve diğerleri, 1989). Crotalariaeae, Senecioneae ve Heliotropioideae türlerindeki konsantrasyonları <0.1 mg/kg ila 100 mg/kg kuru ağırlık aralığında (örneğin tohumlarda) iken, Eupatorieae ve Boraginoideae türlerin de aralık <0.1 mg/kg ila 10 mg/kg kuru ağırlık olarak gözlenmektedir (Schrenk ve diğerleri, 2020).

2.2. Pirolizidin Alkaloidlerinin Toksisitesi

PA'lar bir nekin asit (alifatik monokarboksilik veya dikarboksilik asitler) ile esterlenmiş bir nekin bazından (1-hidroksimetilpirolizidin) oluşur. Bir veya iki hidroksil grubunun esterifikasyonuna bağlı olarak, PA'lar monoesterler veya diesterler olarak oluşabilir. Bu şekilde oluşmuş C7 pozisyonunda enantiyomer bileşikler retronesin ve heliotridin veya otonesin tipi 1,2-doymamış PA'lar, yapılarındaki doymamış bağlar nedeniyle reaktif yapılarıdır. Bu doymamış yapıdaki türlerin metabolik aktivasyonu PA'ların akut ve kronik hepatotoksitesinden, genotoksitesinden ve karsinogenesitesinden sorumlu görülmektedir. Doymuş yapıdaki plantonesin tipi alkaloidler ise metabolik olarak aktif türler değildir (Dusemund ve diğerleri, 2018).

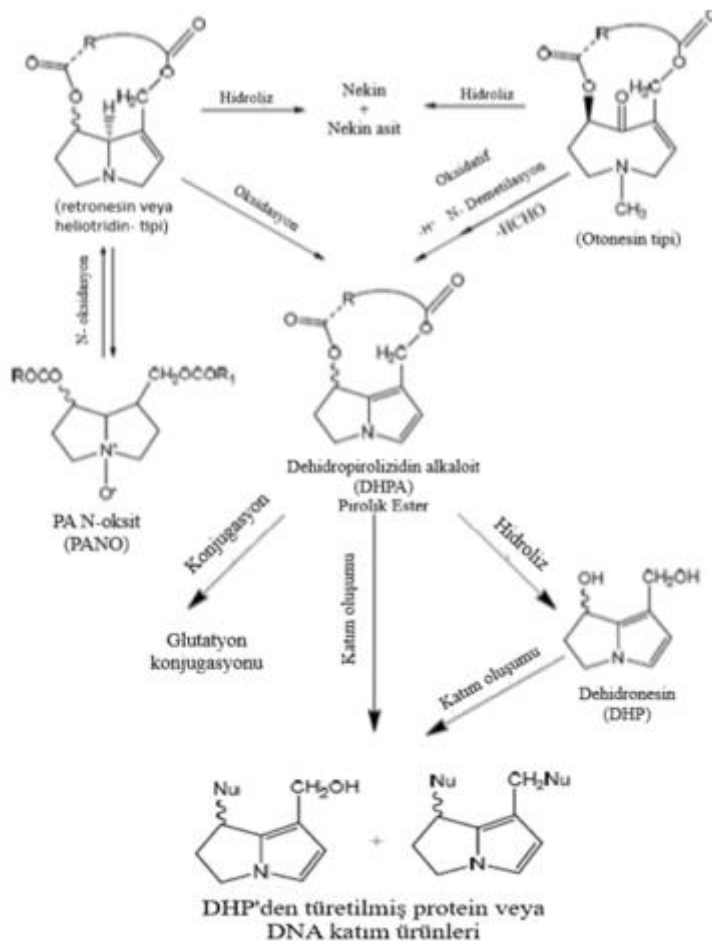
2.2.1. Pirolizidin alkaloidlerinin farmakokinetiği

PA'ların insanlarda oral biyoyararlanımı hakkında nicel veri bulunmamakla birlikte deney hayvanlarında yapılan çalışmalar oral yolla alınan PA'ların gastrointestinal sistemden hızlıca emildiklerini ortaya koymaktadır (NTP, 2003). PA'ların biyoyararlanımları yapılarına bağlı olarak değişebilir. (Hessel ve diğerleri, 2014). Kısmi metabolizmanın ardından bileşiklerin atılımı esas olarak idrar yoluyla gerçekleşirken dışkı ve süt diğer atılım yollarıdır. Birkaç bileşik de yüksek lipofiliklikleri nedeniyle plasentayı geçip fetüse ulaşabilir. Az oranda reaktif metabolitlerde doku bileşenlerine bağlanır. Biyoaktivasyon çoğunlukla karaciğerde gerçekleşir ve bu nedenle karaciğer toksisiteden en çok etkilenen

organdır. Akciğer ve böbrekler diğer hedeflerdir. Akciğer, karaciğerde metabolik aktivasyondan sonra oluşan pirollerin kan yoluyla taşınmasıyla en çok etkilenen ikinci organdır.

PA'lar temel olarak üç yolla metabolizmaya uğrarlar. Hidroliz ile nekinler ve nekinik asitler oluşurken, n-oksidasyonla PA'ların N-oksitleri (PANO) ve oksidasyonla pirolik esterler veya dehidropirolizidin alkaloidleri (DHPA) oluşur. Hidroliz bu bileşiklerin atılımı için önemli bir yoldur. Hidroliz sonucu oluşan nekin bazıları ve nekinik asitler toksik değildir ve nekin bazıları atılım için konjugasyona uğrayabilirler. N-oksidasyon sonucu oluşan ürünler konjugasyon için uygun hale gelir. Bu iki yolak atımda rol oynayan detoksifikasyon mekanizmalarıdır. Fakat N-oksitler tekrar başlangıç ürününe geri dönebilir ve DHPA bileşiklerine okside olabilir. N-oksitler gıdalarda bulundukları zaman oral yolla alındıklarında önemli bir kısmı barsaklardan ve karaciğerden geçerken serbest formlarına dönüşerek toksisiteye katkıda bulunabilirler. Bu nedenle enzim düzeyindeki farklılıklar ve detoksifikasyon ürünleri arasındaki denge bu bileşiklere olan duyarlılığın değişmesine neden olabilir. Hidrolizde karaciğer mikrozomal karboksilesterazları rol oynamaktadır. Sadece retronesin ve heliotridin tipi, N-oksidasyona uğrarken, otonesin tipi PA'lar azotdaki metilasyonları nedeniyle N-oksitleri üretemezler (Moreira ve diğerleri, 2018).

PA'lar insanlarda sitokrom P450 monooksijenazlar (CYP450) özellikle de CYP3A ve CYP2B izoformları ile 1-hidroksimetil-7-hidroksi-6,7-dihidropirolizin ester metabolitlerine dönüşür. Bu 'pirolik' metabolitler, doku hasarına neden olan ve genetik mutasyonları indükleyebilen alkileyici ajanlardır (Edgar ve diğerleri, 2015). DHPA'nın oluşumu, retronesin ve heliotridin tiplerinde, nekin bazının C-3 ve C-8 pozisyonlarında hidroksilasyonu ile gerçekleşir. Otonesin tipinde ise oksidasyon için N-demetilasyon gereklidir. Bu yüksek oranda DHPA reaktif metabolitleri oluşuktan sonra, glutatyon konjugatları (GSH) oluşturmak için glutatyonla bağlanabilirler ve böylece detoksifiye edilebilirler. Bu bileşikler glutatyonla bağlanabildikleri gibi DNA ve proteinlere de bağlanarak katım ürünleri oluşturabilirler. Ayrıca bu metabolitler toksik ancak bir önceki formdan daha az reaktif olan dehidronesinlere hidroliz edilebilirler. PA metabolizması Şekil 2.4'te gösterilmiştir (Moreira, 2018).



Şekil 2.4. PA'ların metabolizması (Moreira, 2018)

Toksikodinamik araştırmalar GI sistem boyunca hızlı absorbsiyon, metabolik aktivasyon, renal atılım ve transplasental taşıma için birincil bölge olarak karaciğere taşınmanın yanı sıra suda çözünür metabolitlerin akciğere ve yağsız anne sütüne geçişini göstermiştir. Toksikokinetik deneysel verilerden, birkaç saat içinde, uygulanan dozun yalnızca nispeten küçük bir bölümünün vücutta kaldığı ve bunun çoğu doku bileşenlerine bağılı metabolitler biçiminde olduğu sonucuna varmıştır. İlk günden sonra vücutta önemli miktarda değişmemiş alkaloid kalması olası değildir (EMA 2017).

PA'nın harici kullanımı, oral veya sistemik uygulamadan daha güvenlidir (Mattocks, 1968). Dermal uygulamadan sonra PA'nin sistemik biyoyararlanımı, oral yoldan uygulama ile karşılaştırıldığında yaklaşık 20-50 kat daha düşüktür (Brauchli ve diğerleri, 1982). Hepatositlerde, CYP3A tüm ilaçların yaklaşık %50'sini ve ayrıca östrojen, testosteron ve safra asitlerini metabolize eder. CYP3A enzimatik işlevi bireyler arasında oldukça farklılık gösterir. Etnik farklar da PA metabolizmasını etkileyebilir (Gura, 2001). CYP3A'nın

indükleyicileri ve inhibitörleri, PA'nin metabolizmasını sırasıyla hızlandırabilir veya bloke edebilir. Kofaktörlerin PA zehirlenmesini şiddetlendirebileceği gözlemlenmiştir: karaciğere zarar veren ajanlar, bakteriyel veya viral enfeksiyonların yanı sıra barbitüratlar gibi tıbbi ilaçlar veya bakır gibi metaller veya aflatoksinler gibi mikotoksinler PA karaciğer hasarının şiddetini ve olasılığını artırabilir (Yee ve diğerleri, 2000; Newberne ve Rogers, 1973; Bull ve Laragh, 1968). Pregnane X reseptörü (PXR) ve diğer bazı nükleer reseptörler, CYP3A indüksiyonunun aracılık eder. Pek çok bitkisel takviyenin bileşeni olan St. John's Wort (sarı kantaron) kalsiyum kanal blokerleri (Drocourt ve diğerleri, 2001) toksik pirol oluşumunu artırır. Kadınların PA'lara belirgin düşük duyarlılıklarının mekanizmaları bilinmemektedir. Östrojen, CYP3A tarafından metabolize olmasına rağmen, aktivitesini etkilememesi bu durumla ilgili olabilir (Mattocks ve White, 1973; Chojkier, 2003).

2.2.2. Pirolizidin alkaloidlerinin karaciğer toksisitesi

Nekin bazında 1,2-doymamış çift bağa sahip olan toksik retronisin tipi PA'lar, karaciğerde sitokrom P450 monooksijenaz aracılığıyla DHPA oluşturarak metabolik olarak aktivasyona uğrar. Yüksek oranda reaktif olan pirolik metabolitler hızlı bir şekilde hücrel proteinlerle bağlanarak, hepatotoksisiteye yol açan pirol-protein katım ürünlerini oluşturur.

1920'deki ilk rapordan bu yana, dünya genelinde on binden fazla insanda PA'lara bağlı zehirlenme vakası belgelenmiştir. Bununla birlikte birçok ülkede bitkisel ürünlerle ilgili kayıt sistemleri bulunmamasından dolayı bu vaka sayısının daha yüksek olacağı tahmin edilmektedir.

Akut PA zehirlenmesine bağlı karaciğer hasarı, özellikle de hepatomegali, hiperbilirubinemi ve assit (periton boşluğunda sıvı toplanması) ile karakterize hepatik sinüzoidal tıkanma sendromu (HSOS) geliştirir ve önemli oranda morbidite ve mortalite ile sonuçlanır (Yang ve diğerleri, 2017). İnsanlarda karaciğer sirozu ve yetmezliğine yol açabilen HSOS ya da diğer bilinen adıyla hepatik venooklusif hastalık (HVOD) PA zehirlenmesinden kaynaklanan en belirgin karaciğer hasarıdır ve maruziyetin bir göstergesi olarak kabul edilir (Dusemund ve diğerleri, 2018). HSOS çapı 1 mm'den küçük hepatik venlerin tıkanması ile ilişkilidir (Bras ve Hill, 1956). Özellikle sinüzoidal endoteli etkileyen küçük hepatik damarların hasarı ile karakterize edilir. Klinik olarak, yüksek PA maruziyetinin alınmasından sonraki akut durum, orta veya uzun vadede hepatik fibroz, siroz ve karaciğer

yetmezliğine yol açabilecek kitle karın ağrısı ve şişkinlik ile tanımlanır. Fibroz, nodüler rejenerasyon ve siroz gibi karaciğer hasarları da subakut veya kronik düşük miktarda PA maruziyetinden kaynaklanabilir. Benzer şekilde, hayvanlarda akut toksikoz genellikle karaciğerin hemorajik nekrozu ile ilişkilidir, klinik olarak sarılık dahil hepatik yetmezlik ile karakterizedir.

Jamaika'da *Crotalaria* ve *Senecio* cinsi bitkilerin bazı kısımlarını içeren “çalı çaylarının” tüketilmesinden sonra, Afrika, Pakistan, Hindistan ve Afganistan'da *Heliotropium* veya *Crotalaria* cinslerinin tohumlarını içeren PA'larla kontamine olmuş tahılların tüketiminden dolayı salgın boyutunda semptomlar gözlenmiştir (Dusemund ve diğerleri, 2018; IPCS, 1989).

1970–1972 yılları arasında Afganistan'da *Heliotropium popovii* subsp. *gillianum* (sin: *Heliotropium gillianum*) ile kontamine buğdayla 7200 kişinin (Mohabbat ve diğerleri, 1976), Hindistan'da *Crotalaria* spp. ile kontamine tahıllarla 486 kişinin (Tandon ve diğerleri, 1976), Tacikistan'da *Heliotropium lasiocarpum* ile 3906 kişinin (Chauvin ve diğerleri, 1993) ve yine Afganistan'da *Heliotropium popovii* ssp. *gillianum* (sin: *Heliotropium gillianum*) ile kontamine buğdayla 270 kişinin zehirlenmesi ve 50 kişinin ölümü tarihte en büyük çaplı intoksikasyonlar olarak görülmektedir. Bunun dışında içlerinde Avrupa ve Amerika da dahil olmak üzere çok sayıda vaka raporu da bulunmaktadır (Wiedenfeld, 2011b).

PA karaciğer toksisitesinde sadece hepatositler değil, aynı zamanda sinüzoidal endotel hücreleri ve santral ven endotelial hücreleri de yer alır. Hepatositler ve sinüzoidal endotel hücreleri, PA monokrotalini toksik ara maddelere metabolize eder, ancak sinüzoidal hücreler toksisiteye hepatositlerden daha duyarlı görünmektedir. Bu hücre tipinin duyarlılığının, daha düşük detoksifikasyon kapasitesi (düşük glutatyon içeriği) nedeniyle, toksik metabolitlere hücre içi maruziyetin daha fazla olmasından kaynaklandığı belirtilmektedir. Bu bakış açısını, monokrotalin modelinde eş zamanlı glutatyon infüzyonunun, sıçanları HSOS gelişiminden koruduğu bulgusu güçlendirmektedir (Helmy, 2016).

PA ile ilişki kurulanlar dışında literatürlerde muhtemelen PA ile ilgili olabilecek çok sayıda vaka da bulunmaktadır. Ancak, bu raporların esas olarak subkronik veya kronik intoksikasyonları tanımlaması nedeniyle, çoğu durumda, karaciğer hastalığı ile PA

maruziyeti arasında genellikle uzun bir süre olduğu için bağlantı kanıtlanamamaktadır (Wiedenfeld, 2011b).

Çin tıbbında Tusanqi adıyla kullanılan *Gynura segetum* (sin: *Gynura japonicum*) türünün kullanımıyla ilişkili HSOS vaka bildirimleri de gittikçe artmıştır (Yang ve diğerleri, 2017). PANO'lar, bitkilerde PA'lar ile değişik miktarlarda, hatta bazen daha yüksek miktarlarda bulunur ancak PANO'ların toksisitesi belirsizliğini korumaktadır. Yang ve diğerleri (2017) tarafından gerçekleştirilen çalışmalarda kanda pirol-protein katım ürünleri ölçülerek doğrulanmış, maruziyete bağlı HSOS vakaları incelendiğinde yüksek miktarlarda N-oksitler saptanmış ve tamamlayıcı olarak yapılan hayvan deneylerinde N-oksitlerin önce indirgendiği, metabolik aktivasyonun ardından da reaktif DHPA türevlerine dönüştüğü, protein katım ürünleri ve hepatotoksikite oluşturduğu doğrulanmıştır. Yine de N-oksitlerin karaciğer toksisitesini indüklemeye potansiyeli PA'larına nazaran daha düşük bulunmuştur (Yang ve diğerleri, 2017).

Bunlar dışında literatürlerde, PA zehirlenmesiyle muhtemelen bağlantılı olan farklı karaciğer hastalıkları (özellikle HSOS) hakkında çok sayıda rapor bulunmaktadır. Ancak, bu raporların esas olarak subkronik veya kronik intoksikasyonları tanımlaması nedeniyle, çoğu durumda, karaciğer hastalığının ortaya çıkması ile PA içeren materyalin alınması arasında uzun bir süre olduğu için bağlantı kanıtlanamamaktadır (Wiedenfeld, 2011b).

2.2.3. Pirolizidin alkaloidlerinin teratojenisitesi

Hamilelerde bitki çayları, bitkisel ilaçlar ve baharatlar yoluyla PA'lara maruz kalınması yeni doğanlarda ölümcül HSOS'a neden olmuştur (Edgar ve diğerleri, 2015). 2003 yılında, hamilelik sırasında yaklaşık olarak günlük 7 µg PA alan (karakafes içeren bir bitki çayından) annenin karaciğerinde toksik bir etki görülmediği, ancak fetal karaciğere zarar verdiği ve yeni doğanın 12 saat sonra öldüğü raporlanmıştır. Yapılan analizlerde fetal karaciğerde dehidrolikosamin ve dehidrointegerrimin, PA metabolitleri olarak tespit edilmiş, bitkisel karışımın 2 gramında 12 µg likopsamin, 7 µg interrimin ve 6 µg O7-asetil türevleri bulunmuştur. Bitkisel karışımın ise Türkiye'den temin edildiği belirtilmiştir (Rasenack ve diğerleri, 2003). Yine Almanya'da HSOS'dan ölen yeni doğan vakaları bildirilmiş, bu yeni doğanlarda etiyoloji aydınlatılamamıştır (Seibold-Weiger ve diğerleri, 1997).

DHPA'leri ve metabolitleri sıçanlarda teratojeniktir. Sıçan embriyolarında plasentayı geçtikleri ve katım ürünleri meydana getirdikleri gösterilmiştir. PA'ların kemirgenlere uygulandığı gelişim ve üreme toksisitesi çalışmalarında, gelişme geriliği, anormal iskelet gelişimi ve kemikleşmedeki eksiklikler, fetal büyümenin ve olgunlaşmanın durması ve *in-utero* ölümler gözlenmiştir. Oluşan malformasyonlar doza bağlıdır. Sıçan fetüslerinde görülen iskelet kusurları bu bileşiklerin kemik morfojenik proteini (BMP) sinyalleşmesinde eksikliklere neden olduğunu göstermektedir. BMP sinyal genlerinin mutasyonu pulmoner arter hipertansiyonuna ya da TP53 geni gibi diğer genlerin mutasyonu ile çeşitli tümörlerin gelişimine katkıda bulunabilir. Ayrıca laktasyon sırasında lasiokarpın uygulanmış sıçanlarda anne üzerinde belirgin etkiler gözlenmezken yavrularda uyarılmış karaciğer toksisitesi ve ölümler saptanmıştır. Bu bilgiler doğrultusunda ölü doğum ve HSOS'nun yanı sıra anne karnında bu bileşiklere maruziyetin konjenital anomalilere neden olması beklenmektedir. Anne karnında bu bileşiklere maruz kalanların ileride immün bozukluklara sahip olmaları ve erken ölümleri de olası durumlardır. Gelişimsel ve üreme toksisitesi ile ilgili mevcut veriler sınırlı olduğundan güncel standartlara uygun çalışmalara ihtiyaç duyulduğu açıktır.

2.2.4. Pirolizidin alkaloidlerinin pulmoner toksisitesi

PA' nın hepatotoksisitesi kapsamlı bir şekilde araştırılmakla birlikte karaciğer dışındaki organlara etkileri konusunda eksiklikler bulunmaktadır. Bu organlardan biri de akciğerlerdir. Akciğerler üzerindeki verilerin çoğu bir retronesin tipi PA olan monokrotalin (MCT) üzerinedir. Tüm toksisite gösteren PA'lar metabolik aktivasyona uğrayarak DHPA oluşturur, bu metabolitler de proteinlerle bağlanarak pirol-protein eklentileri oluştururlar. Meydana gelen pirol-protein eklentilerinin miktarı, hedef organlarda ve hücrelerde oluşan toksisitenin şiddeti ile ilişkilidir. Bu nedenle, farklı toksik PA'dan üretilen DHPA'nın akciğer hasarına neden olabileceği yaygın bir fenomendir.

Song ve diğerleri (2020)'nin yaptığı bir çalışmada, bilinen bir pnömotoksin PA olan MCT, retronesin tipi PA'yı temsil eden retrorsin ve riddellin, otonesin tipi PA'yı temsil eden klivorin olmak üzere dört PA seçilmiştir. İnsanlardaki maruziyeti modellemek için ise sıçanlara iki retronesin tipi PA, senesiyonin ve senesifilin içeren *Gynura segetum* ekstresiyle pulmoner toksisite çalışması gerçekleştirmişlerdir. Bu çalışmada test edilen tüm PA'ların karaciğerde DHPA ürettikten sonra hepatotoksisite ve pnömotoksisiteye yol açtığı doğrulanmıştır. PA kaynaklı hepatotoksisite ve pnömotoksisitenin karşılaştırılması,

görünüŖe göre kan damarı endotel hasarı ile benzer bir patolojik sonucu paylaŖmaktadır. Organ duyarlılıkları konusunda daha fazla alıŖmaya ihtiyaç vardır (Yang ve diğerkleri, 2016; Song ve diğerkleri, 2020).

Pulmoner arteriyel hipertansiyon (PAH) gibi diğerk kronik hastalıkları da başlatarak sağı ventrikülün (RV) genişlemesine ve sağı kalp konjestif yetmezliğine yol açabilirler ve bazı konjenital anomalilere neden olabilirler (Edgar ve diğerkleri, 2015). Ŗiddetli PAH, pulmoner arter damarlarının yeniden Ŗekillenmesi ile karakterizedir ve sıklıkla damar direncinde bir artışa yol açan tam damar tıkanıklığını içerir. Yaygın histolojik bulgu, pulmoner arteriyollerini tıkayan ve kapatan karmaŖık, çok hücreli vasküler lezyonların varlığıdır. Tıkalı damarlar, pulmoner arterlerdeki kan akışını ciddi Ŗekilde sınırlar ve RV'nin son yükünü önemli ölçüde artırır, böylece RV işlev bozukluğunun gelişmesine sebep olur. Son otuz yıldır, insan pulmoner hipertansiyonunun araştırılmasında iki kemirgen modeli merkezi olmuştur: kronik hipoksiye maruz kalma modeli ve teknik basitlik, tekrar üretilebilirlik ve düşük maliyet sunduğı için bir PA olan MCT akciğerk hasarı modeli (Gomez-Arroyo ve diğerkleri, 2012). Kay ve diğerkleri (1967) tarafından yapılan sıçanlar üzerinde *Crotalaria spectabilis* tohumlarının diyetle alımına dayanan alıŖmaların neticesinde, uzun süreli oral uygulamanın, PAH'ı indüklediğini ve bunun, sağı ventriküler hipertrofi ve pulmoner gövde ve küçük pulmoner arterlerin mediyal kalınlığında bir artış ile ilişkili olduğı anlaşılmıştır (Kay ve diğerkleri, 1967). İnsanlarda klinik PAH vakalarıyla karşılaştırılabilen, deney hayvanlarında PAH üretmek için gereken PA dozları, genellikle HSOS üretmek için gerekenden daha düşüktür. MCT verilen kemirgenler üzerinde yapılan alıŖmanın, her ne kadar insan hastalığı modeline uygunluğunun az olduğına dair görüşler olsa da MCT-kemirgen modeli, PAH gelişimini incelemek ve tedavileri test etmek için en yaygın kullanılan model haline gelmiştir. Stenmark ve diğerkleri (2009) ve Gomez-Arroyo ve diğerkleri (2012), insanlarda görülen PAH ve PAH'ın MCT-kemirgen modelleri arasındaki bazı farklılıkları tartışmışlardır. Bu farklılıklar, PA'ların klinik PAH vakalarında görülmeyen ilk akut etkileriyle ilgili olduğı görünmektedir. İnsan dışı primatlarla yapılan çeşitli deneyler, PA'ya uzun süreli, düşük seviyede diyet maruziyeti için görüş sağlamaktadır. Nispeten yüksek dozda olan canlı ağırlık başına 30 mg/kg MCT'nin subkutan enjeksiyonunu takiben yaşı bağılı oldukça anlamlı bir farklılık gözlenmiştir. Ardından 4 haftalık ve 15 aylık maymunlara 2 ay arayla 60 mg / kg canlı ağırlık olmak üzere üç ek enjeksiyon yapılmıştır. Uygulanan çok yüksek dozlardan beklendiğı gibi, yaşı hayvanlar HSOS geliştirmiş ve tipik PA karaciğerk patolojisi göstermişken, genç maymunlar minimal karaciğerk patolojisi

göstermiş ve yavru primatlarda PAH geliştiği tespit edilmiştir. Daha genç maymunlardaki bu tepki, HSOS'a neden olmak için yetersiz toksik metabolitler veren ancak PAH'ı başlatmak için yeterli olan çok küçük miktarlardaki PA'ların ortaya çıkaracağı durumları temsil eder ve belki de kanser gibi diğer genotoksik durumlara yol açan somatik mutasyonlara neden olabilir (Stenmark ve diğerleri, 2009; Gomez-Arroyo ve diğerleri, 2012; Edgar ve diğerleri, 2015).

1975 yılında, bir Afrikalı gencin MCT içeren *Crotalaria laburnoides* bitkisini yutmasından kaynaklı olduğuna dair şüphelenilen PAH ile öldüğü bildirilmiştir (Heath ve diğerleri, 1975). Bunun dışında çok iyi araştırılmamış vakalar bulunmaktadır. İsviçre'de 66 yaşındaki bir kadının MCT dışında PA içeren karakafesotu (*Symphytum officinale*) alımından kaynaklanan PAH ile akciğer hasarının ortaya çıkma olasılığı bildirilmiştir (Gyorik ve Stricker, 2009).

2.2.5. Pirolizidin alkaloidlerinin kardiyovasküler etkileri

PA'lar, artan yüklerle birlikte RV genişlemesi ve konjestif yetmezlikle sonuçlanan PAH neden olur. *Crotalaria spectabilis* bitkisinin tohumlarından elde edilen makrosiklik bir PA olan MCT, PAH oluşumuna model bir bileşik olarak kullanılmaktadır. Uygulandığı deney hayvanlarında metabolik aktivasyon sonrası, akut nekrotizan pulmoner arterit ve RV hipertrofisi ile karakterize bir hastalık tablosu gelişir. Bu akut model insanların gıdalara bağlı kronik maruziyetleri göz önüne alındığında yeterli uygunlukta bir model olarak görülmemektedir (Gomez-Arroyo ve diğerleri, 2012). Deney hayvanlarında PAH üretmek için kullanılan dozlar, insanlarda HSOS meydana getiren dozlardan daha düşüktür. Bu durum belirgin karaciğer patolojisi olmadan nadiren meydana gelen PAH gelişimini açıklamaktadır. Çocuklar, etiyolojisi bilinmeyen PAH vakalarının önemli bir bölümünü oluşturmaktadır ve primatlarda, MCT ile üretilen PAH ile benzer etiyolojiye sahiptir. Primat çalışmasından elde edilen sonuçlar, gıdalarda bulunan miktarlara kronik maruziyetin etiyolojisi, bilinmeyen PAH vakalarından sorumlu olabileceğini düşündürmektedir.

BMP sinyal düzensizliği idiyopatik ve kalıtsal PAH klinik vakalarının özelliğidir ve PAH' da görülen vasküler hücre proliferasyonu ve pulmoner arteriollerin yeniden düzenlenmesinde rol oynamaktadır. MCT metabolitleri hayvan modellerinde BMP sinyal genlerinin mutasyonuna neden olur. Oluşan proliferatif, yarı-malign, hipertrofik (megalositik), apoptoz dirençli pleksiform düz kas hücreleri vasküler düzenlenmede ve

vazokonstriksiyondan sorumludurlar. PA'ların alkilasyonu nedeniyle kas hücrelerinde rabdomiyosarkoma yol açan duyarlılığı düz kas hücrelerinin patogenezeine paralel şekilde gelişebilir. Pulmoner arter endotel hücrelerinin hipertrofik karakteri yanında PA'lar ile zehirlenmiş hayvanlarda benzer karakterli megalositler akciğer, böbrek ve duodenumda saptanmıştır. Başlangıçta bölünme kabiliyetine sahip olmayan megalositlerin antimitotik etkili PA'lar ile bu durumlarının değişmesi öngörülmektedir. İdiyopatik PAH vakalarının %20'si BMP reseptörü II (BMP2) mutasyonları ile ilişkilidir ve ailevi PAH vakalarının %75'i BMP2'nin germ hattı mutasyonlarını taşımaktadır. Tek başına PAH'a neden olmak için yetersiz olan bu mutasyonlar PA varlığında PAH gelişimine önemli bir katkıda bulunabilir. Sirozlu 2459 hastayı kapsayan bir klinik çalışmada hastaların %0,61'inin portopulmoner hipertansiyon sergilediği ve diyetle bağlı bilinmeyen bir nedeninin portal ve pulmoner hipertansiyon birlikteliği için en uygun açıklama olduğu sonucuna varılmıştır. PA'lara diyetle maruz kalmanın etiyojisi belirsiz PAH vakalarına neden olabileceği ya da olası vakaları daha da şiddetlendireceği araştırılmalıdır (Edgar ve diğerleri, 2015).

2.2.6. Pirolizidin alkaloidlerinin genotoksik ve tümorojenik etkileri

PA'ların mutajenitesi, farklı biyolojik sistemlerde kapsamlı bir şekilde incelenmiştir. Genel olarak, PA'ların *in-vivo* ve *in-vitro* çalışmaları mutajeniktir ve mutajeniteleri karsinojen olmalarından sorumlu görünmektedir.

Birçok PA içeren bitkinin ve ayrı ayrı PA bileşiklerinin, test edildiği hayvan modellerinde, farklı dokularda karsinojen olduğu gösterilmiştir. PA'ların metabolik aktivasyonunun gerçekleştiği karaciğer aynı zamanda genotoksik ve tümorojenik etkiler için hedef organ olmakla birlikte tümörler, akciğer, böbrek, cilt, mesane, beyin ve omurilik, pankreas adacıkları ve adrenal bezinde de saptanmıştır (Chen ve diğerleri, 2010). PA'ların insanlarda tümör oluşturduğuna dair net bir kanıt bulunmamasına rağmen, Orta ve Güney Afrika'nın yerlilerinde primer karaciğer tümörlerinin sık görülmesi, geleneksel olarak PA içeren bitkilerin tüketimi ile ilişkilendirilmiştir (Pavlica ve Samuel, 1970; Schoental, 1968; Williams ve diğerleri, 1967; Chen ve diğerleri, 2010).

DHP esterleri ve DHP, DHP'den türetilen katım ürünleri, DNA ve proteinlerle çapraz bağlar oluşturmak için hücresel proteinlere ve DNA'daki nükleofilik gruplara hızlı bir şekilde bağlanan yüksek oranda reaktif alkilleyici ajanlardır. Bunun yanında toksik olmayan N-oksit bileşiklerinin de metabolik olarak geri dönüştürülebilir oldukları göz önünde

bulundurulmalıdır. Mevcut bilgiler, metabolik aktivasyon sonrası tümorojenik olduğu bilinen PA'ların buna paralel olarak genotoksik olduklarını da ortaya koymaktadır. DNA ile katım ürünleri oluşturan bu bileşiklerin DNA çapraz bağlaması, kromozom aberasyonları, kardeş kromatit değişimi, mikroçekirdek, çift sarmal kırıkları ve nokta mutasyonları gibi genotoksik hasarlar meydana getirdiği gösterilmiştir. DNA katım ürünleri daha fazla gen mutasyonunu indükleyebilirken, DNA çapraz bağları kromozom mutasyonlarını indükleme eğilimindedir (Chen ve diğerleri, 2010).

İnsan ve sıçan karaciğer mikrozomal metabolizmasından elde edilen ridellinin metabolik örnekleri ve DNA katım profili oldukça benzerlik göstermektedir. Bu noktadan yola çıkarak deneysel kemirgenler kullanılarak yapılan çalışmalardan elde edilen sonuçların insanlar için son derece önemli olduğu ve ridellinin insanlarda karsinojen olabileceği öne sürülmüştür (Xia ve diğerleri, 2003; Dusemund ve diğerleri, 2018). Sıçanlar pirolizidin toksisitesine karşı hassastır, bu durum kısmen karaciğerlerinde esteraz aktivitesinin olmamasına bağlıdır. Kobaylar ise yüksek karaciğer esteraz aktiviteleri nedeniyle PA'ların toksik etkilerine karşı belirgin bir dirence sahiptir. Bazı PA'ların bakterilerde negatif veya zayıf pozitif olarak tanımlanan mutajenik aktivitelerinin *Drosophila* veya kemirgen test sistemlerinde güçlü pozitif yanıtlar verdiği gözlenmiştir (Chen ve diğerleri, 2010).

PA'ların neden olduğu birincil DNA hasarları

PA'ların neden olduğu birincil DNA hasarları; DNA katım ürünleri, DNA çapraz bağlanması, DNA zincir kırıkları ve programlanmamış DNA sentezidir.

PA'nin *in vitro* ve *in vivo* metabolizması, DHP'den türetilmiş DNA katım ürünleri meydana getirmektedir. Birçok farklı tümörojenik PA ve bunları içeren bitki türlerinin *in-vivo* ve *in-vitro* olarak bu katım ürünleri ³²-P işaretleme/HPLC metodu kullanılarak gösterilmiştir. Bu PA'lar ve bunları içeren bitkiler arasında kruvasin, heliotrin, lasiokarpin, MCT, retrosin, karakafesotu kökü ekstresi, karakafesotu yağı, öksürükotu kökü ekstresi, Farfarae flos ekstresi ve *Ligularia hodgsonii* ekstreleri bulunmaktadır. DNA katım ürünlerinin miktarları ile ridellinin tümör oluşturuıcı etkisi korelasyon göstermektedir. Karaciğer katım ürünleri ve tümör oluşumu, parankimal ve büyük ölçüde endotel hücreleri kapsamaktadır ve hemanjiyosarkomlar endotel hücrelerinde gelişmektedir. Bu çalışmalardan elde edilen sonuçlar DNA katım ürünlerinin kısmen karaciğer tümörü gelişiminden sorumlu olduğunu göstermektedir.

PA'ların metabolitleri, nekin bazında C7 ve C9 pozisyonlarında DNA veya proteinlerle çapraz bağlama oluşturabilen iki fonksiyonel grup içerir. Pirolik PA'ların DNA-protein çapraz bağlama potansiyeli, deney hayvanlarında bilinen toksisite potansiyelleriyle uyumludur. Bu nedenle çapraz bağlanma muhtemelen toksisite ile ilişkilidir (Fu ve diğerleri, 2004). MCT metabolitleri üzerine yapılan bir araştırmada, çapraz bağlanma elektroforez ve elektron mikroskopu ile doğrulanmıştır (Pereira ve diğerleri, 1998). Rieben ve Coulombe (2004), yaptıkları çalışmada DNA-DNA çapraz bağlanmasının baz sekans tercihinin bulunmadığını tespit etmişken, Weidner ve diğerleri (1990) metabolitlerin, tercihen 5'-CG sekansına bağlandığını göstermiştir (Rieben ve Coulombe, 2004; Weidner ve diğerleri, 1990).

Hincks ve diğerleri (1991), alkalın elüsyon testini kullanarak, senesifilin, ridellin, retrorsin, senesiyonin, MCT, helyosupin ve latifolin dahil olmak üzere birkaç çift işlevli PA tarafından indüklenen DNA çapraz bağlarını ve DNA zinciri kırılmalarını incelemiştir. PA'lardan hiçbirinin saptanabilir miktarda tek zincirli DNA kırılmalarına neden olmadığı ifade edilmiştir. Petry ve diğerleri (1984, 1986) ise MCT ile bu durumu doğrulamıştır. Buna rağmen Uhl ve diğerleri (2000), comet yöntemiyle insan hepatoma hücreleri (HepG2) kullanarak isatidinin DNA tek sarmal kırıklarına neden olabileceğini göstermiş ve Silva-Neto ve diğerleri (2010) MCT ile çalışarak bu durumu doğrulamıştır. Bu durum Comet yönteminin tek sarmal kırıklarını saptamada daha hassas bir yöntem olması ile açıklanabilir (Hincks ve diğerleri, 1991; Petry ve Sipes, 1987; Petry ve diğerleri, 1986; Uhl ve diğerleri, 2000; Silva-Neto ve diğerleri, 2010). PA'ların DNA katım ürünleri gibi birincil hasarları ölçen programlanmamış DNA sentezi (UDS) çalışmaları da pozitif sonuçlar vermiştir (Chen ve diğerleri, 2010).

PA'ların neden olduğu kromozomal hasarlar

PA'ların meydana getirdiği kromozomal hasarlarla ilgili çalışmalar mikro çekirdek, kromozomal aberasyonlar ve kardeş kromatid değişimleridir.

Crotalaria tohumlarında, heliotrine, integerrimine, isatidin, MCT, ridellin, retrorsin, fulvine, lasiokarpin, petasitenin, seneciphylline, senkirkine gibi PA'ların birçok farklı hücre tipinde mikro çekirdek sıklığında artışa neden olduğu, kromozom aberasyonları meydana getirdiği ve kardeş kromatid değişimlerine (SCE) neden olduğu ölçülmüştür (Chen ve diğerleri, 2010).

PA tarafından mikro çekirdek indüksiyonu geniş çapta incelenmiştir ve sonuçlar, PA'nın güçlü klastojenik ajanlar oldukları, hepatositlerde, kemik iliği eritrositlerinde ve periferik kan hücrelerinde mikro çekirdek ürettiği yönündedir. Değişken sıcaklık ve nem koşulları altında 23 yıldan daha uzun süre saklanan ve ışığa maruz kalan *Senecio brasiliensis*'ten elde edilen integerrimin ve retrorsin ile saf integerrimin ile yapılan çalışma fare kemik iliğinin polikromatik eritrositlerinde, mikro çekirdek frekanslarında önemli artışa neden olduğunu ortaya koymuştur. Bu çalışma aynı zamanda uzun yıllar ve değişken koşullarda bile alkaloidlerin stabil kaldığını da ortaya koymaktadır. Çalışmanın tartışma bölümünde bu durumun alkaloidlerin toprakta birikerek diğer organizmalar tarafından doğrudan veya dolaylı olarak absorbe edilebileceği fikrinin ortaya koyulmasına neden olmuştur. (Santos-Mello ve diğerleri, 2002). *Crotalaria* tohumlarının ve MCT'nin, diyet yoluyla 6 gün süreyle uygulandığı farelerde kemik iliği mikro çekirdek sıklıklarının artışı ölçülmüştür. (Sanderson ve Clark, 1993). İsatidin, retrorsin ve MCT'nin, sıçan hepatosit kültürlerinde mikro çekirdek indüklediği bulunmuştur (Müller-Tegethoff ve diğerleri, 1995). Bir kirletici olan ridellinin 4 haftalık ve 13 haftalık kemirgen toksisite çalışmasında mikro çekirdek sıklığında artış bulunmamıştır, bu durum reaktif pirol ürünlerinin kısa süreli olarak oluştuğuna ve kemik iliğine ulaşana kadar karaciğer, akciğer ve kalpteki endotel hücrelerine bağlanıp kemik iliğine ulaşamaması şeklinde açıklanmıştır. 150 mg tek doz uygulamasında ise mikro çekirdek sıklıklarında hafif bir artış görülmüştür. Bu çalışma ridellinin hepatoselüler adenomların oluşumuna bağlı olarak dişi F344/N sıçanlarında karsinogen olduğunu ortaya koymuştur. Yine bu çalışmada ridellinin östrojen siklusunu fetal büyümeyi ve hayatta kalmayı etkilediği de gösterilmiştir (NTP, 2003).

Pek çok PA, uygun şekilde metabolik olarak aktive edildiklerinde memeli hücrelerinde veya fare kemik iliğinde kromozomal aberasyonlara neden olur. Ridellinin S9 fraksiyonu varlığında Çin hamster yumurtalık (CHO) hücrelerinde (NTP, 2003), heliotrin, lasiokarpin, petasitenin ve senkirkinin, V79 hücrelerinde (Takanashi ve diğerleri, 1980), integerriminin C57Bl/6 farelerinin kemik iliği hücrelerinde (Gimmler-Luz ve diğerleri, 1990) kromozomal aberasyonları indüklediği saptanmıştır. Bitki ekstraktlarına bakıldığında, MCT içeren *Crotalaria retusa* ekstresi (Ribeiro ve diğerleri, 1993), N-oksitleri de içeren tıbbi bitki olarak kullanılan *Heliotropium curassavicum* ekstresinin de (Carballo ve diğerleri, 1992) kromozomal aberasyonlara neden olduğu gösterilmiştir.

Ridelline, S9 varlığında ve S9 olmadan CHO hücrelerinde SCE'lerini indüklediği gösterilmiştir (NTP, 2003). Heliotrin, MCT, senesifilin ve senkirkinin, V79 hücrelerinde

(Bruggeman ve van der Hoeven, 1985), retronesin tipi PA'ların ortak reaktif pirolik metaboliti dehidroretronesin, insan lenfositlerinde (Ord ve diğerleri, 1985) SCE indüklediği gösterilmiştir.

İnsanlarda PA'larda genotoksisite çalışmaları nadirdir. HSOS'dan muzdarip çocuklarda kanda kromozomal aberasyonları saptanmış ve bu hasarların fulvin kaynaklı olduğu öne sürülmüştür (Martin ve diğerleri, 1972).

PA tarafından indüklenen mutasyonlar

PA mutajenik etkileri bakterilerde, *Drosophila* test sistemlerinde ve kemirgenlerde incelenmiştir. *Drosophila* test sistemleri, çok yönlü metabolik biyoaktivasyon sistemi ve çapraz bağlanan genotoksinlere karşı mükemmel duyarlılığı nedeniyle PA'yı test etmek için uygun bir test metodudur (Candrian ve diğerleri, 1984). Heliotrin, senesifilin, senkirkinin ve integerriminin bu test sisteminde mutasyonlara neden olduğu gösterilmiştir (Chen ve diğerleri, 2010).

Salmonella typhimurium/memeli mikrozom testi, PA'nin mutajenisitesini belirlemek için yaygın olarak kullanılmıştır. Yapılan çalışmalarda çok çeşitli sonuçlara rastlandığı görülmektedir. *S. typhimurium* test sisteminin, uygun bir aktivasyon enzimi sistemi uygulanmadıkça, PA'nin mutajenitesinin saptanması için hassas bir yöntem olmadığı görülmektedir.

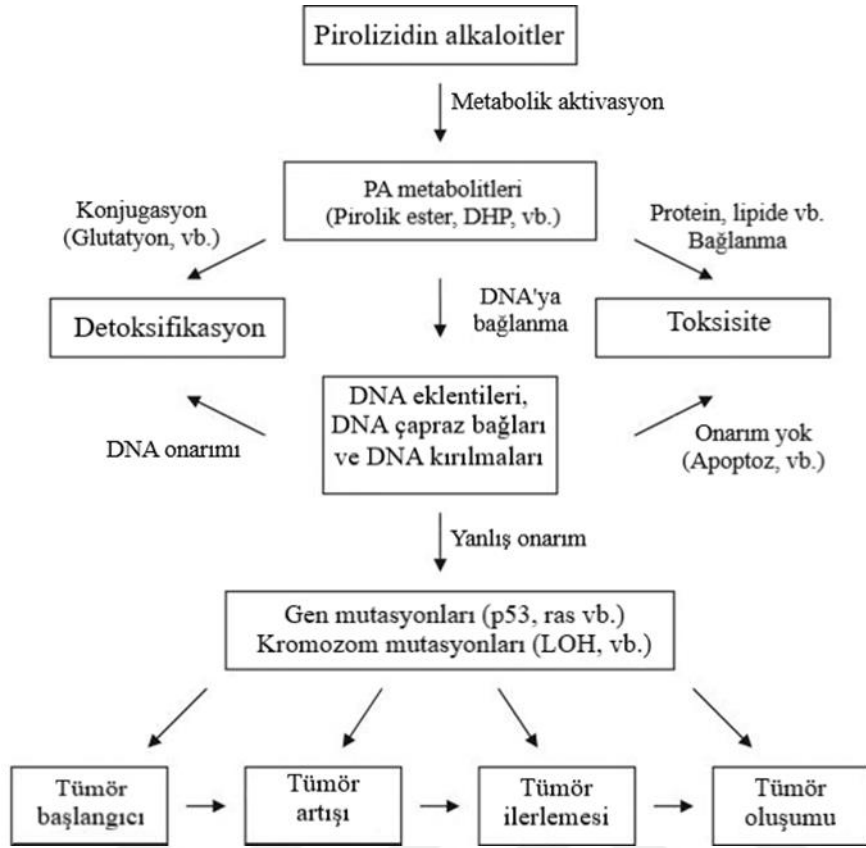
Çalışmaları inceleyecek olursak metinde birçok yerde toksisitesinden örnekler verdiğimiz ve PAH oluşturmada model bir bileşik olan MCT, *Escherichia coli* WP2 and WP2 uvrA (Green ve Muriel, 1975) ve S9 varlığında TA100 (Rubiolo ve diğerleri, 1992) suşlarında negatif sonuçlar vermiştir. Retrorsin, S9 varlığında TA98, TA100, TA1535 ve TA1537 suşları kullanıldığı çalışmada TA1535 ve TA1537 için mutajenik bulunmuştur bu da hem baz çifti ikamesi hem de çerçeve kayması mutasyonlarını indüklediğini göstermektedir. (Wehner ve diğerleri, 1979). Ridellin, *S. typhimurium* TA97, TA98, TA1535 S9 fraksiyonu varlığında ya da yokluğunda negatif sonuç verirken, S9 varlığında TA100 suşunda pozitif sonuç vermiştir (Chan, 1993). Bunun dışında bitki ekstraktları ile de çalışmalar yürütülmüştür. Örneğin *Jacobaea vulgaris* asetonlu ekstresinin S9 aktivasyonu ile test suşları TA98, TA100, TA1535 ve TA1537'de pozitif yanıtlar üretmiştir (White ve diğerleri, 1984). Retrorsin, senesivernin, senesifillin ve PA içeren bitkilerden elde edilen ekstraktlar *Senecio*

inaequidens, *S. fuchsii* (sin: *S. ovatus*) ve *S. cacaliaster* S9 varlığında bile sadece zayıf mutajenik aktivite göstermişlerdir (Rubiolo ve diğerleri, 1992).

Ridellin esas olarak sıçan veya fare karaciğerindeki endotelial hücrelerden gelişen karaciğer hemanjiyosarkomlarını indükler (Chan ve diğerleri, 2003). Kemirgenlerde yapılan çalışmalar, PA'ların, sıçan karaciğerinin cII geninde ve fare karaciğer tümörlerinin p53 ve K-ras genlerinde mutasyonlara neden olduğunu göstermiştir (Dusemund ve diğerleri, 2018). Ridelline tarafından indüklenen başlıca mutasyon tipleri, G: C $\rightarrow$ T: A transversiyonu ve GG $\rightarrow$ TT ve GG $\rightarrow$ AT'nin ardışık baz değişimleridir. Ridellin tarafından indüklenen mutasyon tipleri, G: C baz çiftlerini içeren hem mononükleotid hem de dinükleotid DNA eklentilerinin mutajenisiteden sorumlu olduğunu düşündürmektedir (Chen ve diğerleri, 2010). Ayrıca, Xia ve diğerleri (2003) bir çalışmasına göre, insan ve sıçan karaciğer mikrozomal metabolizmasından elde edilen ridellinin metabolik örnekleri ve DNA katım profili oldukça benzerlik göstermiştir. Buradan yola çıkarak kemirgenler kullanılarak yapılan deneysel çalışmalardan elde edilen sonuçların insanlar için son derece önemli olduğu ve ridellinin insanlarda karsinojen olabileceği öne sürülmüştür (Xia ve diğerleri, 2003).

Çalışmamızda ölçümlediğimiz karakafes otu karaciğer toksini ve karsinojendir (Hirono ve diğerleri, 1978). Karakafesotu ile indüklenen cII mutant DNA'sının sekans analizi, yüksek miktarda G: C $\rightarrow$ T: A transversiyonları ve tandem baz değişimlerinin indüksiyonu ile PA mutasyonlarının imzasını göstermektedir.

İnsanlarda PA'nin karsinogenisitesine ilişkin epidemiyolojik veri olmamasına rağmen değerlendirilen çalışmaların varlığında birkaç PA, insanlar için muhtemelen karsinojen olarak (grup 2B) sınıflandırılmıştır (Mei ve diğerleri, 2005; Chen ve diğerleri, 2010; IARC,1976). Aşağıdaki şekilde PA'ların varsayılan karsinojenik mekanizma aşamaları gösterilmiştir.



Şekil 2.5. PA karsinojenезinin varsayılan mekanizması (Chen ve diğerleri, 2010)

2.3. İnsan Maruziyetinde Pirolizidin Alkaloidlerin Ana Kaynakları

İnsanlar normal gıda alımı yoluyla PA'lara maruz kalabilirler ve tahılların kontaminasyonu sonucu bazı vakaların ortaya çıktığı bilinmektedir. PA'lara maruz kalma yolu esas olarak iki kaynaktan gelmektedir: Birincisi, otlar, bitkisel çaylar, bitkisel bazlı takviye edici gıdalar ve tıbbi amaçlı kullanılan bitkisel ilaçlardır. İkincisi ise, tarımsal faaliyetler sonucunda gıda zincirlerine PA'ların kontamine yoluyla kirlenen bal, et, süt, yumurta gibi gıdalardır (Chen ve diğerleri, 2021). Toksik PA içeren bitkilerin tüketilmesi potansiyel olarak insan sağlığını tehdit etmesine rağmen, dünya çapında geleneksel bitkisel ilaçlarda bu bitkilerin kullanımı devam etmektedir (Tamariz ve diğerleri, 2018). Düşük seviyelerde PA'lar tarafından periyodik olarak kontamine olduğu bildirilen diğer gıda maddeleri arasında süt, yumurta, et, bal, polen, çaylar ve bunları bileşen olarak içeren yiyeceklerde bulunmaktadır (Edgar ve diğerleri, 2015).

2015 yılında, EFSA'nın destekleyici bir yayını, Avrupa'nın farklı bölgelerinde hayvan ve bitki kaynaklı ürünlerde, çaylarda, bitkisel infüzyonlarda ve gıda takviyelerinde PA varlığını değerlendirmiştir (EFSA 2016, Mulder ve diğerleri, 2015). Bu kapsamda Toplam 1105 örnek

(746 hayvan kökenli ve 359 bitki kökenli) değerlendirilmiştir. Hayvansal kökenli numuneler çoğunlukla PA içermiyordu, bu durum kısmen et ürünlerinde analitik yöntemlerin sınırlanmasından olabileceği belirtilmiştir. Süt numunelerinin (182 numunenin %6'sında) düşük seviyelerde PA seviyeleri saptanmıştır. Çay örneklerinin analizi, yüksek oranda (166 örneğin %91'i) bir veya daha fazla PA içerdiğini ortaya koymuştur. Perakende pazarından elde edilip örneklenen çayların analizinde, siyah, yeşil, rooibos, melisa, nane, papatya, rezene, ısırgan otu ve karışık bitki çaylarında PA ile kontaminasyon olduğunu göstermiştir Rooibos çayı, PA toplamının en yüksek konsantrasyonunu (ortalama konsantrasyon 7,99 µg/L) ve papatya çayı en düşük konsantrasyonu (3,67 µg/L) göstermiştir. (Bodi ve diğerleri, 2014).

2016 yılında EFSA, bitki kaynaklı gıda tüketimi yoluyla Avrupa popülasyonunda PA'ya yönelik bir diyet maruziyet değerlendirmesi yayınlamıştır. Sonuç olarak, insan PA maruziyetinin ana kaynağı olarak bitki çaylarının tüketimi görülmüştür. Aynı araştırma PA sentezlediği bilinen bitkilerden üretilen bazı takviye edici gıdaların PA seviyelerinin çok yüksek olduğu rapor edilmiştir (EFSA, 2016).

2.3.1. Arı ürünleri- bal ve polen

Birçok ülkede arıcıların, bal üretimi için bazı PA içeren bitkileri düzenli olarak kullandıkları belirtilmiştir (Ma ve diğerleri, 2018). Balda bulunan PA'ların, arılar nektarları toplarken yanlışlıkla polene de bulaşması yoluyla olabileceği öne sürülmüştür (Boppré ve diğerleri, 2005). PA içeren bitkilerden elde edilen polen, son derece yüksek seviyede PANO formlarını içerir (Kempf ve diğerleri, 2010). Arıcılar da hasat sırasında veya sonrasında yanlışlıkla veya kasıtlı olarak bala polen katabilirler. Takviye edici gıdalarda arı poleni granülleri, polen taneleri ve nektar (arılar tarafından bağlayıcı madde olarak kullanılır) içermektedir. Avrupa'da PA'lar üzerine yapılan bir çalışmada, on iki polen ürününün on birinde PA'ların ortalama 576,0 µg/kg konsantrasyonda olduğu tespit edilmiş, propolis ve arı sütü ürünlerinde ise 0,6 ve 15,5 µg/kg miktarları bildirilmiştir (Mulder ve diğerleri, 2017; Ma ve diğerleri, 2018).

2.3.2. Tahıl kontaminasyonu

Kontamine olmuş tahılların kullanımından kitlesel zehirlenmeler meydana gelmiştir (Tandon ve diğerleri, 1976; Schuster ve diğerleri, 1993; Van Egmond ve diğerleri, 2011).

En eski vaka 1920'lerde meydana gelen 'Ekmek zehirlenmesi' olarak adlandırılan olaydır (Willmot ve Robertson, 1920). Bu süreci 2008'de hem Afganistan'da hem de Etiyopya'da meydana gelen yeni vakalar takip etmiştir (Molyneux ve diğerleri, 2011). Günümüzde, ekmeğin kontamine olması sonucunda ortaya çıkan akut PA toksisitesi vakaları, birçok ülkede mahsullerdeki yabancı otların etkili bir şekilde kontrol edilmesiyle önlenmektedir. Hasat sırasında tahıla yapışan ince bitki tozlarının PA'ların kaynağı olduğu düşünülmektedir. Büyük ölçekte tahıl üretimi yapan ülkelerde farklı ekim alanlarından hasat edilen tahıllar birleştirilerek belirli bir hacim oluşturulur. Bu durum, tahıldaki PA'ların seviyesini seyreltse de mevcut olan herhangi bir PA'nın dağılımı daha geniş alana yayılmasına neden olmaktadır. Böylece bu tehlikeli kimyasalların düşük seviyelerine maruz kalan nüfus sayısını artırmaktadır (Edgar ve diğerleri, 2015; Ma ve diğerleri, 2018).

2.3.3. Süt kontaminasyonu

Sıçanlarda ve farelerde PA'ların süte geçişi üzerine bir dizi deney gerçekleştirilmiştir (Edgar ve diğerleri, 2011). Bunların en başında, lasiokarpın ve retronesin PA'ları emziren sıçanlara uygulandığında anneler üzerinde görünür bir etkisi olmamasına rağmen, yavrularının farklı karaciğer lezyonları sonucu öldüğünü gösteren çalışma yer almaktadır. Bu durumun, çocukluktaki çeşitli karaciğer bozukluklarının süten gelen PA'larla zehirlenme sonucu olabileceğine işaret edilmiştir (Ma ve diğerleri, 2018). Ayrıca başka bir çalışmada *Senecio jacobaea* (sin: *Jacobaea vulgaris*) ile beslenmiş emziren keçilerden elde edilmiş sütü tüketen sıçanlarda karaciğer lezyonlarının ortaya çıkabileceği gösterilmiştir (Prakash ve diğerleri, 1999). Karaciğerde üretilen PANO'lar normalde hızlı bir şekilde idrarla atılsa da emziren hayvanlarda belirli bir oranda süten sulu fazında tutulabilir. Nihai toksik metabolitler olan dehidroretronesin ve dehidroheliotridinin de nispeten suda yüksek çözünürlüklerine bağlı olarak süte geçme olasılığının dikkate alınması gerektiği ifade edilmiştir (Ma ve diğerleri, 2018).

2.3.4. Tavuk yumurtası kontaminasyonu

PA'ların yemden yumurtalara transferinin gerçekleştiği ifade edilmiştir (Ma ve diğerleri, 2018). Diaz, Almeida ve Gardner (2014), yumurtalarda bulunan kalıntıların esas olarak PA serbest baz türünden kaynaklandığını ve PANO'ların çok az katkısı olduğunu bildirmiştir. Edgar ve Smith (2000), yumurtalarda 5–168 mg / kg PA seviyelerini bildirmiştir. Bu

durumun, tavuk yemlerinde *Heliotropium europaeum* (akrep otu) ve *Echium plantagineum* (kırkbatıran) kontaminasyonunun neden olduğu ifade edilmiştir (Diaz ve diğerleri, 2014; Edgar ve Smith, 2000).

2.3.5. Et kontaminasyonu

Hayvanların yiyecek aradığı otlaklarda ve tarlalarda çeşitli PA'ları içeren bitkiler bulunabilir. Özellikle yaygın olarak kullanılan ve bir yem ürünü olan yoncanın taze ve kurutulmuş hallerinde bulunabilirler (EFSA, 2011). Hayvanlar tarafından tüketildiğinde, PA'ların bir kısmı hayvansal kaynaklı gıda ürünlerine aktarılacaktır (Edgar ve Smith, 2000; Hoogenboom ve diğerleri, 2011; Ma ve diğerleri, 2018). Hayvansal kaynaklı ürünlere PA'ların transferi ve bulunma seviyeleri nispeten düşük görünse de, çeşitli PA'ların genotoksik ve kanserojen özelliklerinden dolayı düşük seviyelerde alımın bile olumsuz etkilere neden olabileceği bilinmektedir (Edgar ve diğerleri, 2015). PA içeren *Trichodesma* türlerine maruz bırakılmış hayvanlardan elde edilen pişmiş etlerle yavruların beslendiği deneyler bildirilmiştir. 3-4 ay içinde ölüme veya geri döndürülemez patolojik değişikliklerin üretilmesine neden olduğu ve toksik alkaloit kalıntıların eti pişirme ile tahrip edilemeyeceği sonucuna varılmıştır (Mulder ve diğerleri, 2016; Ma ve diğerleri, 2018).

2.3.6. Salatalar, çaylar ve takviye edici gıdalar

Salata yapraklarına benzer görünümde olan yaygın yabani ot *Senecio vulgaris* yapraklarının, Almanya'daki süpermarketlerde kazara satıldığı iyi bilinmektedir (BfR, 2007). PA içeren bitkiler çay ve sos yapmak için de tercih edilmektedir (Rasenack ve diğerleri, 2003).

Bodi ve diğerlerinin (2014) yaptığı çalışmalar, EFSA'nın (2016) yayınladığı raporlara dayanarak PA'lerin en fazla maruz kalındığı ürünlerin, ana maruziyet kaynaklarının bitkisel çaylar, takviye edici gıdalar ve tıbbi amaçla kullanılan bitkisel ilaçlar olduğu ifade edilmiştir. Bodi ve diğerlerinin (2014), 24 siyah, 23 yeşil, 24 rooibos, 29 nane, 39 papatya ve 43 karışık çay dahil olmak üzere toplamda 274 kuru bitki çayını analiz ettiği çalışmada, 10 farklı PA ve 7 farklı PANO tespit etmişlerdir. Pozitif çayların yüzdesi % 86 (nane çayları) ile % 100 (rooibos çayları) arasında değişmektedir. Bu çalışmada, rooibos çayının en yüksek oranda kontamine olduğu bulunmuştur (ortalama: 1856,4 µg / kg, maksimum: 5647,2 µg / kg) (Bodi ve diğerleri, 2014) (Bodi ve diğerleri, 2014).

Schulz ve diğerkleri (2015), Alman pazarından tedarik ettikleri 169 tıbbi amaçlı kullanılan bitkiyi analiz etmiş ve 14 farklı PA ve 9 farklı PANO'nun varlığını tespit etmişlerdir (Schulz ve diğerkleri, 2015).

Griffin, Gosetto, Danaher, Sabatini, and Furey, (2014), İrlanda pazarından temin edilebilen 18 kuru bitki çayını analiz etmiş ve 10 farklı PA ve 4 farklı PANO içerdiklerini tespit etmişlerdir. Bunlara ek olarak, ortalama ve maksimum kontaminasyon miktarının sırasıyla 210 ve 1733 µg / kg olduğu ifade edilmiştir (Griffin ve diğerkleri, 2014).

Mulder ve diğerkleri (2015) kurutulmuş bitki materyalleri, (kurutulmuş) bitki özleri veya bitkinin uçucu yağını içeren tabletler veya kapsüller şeklinde bulunan takviye edici gıdalarla çalışma gerçekleştirmiştir. Farmasötik ürünlerde kullanılan bazı PA üreten bitkiler (örneğin, *Echium*, *Borago*, *Symphytum*, *Petasitis* veya *Tussilago* cinsine ait türler) takviye edici gıdalarda da kullanılmaktadır. *Echium* ve *Borago*'nun müstahzarları, takviye edici gıdalarda kullanıldığında çoğunlukla yağ esaslıdır. Genel olarak, PA üreten bitkilerin yağ bazlı müstahzarlarını içeren takviye edici gıdaların PA içermediği ifade edilmektedir. Maksimum PA seviyesi 2.410.275 µg / kg olmak üzere, PA üreten koyuntırpağı (*Eupatorium cannabinum*) temelli bir takviye edici gıdada (kapsüller) ölçülmüştür. PA üreten bitkilere dayalı takviye edici gıdaların, PA maruziyetlerine önemli ölçüde katkıda bulunabileceği ifade edilmiştir (Mulder ve diğerkleri, 2015; Dusemund ve diğerkleri, 2018).

2.3.7. *Tussilago farfara* L. (Öksürükotu, Asteraceae)

Tussilago'nun bitkisel müstahzarları geleneksel tıpta öksürük, balgam, bronşit ve astımlı durumların tedavisinde kullanılmıştır. Bunun dışında bugün antimikrobiyal, antitüberküler, antioksidan, nöroprotektif, antitussif, balgam söktürücü ve anti-inflamatuvar etkilerini gösteren çalışmalar bulunmaktadır. Senkirkin, *Tussilago*'da tespit edilen ve en yaygın olarak bildirilen PA'dır (Kopp ve diğerkleri, 2020). Bulgaristan'da yapılan bir çalışmada majör alkaloidler olarak senkirkine ve senecionine, minör bileşenler olarak integerrimin ve seneciphylline bulunmuştur. Alkaloid içeriği nispeten düşük miktarlarda (%0,0055) veya 55 µg/g olarak tespit edilmiştir (Nedelcheva ve diğerkleri, 2015).

2.3.8. *Symphytum officinale* L. (Karakafes otu, Boraginaceae)

Karakafesotu (*Symphytum officinale*.), anti-inflamatuar ve analjezik etkilerine dayalı olarak tıbbi bir bitki olarak kullanılır. Karakafesotu kökü % 0,013–1,2 oranında PA içerir. Intermedine ve lycopsamine ve bunların N-oksit ve asetil formları majör PA'lardır. Trifan ve diğerlerinin (2018) köklerde yaptıkları çalışmada, intermedine 0.142 ± 0.003 mg/g; lycopsamine 0.146 ± 0.009 mg/g miktarlarında saptanmıştır. Bunun yanında *Symphytum* türleri antioksidan aktiviteye sahip rosmarinik asit ve salvianolik asitler gibi önemli bir fenolik bileşikler de içerirler (Trifan ve diğerleri, 2018).

2.3.9. *Camellia sinensis* (L.) Kuntze (Yeşil Çay, Theaceae)

Yeşil çay bitkisinden (*Camellia sinensis*) fermentasyon ve oksidasyonu önleyen bir süreçle elde edilmektedir. İçecek olarak geleneksel yeşil çayın uzun bir tüketim geçmişi olmasına rağmen, yeşil çay özütlerinin 'nutrasötikler' olarak da anılan -özellikle kilo vermeye yardımcı olarak pazarlanan- diyet takviyelerinde kullanımı nispeten yeni bir gelişmedir (Jurgens ve diğerleri, 2012).

Yeşil çay ekstresi üretme işlemi tipik olarak *Camellia sinensis*'in yapraklarının ve gövdelerinin suyla veya çoğunlukla alkoller gibi diğer organik çözücü karışımlarının ekstraksiyonu ile gerçekleştirilir. Ayrıca kafeinsizleştirme içeriyorsa, toksik olmayan süper kritik karbon dioksit veya kloroform ve diklorometan gibi toksik çözücüler kullanılabilir. Ekstreler, istenmeyen kalıntıları gidermek için bir sentetik reçine emiciden süzülerek daha da rafine edilebilir. Bu tür işlemler kateşinler ve ayrıca pestisit kalıntıları, toksik element safsızlıkları veya PA'lar gibi potansiyel kirletici maddelerin konsantrasyonunu artırabilir (Oketch-Rabah ve diğerleri, 2020).

Çayların PA'lar ile kontaminasyonu bildirilmiştir ve bu kontaminasyonun çay yapraklarının doymamış PA'lar içeren bitkilerle birlikte hasat edilmesinden kaynaklandığı düşünülmektedir. PA'ların ortalama konsantrasyonunun $3.8 \mu\text{g}$ ve saptama yapılan %95 çayda ise $6.1 \mu\text{g/L}$ olduğunu bildirmiştir. EFSA'nın analiz ettiği 310 yeşil çay infüzyon örneğinde, toplam PA konsantrasyonuna katkıda bulunan ana bileşikler senesiyonin-N-oksit (%19), retrorsin-N-oksit (%18) ve intermedine ve likosamin (%16) olarak saptanmıştır (EFSA ANS, 2018).

Yeşil çay ekstralarında PA'ların hepatotoksisite ile ilişkili veri olmamakla birlikte yeşil çay ekstraları ile ilişkili karaciğer hasarının karakteristikleri akut PA hepatosisitesinden farklı olarak hepatoselülerdir (EFSA, 2016).

2.4. PA veya PA İçeren Ürünlerin Yasal Durumu ve Değerlendirmesi

EFSA CONTAM Paneli bir akut referans doz (ARfD) belirleyemese de insan zehirlenmesi vakalarından elde edilen sınırlı bilgiler, akut/kısa vadeli etkilerle ilişkili olarak günde yaklaşık 2 mg/kg vücut ağırlığı olarak bilinen en düşük dozun belirlenmesine izin verdi. Bu değer 2 hafta boyunca, günde yaklaşık vücut ağırlığı başına 0,8-1,7 mg PA/kg alan, HVD tanısı konan 6 aylık bir kız bebek ve 4 gün boyunca yaklaşık vücut ağırlığı başına 3 mg/kg doza maruz kalan ve ölümle sonuçlanan 2 aylık bir erkek bebek vakalarına dayandırılmıştır (EFSA CONTAM, 2017b).

PA ile ilgili ilk sınırlar 1992 yılında Alman Federal Sağlık Bakanlığı tarafından PA üreten bitkilerin bitkisel preparatlarını içeren farmasötik ürünlere yönelik olarak belirlenmiştir. Altı haftalık bir süre boyunca maruziyetin 1 µg/gün'ü geçmemesi önerilmiştir. Daha uzun kullanım durumunda ise bu seviye 0.1 µg/gün'e düşürülmüştür. Tussilago farfara'nın bitkisel infüzyonları veya dekoksionları için 10 µg/gün kabul edilmiştir. 2011 yılında alım riski ve yüksek toksisite nedeniyle, Almanya Federal Risk Değerlendirme Enstitüsü (BfR), günlük olarak 0.007 µg/kg vücut ağırlığı (yani, 60 kg'lık bir insan için 0.42 µg) alımının geçilmemesini tavsiye etmiştir. Sonrasında ise BfR, EFSA tarafından uygulanan risk değerlendirmesini yeni bir temel kabul etmiştir. BfR tarafından açıkça belirtilmemiş olmasına rağmen, 2011'den itibaren vücut ağırlığının kg'ı başına önerilen 0.007 µg/kg PA değerinin yaklaşık 3 katlık bir artış anlamına gelmektedir. BfR, PA içeren bitkilerden alınan takviyelerin kullanılmamasını önermektedir. Günlük 0,1 µg/kg vücut ağırlığı olan Sağlık Temelli Kılavuz Değeri ise kanserojen olmayan etkiler temelinde hesaplandığından değişmemiştir (Kopp, 2020).

2011 yılında EFSA CONTAM paneli o ana kadar ki mevcut bilgiler doğrultusunda insanların beslenme yoluyla PA'ya maruz kalmasıyla ilgili hem kronik hem de akut riskleri kapsamlı bir şekilde değerlendirmiş, kronik etkiler için tüm 1,2-doymamış PA'nın genotoksik ve kanserojen reaktif pirollerin oluşumuna yol açan ortak bir metabolik yolu paylaştığı sonucuna varmıştır (EFSA CONTAM, 2017b). 2011 yılında EFSA, PA ile ilgili

tolere edilebilir bir günlük alımın (TDI) belirlenemeyeceği sonucuna varmıştır. 1,2-doymamış PA'ların genotoksik ve karsinojen olduğu düşünüldüğünde, bu risk değerlendirmesi Maruz Kalma Marjı (MOE) yaklaşımına dayanmaktadır.

PA ile ilgili riskler gelişmiş analitik teknikler nedeniyle son yıllarda ilgi çekmektedir. PA ile ilgili ciddi endişelerin yanında, mevcut riskler ve sağlık etkisine ilişkin herhangi bir sayısallaştırma yapılmamıştır. Gerçek maruziyet kaynaklı kanıtlardan, bireysel veya toplam PA için tolere edilebilir insan eşik dozları belirlenmemiştir ve mevcut önerilen düzenleyici eşik değerler yalnızca deneysel verilere dayanmaktadır. İnsan PA maruziyetinin önlenmesi veya azaltılması, uzun vadeli, düşük doz toksik yükten kaynaklı olası zararlardan kaçınmayı amaçlamaktadır. PA hayvan verilerinden insanlara kantitatif ekstrapolasyonu, büyük belirsizliklerle sonuçlanan büyük bilgi boşluklarını kabul etmektedir. Bu belirsizlikleri gidermek ve zarar vermeme konusunda makul bir kesinliğe sahip sınır değerleri belirlemek için geniş güvenlik faktörleri uygulanmaktadır (maruz kalma hayvan: insan > 10.000) (Habs ve diğerleri, 2017).

Toksikokinetik ve toksikodinamikte türler arası ve türler arası olası farklılıklar, hücre döngüsü kontrolü ve DNA onarımında bireyler arası insan değişkenliği ve BMDL10 (Doz seviyesinin, arka plan seviyesinin üzerinde %10 fazladan kanser insidansı ile sonuçlanan daha düşük güven sınırı) bir etki seviyesi değildir (EFSA, 2005). 10.000' in altındaki MOE değerleri, insan sağlığı için potansiyel bir endişe olabileceğini göstermektedir (EFSA, 2005). Risk değerlendirmeleri, belirli bitki çaylarının uzun süreli tüketiminin, özellikle yaşam boyu maruz kalma göz önüne alındığında, insan sağlığı için potansiyel bir risk oluşturabileceğini düşündürmektedir (BfR, 2013; Chen ve diğerleri, 2017; EFSA, 2016).

MOE yaklaşımında, “belirli bir popülasyon için küçük ama ölçülebilir bir yan etkinin ilk gözlemlendiği dozu ve dikkate alınan maddeye maruziyet seviyesini değerlendiren iki faktör oranı” yaklaşımı izlenmektedir. Tanımlanan MOE, günde 7 ng / kg vücut ağırlığı maruziyeti için 1: 10.000'dir. Örnek olarak, 70 kg'lık bir birey için bu, yaklaşık günlük 500 ng PA'ya karşılık gelir.

Toksikolojik verilere ve genotoksik karsinojenlerin değerlendirilmesi/yönetimi için mevcut kılavuzlara dayanan Avrupa İlaç Ajansı, vücut ağırlığı 50 olan bir kişi için günlük

maksimum 0,35 µg PA/kg gün ve ömür boyu maruz kalma alımını önererek PA'nın tehlikeleri konusunda endişelerini de göstermiştir.

EFSA ve BfR'nin yeni risk değerlendirmeleri, lasiokarpın yerine ridellin üzerine yapılan Ulusal Toksikoloji Programı (NTP) çalışmasına dayanmaktadır ve 237 µg/kg vücut ağırlığı/günlük olmak üzere üç kat daha yüksek bir referans noktası elde etmiştir. Bu, etkin bir şekilde 0.0237 µg/kg vücut ağırlığı/gün'den daha düşük bir maruziyetin düşük bir sağlık sorunu olarak kabul edildiği anlamına gelir (maruziyet sınırı 10.000'den büyük) (EFSA CONTAM, 2017b).

Almanya' da Üreticilerin 2013-2018 yılları arasında topladığı veriler, özellikle son 3 yılda bitkisel ilaçlar ve bitkisel ekstraktlarda PA yükünde dikkate değer bir azalma gözlemlenebildiğini göstermektedir. 2018 veri değerlendirmesine göre, bitkisel ilaçların %63'ü nihai ürünle ilgili kişi başına günlük 1,0 µg PA maruziyet limitini karşılamaktadır. Bununla birlikte, 0.35 µg/gün sınırı, bitkisel ilaçların yalnızca %37'si tarafından karşılanabileceği öngörülmüştür (Steinhof, 2019).

2.4.1. Bitkisel tıbbi ürünlerde PA kontaminasyonu ve limit değerler

Alman sağlık otoritesi, 1992'de *Symphytum*, *Petasites* and *Tussilago* gibi tıbbi amaçlı kullanılan bitkiler için kademeli plan kararı açıklamıştır. Bu plana göre kişi başına maksimum günlük doz oral kullanım için yılda 6 haftaya kadar 1 µg ve zaman sınırlaması olmadan 0.1µg, cilt uygulamaları için altı haftaya kadar kişi başına 100µg ve zaman sınırlaması olmadan 10 µg olarak belirlenmiştir. 2014 tarihli Bitkisel Tıbbi Ürünler Komitesi Kamu Bildirimi, nihai ürünle ilgili kişi başına günlük maksimum PA alımını 0.35µg olarak önermiştir (HMPC, 2014). Bunun sonucu olarak Alman bitkisel endüstrisi tarafından bitkisel tıbbi ürünlerdeki PA içeriğini en aza indirmek için araştırma, testler gibi acil önlemler başlatılmış olup bitki yetiştiricileri ile yakın iş birliği içinde uygulama kuralları geliştirilmiştir. Sıvı kromatografi-kütle spektrometresi/kütle spektrometresi (LC-MS/MS) yöntemiyle 28 madde test kapsamına alınmıştır. Bitkisel Tıbbi Ürünler Komitesinin 31 Mayıs 2016 tarihli Kamu Bildirimi üç yıl boyunca geçerli kişi başına 1.0 µg maksimum miktarı geçiş limiti olarak önermekte ve bu süreden sonra kişi başına günlük maksimum 0.35µg PA alımının uygulanmasını öngörmektedir. Nihai üründe bu sınırın aşılmasına neden olan PA içeriği olan bitkisel ilaçlar pazarlanamayacaktır (HMPC, 2016). 2019 yılında geçiş

sınırının süresi iki yıl daha uzatılmıştır. (HMPC, 2019). 2013-2018 yılları arasında üreticiler tarafından toplanan veriler, alınan önlemlerin belirtilen aralığın son 3 yılında bitkisel ilaç ve bitkisel ekstraktlarda PA miktarında dikkate değer bir düşüşün olduğunu göstermektedir. 2018 veri değerlendirmesine göre, bitkisel ilaçların %63'ünün 1.0 µg limitini sağladığı, 0.35 µg/gün limitini ise %37'sinin sağlayabileceğini ortaya koymaktadır (Steinhof, 2019).

Avrupa dışına bakıldığında Amerika Birleşik Devletleri'nde, Gıda ve İlaç Dairesi, PA içeren karakafes müstahzarlarının piyasadan yasaklanmasını düzenlemiştir (FDA, 2001). Ülkemizde Tarım ve Orman Bakanlığı Risk Değerlendirme Hizmetleri, zehirli ve zararlı oldukları için gıda amaçlı kullanımlarda yasaklanması gereken bitkiler listesini 2020 yılında yayınlamış ve bünyesinde PA bulunduran bitkileride dahil etmiştir. Bu listede *Amsickia hispida* bitkisinin tüm bitki ve köklerinin, *Anchusa sp.* (Sığırdili, arıotu, güriiz) bitkisinin tüm bitki ve köklerinin, *Brachyglottis repens* bitkisinin tüm bitki ve kök kısımlarında, *Caltha sp.* (Batakılık Nergisi) bitkisinin tüm bitki ve köklerinin, *Cordia sp.* bitkisinin tüm bitki ve kök kısımlarında, *Crotolaria sp.* bitkisinin tüm bitki ve köklerinin, *Echium sp.* (Engerekotu) bitkisinin tüm bitki ve köklerinin, *Erechtites hieracifolia* bitkisinin tüm bitki ve köklerinin, *Farfugium japonicum* bitkisinin tüm bitki ve köklerinin, *Heliotropium sp.* (Aygünçiçeği, Bozot, Siğilotu) bitkisinin tüm bitki ve köklerinin, *Lithospermium officinale* (Tıbbi taşkesenotu, İnciotu) bitkisinin tüm bitki ve köklerinin, *Myosotis sp.* (Mine, Unutma beni, Boncukotu, Kuşgözü) bitkisinin tüm bitki ve köklerinin, *Parsonia heterophylla* bitkisinin tüm bitki ve köklerinin, *Petasites sp.* bitkisinin tüm bitki ve köklerinin, *Senecio sp.* (Senekiyo, Tilki Üzümlü) bitkisinin çiçek, tüm bitki ve köklerinin, *Symphytum sp.* (karakafesotu) bitkisinin tüm bitki ve köklerinin, *Tussilago sp.* (Öksürükotu) bitkisinin tüm bitki ve köklerinin PA taşıdığı ifade edilmiştir (T:C: Tarım ve Orman Bakanlığı, 2020). Çeşitli risk değerlendirme otoriteleri tarafından çıkarılan sonuçlar değerlendirildiğinde, günlük PA alım limiti konusunda fikir birliği yoktur, ancak bu otoritelerin hepsi PA'nın gıdalardaki istenmeyen bir bileşik sınıfı olduğu konusunda hemfikirdir.

Çizelge 2.1. PA önerilen referans değer örnekleri (HMPC, 2020)

Otorite	Referans Değerler
Bundesgesundheitsamt (BGA) (1992)	günde 1 µg (yılda maksimum 6 hafta)
Alman Federal İlaç ve Tıbbi Cihaz Enstitüsü (BfArM) (2016)	günde 0,1 µg (kısıtlama yok) (yalnızca tıbbi ürünler için) günde maksimum 1 µg
EFSA (2011)	70 µg/kg gün
EFSA (2017)	237 µg/kg gün
Avustralya Yeni Zelanda Gıda Standartları (FSANZ) (2001)	1 µg/kg v.a. gün (güvenli seviye, geçici) (tolere edilebilir günlük alım - VOD kaçınmaya dayanır; kanser riski kanıtlanmadı)
Hollanda Ulusal Halk Sağlığı ve Çevre Enstitüsü (RIVM) (2007)	0,1 µg/kg v.a. gün (günde 0,43 ng / kg v.a. sanal güvenli doza göre)
Hollanda Ulusal Halk Sağlığı ve Çevre Enstitüsü (RIVM) (2015)	1 µg/kg bitki çayları ve bitki veya bitki özleri içeren diğer gıda ürünleri ve içecekler
Toksisite Komitesi (COT) (2008)	Günde 0,1 µg/kg v.a gün (kanser olmaması olası değildir) Günde 0,007 µg/kg vücut ağırlığı (kansere olasılığı düşüktür)

2.4.2. Bitkisel ilaçlar

1992'de Almanya'da 1,2 konumunda doymamış nesin sistemi bulunan PA içeren tıbbi ürünlerle ilgili kademeli bir plan yürürlüğe girmiştir. Dâhili kullanım için bu tür PA'nın maksimum günlük maruziyet dozları yılda en fazla 6 hafta süreyle kullanım için 1 µg ve süre sınırlaması olmaksızın 0,1 µg olarak belirlenmiştir. Kutanöz uygulama durumunda maksimum günlük PA dozu, yılda 6 haftayı geçmemek şartıyla 100 µg ve kullanım süresinde herhangi bir sınırlama olmaksızın 10 µg'dır. Ayrıca ürünlerle ilgili düzenlemede fetüslerin ve çocukların PA'nın neden olduğu hastalıklara duyarlılığı nedeniyle "Hamilelikte ve

emzirme döneminde kullanılmamalıdır'' ifadesiyle etiketlenmelidir. PA içeren bitkilerle kontaminasyona ilişkin devam eden ve yeni tartışmalarla birlikte Alman sağlık otoritesi tarafından getirilen bu yaklaşım doğal olarak PA içeren bitkilerden üretilen tıbbi ürünler için hala geçerlidir (Bundesanzeiger, 1992). Belçika'da, PA içeren dahili kullanılan tıbbi ürünlerin pazarlanmasına izin verilmez ve Avusturya'da, PA içeren bitkilerden elde edilen bitkisel müstahzarları içeren tıbbi ürünün son üründe PA bulunmadığının kanıtlanması gerekmektedir. Diğer bazı ülkeler Beşeri Tıbbi Ürünler Komitesi (CPMP) belgesine "Ciddi riskleri olan bitkisel ilaçlar- Güvenlik nedenleriyle geri çekilen şifalı bitkiler ve bitkisel türevlerin listesi" atıfta bulunmaktadır (HMPC, 2020). 2016 yılında, bazı Avrupa Birliği (AB) düzenleyici otoriteleri bitkisel tıbbi ürünlerde (HMP) PA kontaminasyonu konusunu ele almış, mevcut verilerin gözden geçirilmesinin ardından, EMA (HMPC), kendi pazarları için kontrollerin uygulanmasında uyumlu bir yaklaşımı benimseyen üye devletleri desteklemek için bir kamu bildirisi yayınlamıştır. Halk sağlığı açısından, 3 yıllık bir geçiş dönemi boyunca günde maksimum 1,0 µg PA alımına yol açan bir HMP kontaminasyon seviyesi kabul edilebilir olarak kabul görmüştür. Bu süre zarfında, HMP üreticilerinin, kontaminasyonu günde 0,35 µg PA'yı geçmeyen günlük alımla sonuçlanan bir seviyeye kadar düşürmek için gerekli önlemleri almaları istenmeleri belirtilmektedir (HPMC, 2016). Ocak 2019'da HMPC, devam eden görüşmeler ve uyumlandırma çabaları nedeniyle 2 yıl daha uzatılmış bir geçiş dönemi önermeyi kabul etmiştir. Üreticiler, günlük alımın günde 1,0 µg PA'yı aşmamasını sağlamak için gelişmiş iyi tarım ve toplama uygulaması (GACP) dahil uygun eylemleri almaya devam etmeleri gerektiği belirtilmiştir (HMPC, 2020).

2.4.3. Gıda maddeleri

Gıda alanda da tek tip düzenleme eksik olsa da gıda maddeleri için bazı düzenleyici veriler mevcuttur (HMPC, 2020). 2011 yılında EFSA, temel olarak balda PA'nın oluşumuna odaklanan gıdalardaki toksik, doymamış PA hakkında bir görüş yayınlamıştır (EFSA, 2011). EFSA, 1,2-doymamış PA'nın genotoksik ve kanserojen özelliklerine dayanarak, TDI oluşturmanın uygun olmadığını ve bunun yerine MOE yaklaşımını uygulamasına karar verildiğini belirtmektedir. Erkek sıçanlarda lasiokarpin ile karaciğer hemanjiyosarkomlarının indüklenmesi için günde 70 µg/kg v.a. fazladan kanser riski için bir Benchmark Doz (%10 yanıt verir) (BMDL₁₀) hesaplanmış ve tahmini diyet maruziyeti ile karşılaştırma için referans noktası olarak kullanılmıştır. Yetişkinler için MOE'lerin (tüketim verilerine göre hesaplanan) düşük endişe kaynağı olduğu görülürken (10.000 veya daha

yüksek MOE), yüksek bal tüketicisi olan çocuklar için bir risk olduğu sonucuna varılmıştır. EFSA, 2017 yılında toksik doymamış PA'ya ilişkin yenilenmiş bir görüş yayınlamıştır (EFSA CONTAM, 2017b). Bunun öncesinde, "Risk değerlendirmesinde Benchmark doz yaklaşımının kullanımı" (EFSA, 2017a) revizyonu yapılmıştır. Bu bağlamda, ilgili araçların hala geliştirilme aşamasında olduğunu ve herkes tarafından kolayca erişilebilir olmayabileceğini kabul ederken, BMD güven aralığını hesaplamak için tercih edilen yöntem olarak model ortalaması önerilmektedir. Benchmark Doz (BMD) analizi için kullanılacak varsayılan modeller seti gözden geçirilmiş ve farklı matematiksel modellerin bir doz-yanıt veri setine uyumunun karakterize etmek için log-olabilirlik yerine Akaike bilgi kriteri (AIC) tanıtılmıştır. Bu BMD model ortalama yaklaşımı, lasiokarpine ve ridelline maruz kalan erkek ve dişi sıçanlarda karaciğer hemanjiyosarkom insidansının veri setlerine uygulanmıştır. Model ortalamasını kullanan doz yanıt ilişkisi ridellin için BMD modellemesi, çalışmanın doz yanıt ilişkisine yönelik zayıf bilgilerden kaynaklı nispeten yüksek belirsizliğe rağmen, test edilen iki yüksek dozun (günde 237-714 µg/kg bw eşdeğer) tamamen dahil edildiği daha dar bir BMDL₁₀ – BMDU₁₀ aralığı ile sonuçlanmıştır. Bu nedenle EFSA, PA'nın kronik risk değerlendirmesi için ridelline maruz kalan dişi sıçanlarda karaciğer hemanjiyosarkom insidansından türetilen günde 237 µg/kg vücut ağırlığı BMDL₁₀'u seçmiştir (EFSA, 2017a).

2.4.4. Diğer Yaklaşımlar

Bitkilerde meydana gelen çok fazla sayıdaki PA'ları ve N-oksitleri tüm konjenlerin (türdeşlerin) toksisitesi hakkında kapsamlı in vivo veriler üretmeyi imkânsız hale getirir. Bu konjenlerin gıda ve bitkisel ilaçlarda kirletici maddeler veya bileşenler olarak fazla miktarda bulunmasına rağmen, çok sınırlı karşılaştırmalı toksikolojik veri mevcuttur ve konjenere özgü verilere ihtiyaç duyulmaktadır. Konjenlere özgü yeterince veri olmadığı için tüm PA'ları, lasiokarpin (EFSA, 2011) veya ridellin (EFSA, 2017a) gibi güçlü toksisiteye sahip PA'lar en kötü durum yaklaşımları kullanılarak sınıflandırılır. Şu an için mevcut olan verilere dayanarak, bilimsel olarak kabul edilen nicel yapı aktivite ilişkisi de yoktur. Bu yaklaşım riskin aşırı tahmin edilmesiyle, tüketiciler ve hastalar arasında endişe yaratabilecek değerli ilaçların ve gıda takviyelerinin pazarlanması ve kullanımı için uygun olmayan kısıtlamalara da yol açabilir. Mevcut risk değerlendirmeleri çerçevesinde, pirolizidin alkaloidleri, karsinogenesitelerine göre kümülatif etkileri olan bir grup eşdeğer madde olarak kabul edilmektedir (EFSA, 2017a; BAH, 2016).

PA risk değerlendirmeleri hayvan çalışmalarına dayanmaktadır ve bu nedenle hayvan dozlarını insan maruziyet risklerine çevirmek için farklı yaklaşımlar onerilmiştir. Toksisiteyi etkileyebilecek türler arasındaki farklılıklar, yani metabolik yollar dikkate alınarak rehber dokümanlar geliştirilmiştir. Bazı gruplar, insanlarda PA'nın etkilerini tahmin etmek için hayvan modellerinin uygunluğunu gözden geçirilmiştir. Bulgular, hayvan ve insan sonuçları arasında doğrudan karşılaştırmanın her zaman mümkün olmadığını vurgulamaktadır. Örneğin, hayvanlar için önceden bildirilen PA kaynaklı tümör oluşumu, bugüne kadar insanlarda gösterilmemiştir. Türler arasındaki farklılıkların insanlarda kantitatif risk değerlendirmesi için hayvanlardaki sonuçları hariç tutup tutmaması gerektiği hala açık bir sorudur (Habs ve diğerleri, 2017).

Mevcut risk değerlendirmeleri alternatif olarak sınırlı veriye dayananan, 1,2-doymamış PA'ların toksik ve genotoksik potansiyeli için göreceli etki faktörleri (iREP) yayımlamıştır. Bu faktörlerin, sınıflandırma kriterleri kullanılarak diğer pirolizidin alkaloidleri konjenerleri için 7R-mono-esterler 0.01; 7S-mono-esterler 0.3; Açık zincirli 7R-di-esterler 0.1; Açık zincirli 7S-di-esterler ve siklik di-esterler 1.0 olarak kullanılabileceği onerilmektedir. Maruziyetin değerlendirilmesi için toksikokinetik çalışmalara da ihtiyaç vardır. Ayrıca, PA'ların türevi N-oksitleri için özel değerlendirmeye ihtiyaç duyabilir, bunun nedeni bağırsak mikroflorasının N-oksitleri önemli ölçüde daha toksik ana PA'lara dönüştürebilmesi ve karaciğerde endojen enzimlerle de indirgenmesidir (Merz ve Schrenk, 2016). Bu çeşitli yaklaşımlar ilerleyen yıllarda değerlendirmede kendilerine yer bulabilirler. Fizyolojik temelli farmakokinetik (PBPK) modellemesinin kullanımı da araştırılan diğer konulardan biri olarak görülmektedir.

2.5. Pirolizidin Alkaloid Bileşiklerinin Bitkilerden Ekstraksiyonu

Ekstraksiyon zeltilerden veya katı karışımlardan bir maddeyi, grubu veya istenmeyen safsızlıkları çeşitli fiziko-kimyasal özelliklerden ayırmak için uygulanan bir işlemdir. Ekstraksiyonun önemli parametreleri çözücü seçimi, sıcaklık, parçacık boyutu ve ekstraksiyon sresidir. PA bileşiklerinin bitkilerden ekstraksiyonu için katı faz ekstraksiyon yöntemleri yaygın olarak kullanılmaktadır. Katı faz ekstraksiyonun temel prensibi sıvı fazda bulunan analitlerin katı fazda tutulması, daha sonra ortama ilave edilen bir çözücü ile katı fazdan analitlerin geri alınmasıdır. Bu amaçla standardize kartuşlar/şırıngalar kullanılmaktadır.

Temel olarak eser miktarda bulunan PA grubunun analitlerin zenginleştirilmesini ve analize uygun hale getirilmesi amaçlanmaktadır.

Sulu asidik bir PA ekstraksiyonu ve katı faz kartuşunun seçiminin ardından ekstraksiyon temel olarak dört basamaktan meydana gelmektedir. Şartlandırma basamağında adsorbanın çözücüsü ile adsorbanın fonksiyonel gruplarının çözünmesini sağlanır. Ardından su veya sulu tampon çözeltisi ile kolon aktive edilir. Alıkoyma basamağında yerçekimi ve gerekirse vakum altında numune sistemden geçirilir ve analitler adsorban tarafından tutulur. Yıkama basamağında istenmeyen bileşikler kolondan yıkama ile uzaklaştır ve son olarak elüsyon basamağında katı fazda tutunan analitler çözücü yardımıyla çözünerek alınır.

2.6. Pirolizidin Alkaloid Bileşiklerinin Analizlerinde Kullanılan Yöntemler

PA analizleri için ince tabaka kromatografisi (İTK), nükleer manyetik rezonans (NMR), immünolojik yöntemler ve gaz kromatografisi-kütle spektrometresi (GC-MS) yöntemleri kullanılabilmektedir. Halihazırda ise LC'nin MS ile birleştirildiği teknikler az işleme gerek duyulması (dolayısıyla analitlerde değişim riskinin azalması) ve PA'ların ve PA N-oksitlerinin karmaşık matrislerde eşzamanlı spesifik ve hassas tespiti avantajı nedeniyle uluslararası kurumlar tarafından da tercih edilmektedir. Ayrıca yöntem ile intermedine/likopsamine gibi izomerlerin ayrımı gerçekleştirilebilmektedir.



3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Yöntemin Amaç ve Prensipleri

Çalışmamız kapsamında bitkisel çaylardaki PA'ların miktarlarını belirleyebilmek için, kuadropol uçuş zamanlı kütle spektrometresi-sıvı kromatografisine (LC-MS QTOF) dayalı bir yöntem valide edilmiştir. Yöntem Pirolizidin alkaloitlerinin (PA) belirlenmesi Alman Federal Risk Değerlendirme Enstitüsünün bitki materyalinde sıvı kromatografi tandem kütle spektrometrisi ile birleştirilmiş katı faz ekstraksiyonu (SPE-LC-MS/MS) ile belirlenmesi BfR-PA-Tea-2.0/2014 Metot Protokolü temel alınarak modifikasyon yapılmış ve SANTE / 2019/12682 gerekliliklerine göre valide edilmiştir.

Çalışmamızda BfR' nin metod protokolünde yer alan 28 adet PA tanımlaması gerçekleştirilmiştir. Bunlar uluslararası adlarıyla echimidine (Em), echimidine-N-oksit(EmN), erucifoline (Er), erucifoline-N-oksit(ErN), europine (Eu), europine-N-oksit(EuN), heliotrine (Hn), heliotrine-N-oksit(HnN), intermedine (Im), inter-medine-N-oksit(ImN), jacobine (Jb), jacobine-N-oksit(JbN), lasiocarpine (Lc), lasiocarpine-N-oksit(LcN), lycopsamine (La), lycopsamine-N-oksit(LaN), monocrotaline (Mc), monocrotaline-N-oksit(McN), retrorsine (Re), retrorsine-N-oksit(ReN), senecionine (Sc), senecionine-N-oksit(ScN), seneciphylline (Sp), seneciphylline-N-oksit(SpN), senecivernine (Sv), senecivernine-N-oksit(SvN), senkirkine (Sk), trichodesmine (Td).

Yöntemin temel prensibi bitki materyalinden alınan bir test kısmının, PA ekstraksiyonu için seyreltik sülfürik asit solüsyonunda iki kez sonikasyona tabi tutulması, santrifüjlemeden sonra, süpernatant elüsyonunun, ters fazlı C18 malzemesi kullanılarak katı faz ekstraksiyonu (SPE) ile saflaştırılması ve PA'ların metanol kullanılarak kartuştan elue edilmesi, ardından uçurulması ve metanol-su içerisinde tekrar çözülmesine dayanmaktadır. Kromatografik ayırma için, ikili gradyanlı bir Ters Faz- Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (RP-HPLC) kolonu kullanılır. Analitler, kütle spektrometrisi ile tespit edilir. PA'ların miktar tayini, matris uyumlu kalibrasyon vasıtasıyla gerçekleştirilir (BfR, 2014).

3.2. Kullanılan Maddeler ve Diğer Sarf Malzemeler

Çalışma sırasında kullanılan kimyasallar için cilt temasından kaçınılmış, gerekli önlemler alınmış, çeker ocak gibi uygun ekipmanlar kullanılmıştır. LC-MS için uygun analitik dereceli reaktifler ve solventler kullanılmıştır. Milipore sisteminden elde edilmiş ultra saf su kullanılmıştır.

3.3. Kullanılan Kimyasallar, Alet ve Cihazlar

- Methanol (Merck[®], Mfr. No#1.06007.2500, LOT#I1065207 949)
- Sülfürik asit (Merck[®], Mfr. No#1.00731.2500)
- Amonyak %25 (Merck[®], Mfr. No#1.05422.2500, LOT#K25767722 843)
- Saf su (Merck[®], Mfr. No#1.15333.2500, LOT#OC346636)
- Ultra saf su (Simplicity[®] 185, millipore)
- Amonyum format (Sigma Aldrich[®], Mfr. No#70221-25G-F)
- Formik asit (J.T.Baker[®], Part No#6062)
- Filtre Millex Syringe-GP (33mm, LOT#SLGP033RS)
- Katı Faz Ekstraksiyon Kartuşu Strata C18-E (55µm, 70A)(Phenomenex[®], Part No#8B-S001-HCH)
- Santrifüj Tüpü 15 ml (Greiner[®], Item No#188261)
- Santrifüj Tüpü 50 ml (Greiner[®], Item No#227270)
- Otomatik pipet 20-200 µl (Thermo Scientific[®], Finn timer F1, Mfr. No# 4641080N)
- Otomatik pipet 100-1000 µl (Thermo Scientific[®], Finn timer F1, Mfr. No# 4641100N)
- Vorteks (Labnet[®])
- Vakum Manifold Sistemi (Phenomenex[®])
- Hassas Terazî (Shimadzu[®] AW320)
- pH Metre (Mettler Toledo[®])
- Soğutmalı Tezgâh Üstü Santrifüj (Sigma[®] 2-16KL)
- Çalkalamalı Su Banyosu (Nüve[®] ST 402)
- Buzdolabı (Arçelik[®])
- Porselen Havan
- Deney tüpü standı
- Latex eldiven

- Koruyucu gözlük
- Maske
- 2ml Vial (Biotage®)
- Uçurma İstasyonu (Biotage® TurboVap-LV)
- HPLC Kolon (Agilent® 5TC-C18(2))
- Q-TOF LC/MS Cihazı (Agilent® 6550 iFunnel)

3.4. Kullanılan Kimyasallar Numunelerin Temin Edilmesi

Çalışmamızda yerli markalar tercih edilerek internet ve aktar üzerinden çeşitli çay ve kapsül ve tablet örnekleri alınmıştır. Örneklerin kodlandırılması Çizelge 3.1’de sunulmuştur.

Çizelge 3.1. Kullanılan numunelerin kodlandırılması

Beyan Edilen İçerik	Kod	Belirtilmiş ise kullanım şekli
Yeşil Çay Kapsül	CKME	Günde 2 kez
Yeşil Çay Kapsül	CKBT	Günde 2 kez
Yeşil Çay Kapsül	CKSN	Günde 2 kez
Yeşil Çay ve diğ Kapsül	CKPF	Günde 2 kez
Yeşil Çay, Guarana ve diğ. Tablet	CKHT	Günde 2 kez
Yeşil Çay, spirulina ve diğ. Kapsül	CKGC	Günde 2 kez
Isırgan, kekik ve diğ Kapsül	IKTD	Günde 2 kez
Yeşil Çay (Markasız)	CSUN	
Yeşil Çay	CSKB	
Yeşil Çay demlik poşet	CSHD	
Detoks Çayı demlik poşet: Yeşil çay, Isırgan ve diğ	FHBD	
Form Çayı demlik poşet: Sinameki, ısırgan, papatya ve diğ	FAFM	
Form Çayı; Yeşil çay, papatya, ısırgan ve diğ	FFLF	
Form Çayı demlik poşet: Yeşil çay, acı çehre, kekik	FACF	

Çizelge 3.1. Kullanılan numunelerin kodlandırılması (devam)

Form Çayı demlik poşet: Isırgan, Sinameki ve diğ.	FGVF	
Form Çayı demlik poşet: Sinameki, Kantaron ve diğ	FPFC	
Form Çayı demlik poşet: Yeşil Çay, Mate ve diğ	FDBB	
Form Çayı: Sinameki, ısırgan ve diğ	FLSP	
Zayıflama Çayı: Markasız: Yeşil çay ve diğ	FUC	
Zayıflama Çayı Markasız: Yeşil Çay ve diğ	FUY	
Zayıflama Çayı Markasız: Yeşil çay, Kekik ve diğ	FUK	
Kış Çayı: Papatya, ıhlamur, adaçayı ve diğ	MRKS	
Papatya Çayı demlik poşet:	MRN	
Papatya Çayı demlik poşet:	MRS	
Papatya Çayı demlik poşet	MRH	
Papatya Çayı demlik poşet	MRL	
Papatya Çayı	MRF	
Papatya Çayı	MRO	
Papatya Çayı	MRD	
Papatya Çayı	MRB	
Öksürük Otu	TUSF	
Kara Kafes Otu	SOI	Bir bardak suya 1 tutam 5dk
Kara Kafes Otu Markasız	SOU	
Sarı Kantaron	HP	1 bardak suya 1 tatlı kaşığı 10dk

3.5. Alkaloid Ekstraksiyonu

3.5.1. Çözeltilerin hazırlanması

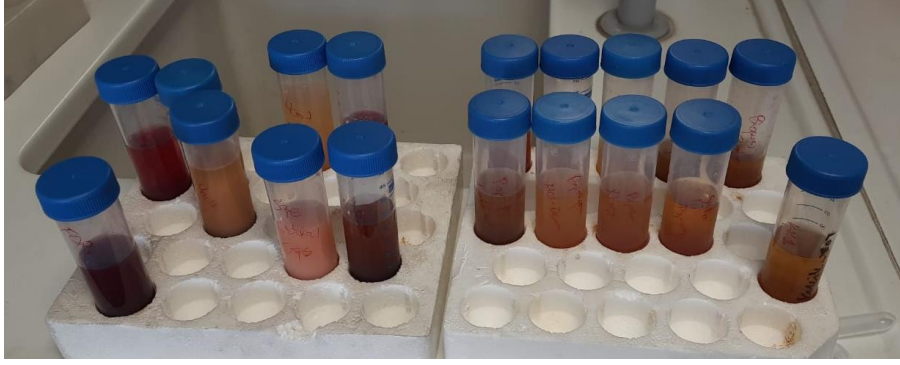
- Ekstraksiyon çözeltisi: 2.665 mL sülfürik asit (H_2SO_4) 1000 mL'ye su ile tamamlanır. Nihai konsantrasyon 0.05 M'dir.
- Nötralizasyon için sulu amonyak çözeltisi: SPE'den önce numune ekstraktlarının nötralizasyonu için çözelti hazırlanırken, 5 mL amonyak 25 mL'ye su ile tamamlanır.
- SPE elüsyonu için metanol içinde %2,5 amonyak çözeltisi: 7.8 mL amonyak 100 mL'ye metanol ile tamamlanır. Çözelti, günlük taze olarak hazırlanmıştır.

3.6. Numune Hazırlama

- Çay, kapsül ve tablet örnekleri buz ile soğutularak mekanik olarak homojenize edilir.
- Homojenize edilmiş örneklerden 2g tartılarak santrifüj tüplerine aktarılır.
- 20 ml 0.05M H_2SO_4 ilave edilir vorteksenerek, çalkalamalı su banyosunda 15 dk boyunca (40 °C) ekstrakte edilir.
- Numune 3800 x g'de 10 dk santrifüjlenir.
- Süpernatant kâğıt filtreden geçirilerek temiz bir test tüpüne aktarılır.
- Tortu, ikinci ekstraksiyon adımı için kullanılır.
- 20 mL ekstraksiyon solüsyonu ilave edilir, vorteksenir, su banyosunda işlem tekrarlanır.
- Üst fazlar birleştirilir.
- pH şeritleri yardımıyla, amonyak çözeltisi ile pH=7 olacak şekilde nötralize edilir.



Resim 3.1. Örneklerin hazırlanması

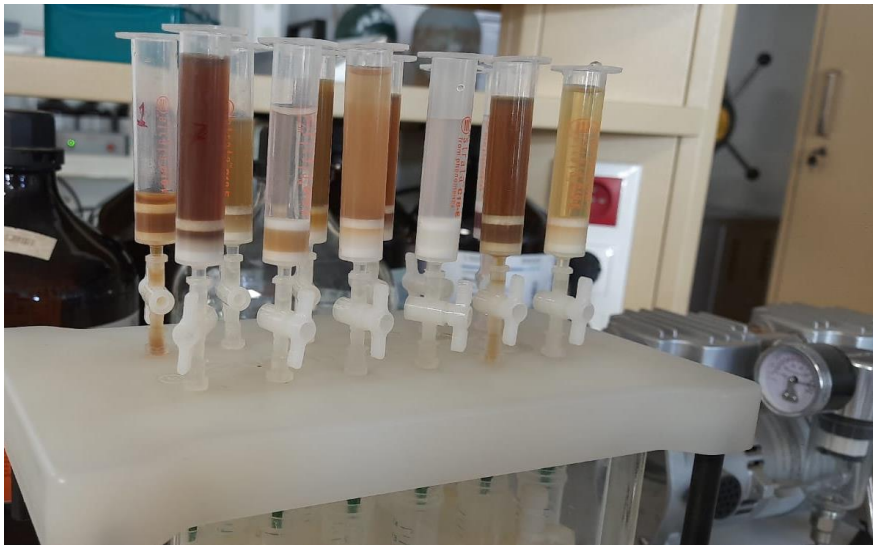


Resim 3.2. Hazırlanmış numuneler

3.7. Alkaloid Ekstraksiyonu Katı Faz Uygulaması (SPE)

- Katı faz ekstraksiyonu C18-E (55um, 70A) kartuşlarla, vakum manifold kullanılarak gerçekleştirilmiştir. SPE toplamda 5 basamakta gerçekleştirilmektedir.

Şartlama 1. Basamak	5 mL of metanol
Şartlama 2. Basamak	5 mL su
Örnek yükleme	10 ml nötralize örnek
Yıkama	2x5ml su
Kartuşların kurutulması	5 - 10 dakika (vakum)
Elüsyon	2x5 ml Metanol (%2,5 Amonyak)



Resim 3.3. Katı faz ekstraksiyonunun örnek yüklenmiş aşaması

- Uçurma işlemi, 50 °C'de azot gazı altında Turbovap cihazı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Cihaza uygulama öncesi su ve metanol karışımı (8:2 v/v) içinde yeniden çözülmüş 6000 rpm'de santrifüj edilerek 1ml'si filtre edilerek viallere aktarılmıştır.



Resim 3.4. Azot jeneratörlü Turbovap cihazına yüklenmiş numuneler

3.8. LC-MS Q-TOF Analizi

HPLC mobil faz

- Mobil Faz A: 315 mg amonyum format ve 1 mL formik asit ultra saf su ile karıştırılarak 1000 mL'ye su ile tamamlanır.
- Mobil Faz B: Metanol 1000 mL'ye tamamlanır.

Kalibrasyon standartları

- Stok solüsyonu (0,1 mg/mL): Bir stok çözelti oluşturmak için, 1 mg pirolizidin alkaloid standartları analitik terazi ile tartılarak ve 10 mL ye asetronitril ile tamamlanır. Stok solüsyonunun konsantrasyonu 0.1 mg/mL'dir.
- Standart çalışma solüsyonu (PA karışımı, 1 µg/mL): Standart çalışma solüsyonunun hazırlanması için, her bir PA stok solüsyonunun (0.1 mg/mL) ilgili hacimleri bir ölçülü balona pipetlenir ve 1 µg/mL'lik bir konsantrasyon elde etmek üzere asetronitril (3.2.34) ile tamamlanır.

- Matris uyumlu standartların hazırlanması: Matris etkilerinin düzeltilmesi için matris uyumlu bir kalibrasyon kullanılmıştır. Kalibrasyon solüsyonunda nihai PA kütle konsantrasyonları 0.5, 2.5, 5, 10, 25, 50, 100 ng/mL' dir.

LC Ayarları

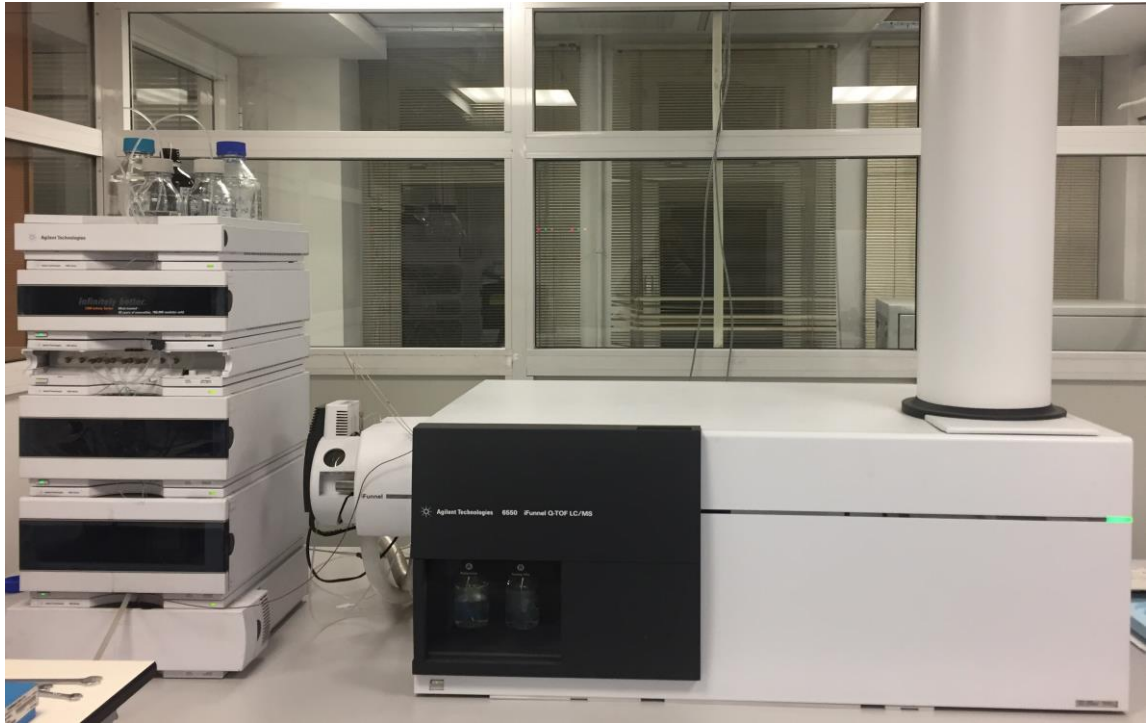
Çizelge 3.2. LC Parametreleri

Analiz süresi	42 dk.
Mobil Faz A	5mM amonyum format + %0.1 formik asit
Mobil Faz B	Metanol
Akış	0.60 ml/dk
Akış programı	0 dk-10 % B
	2 dk-10 % B
	3 dk-20 % B
	6 dk-20 % B
	22 dk-70 % B
	26.5 dk-90 % B
	33 dk-90 % B
	33.1 dk-10 % B
	35 dk-10 % B
Kolon	Agilent TC-C18 (4.6 mm x 150 mm x 5 µm)
Kolon Sıcaklığı	35 °C
Kolon Akışı	0.6 ml/min
Enjeksiyon Hacmi	5 µl
Enjeksiyon Temizleme	3 sn yıkama bağlantı noktası

MS Ayarları

Çizelge 3.3. MS Parametreleri

MS parametreleri	
Kurutma gazı sıcaklığı(° C)	290°C
Kurutma gazı akışı (L/min)	14 L/min
Kılıf gazı sıcaklığı. (° C)	350 °C
Kılıf gazı akışı (L / dak)	11 L/min
Nebulizatör, psi	40 psi
Fragmentor voltajı	400 V
Kılcal voltaj	1500 V
Nozzle voltaj (V)	500 V
Skimmer1	65
OctopoleRFPeak	750
İyonizasyon modu	Pozitif iyonizasyon, Agilent Jet Stream teknoloji Çift Elektrosprey
Edinme modu MS:	50-1000 amu



Resim 3.5. LC-MS QTOF cihazı



4. BULGULAR

4.1. PA'ların ve N-oksitlerinin LC-MS QTOF Cihazından Elde Edilen Bulgular

Çizelge 4.1.'de PA'ların ve N-oksitlerinin kütle verileri ve alıkonma süreleri verilmiştir. Bu çizelge ile numunelerimizdeki PA'ların ve N-oksitlerinin kütle verileri ve alıkonma sürelerinin referans bilgilerle kıyaslanması sağlanacaktır.

Çizelge 4.1. PA'ların ve N-oksitlerinin kütle verileri ve alıkonma süreleri

Bileşik	Transition	Alıkonma Zamanı (RT)
Monocrotaline N-oksit	342.1547	9,700
Erucifiline N-oksit	366.1548	12,550
Europine N-oksit	346.1860	13,100
Intermediene N-oksit	316.1755	13,200
Intermediene	300.1800	13,300
Jajobine N-oksit	368.1704	13,700
Europine	330.1913	13,700
Lycopsamine N-oksit	316.1756	13,750
Lycopsamine	300.1801	13,900
Monocrotaline	326.1598	14,100
Retrorsine N-oksit	368.1703	16,700
Helliotrine N-oksit	330.1914	17,400
Erucifoline	350.1592	17,600
Helliotrine	314.1963	17,800
Seneciphyline N-oksit	350.1605	19,500
Senecionine N-oksit	352.1757	19,500

Çizelge 4.3. Kodlanmış numunelerde tespit edilen PA'lar ve N-oksitleri (ng/g)

ng/g	Im	ImN	La	LaN	Eu	EuN	Hn	HnN	McN	ScN	Sk
CKME	9,46	52,37	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
CKBT	10,71	29,82	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	33,62	n.d.	n.d.
CKSN	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
CKPF	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
CKHT	n.d.	48,11	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
CKGC	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
IKTD	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
CSUN	8,28	30,91	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
CSKB	10,69	46,98	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
CSHD	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
FHBD	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
FAFM	7,16	23,34	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
FFLF	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
FACF	23,60	213,79	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
FGVF	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
FPFC	7,91	76,85	n.d.	n.d.	n.d.	15,23	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
FDBB	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
FLSP	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
FUC	152,11	2311,92	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
FUY	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
FUK	83,56	514,92	n.d.	n.d.	9,50	68,27	2,46	172,32	n.d.	n.d.	n.d.

Çizelge 4.3. Kodlanmış numunelerde tespit edilen PA'lar ve N-oksitleri (ng/g) (devam)

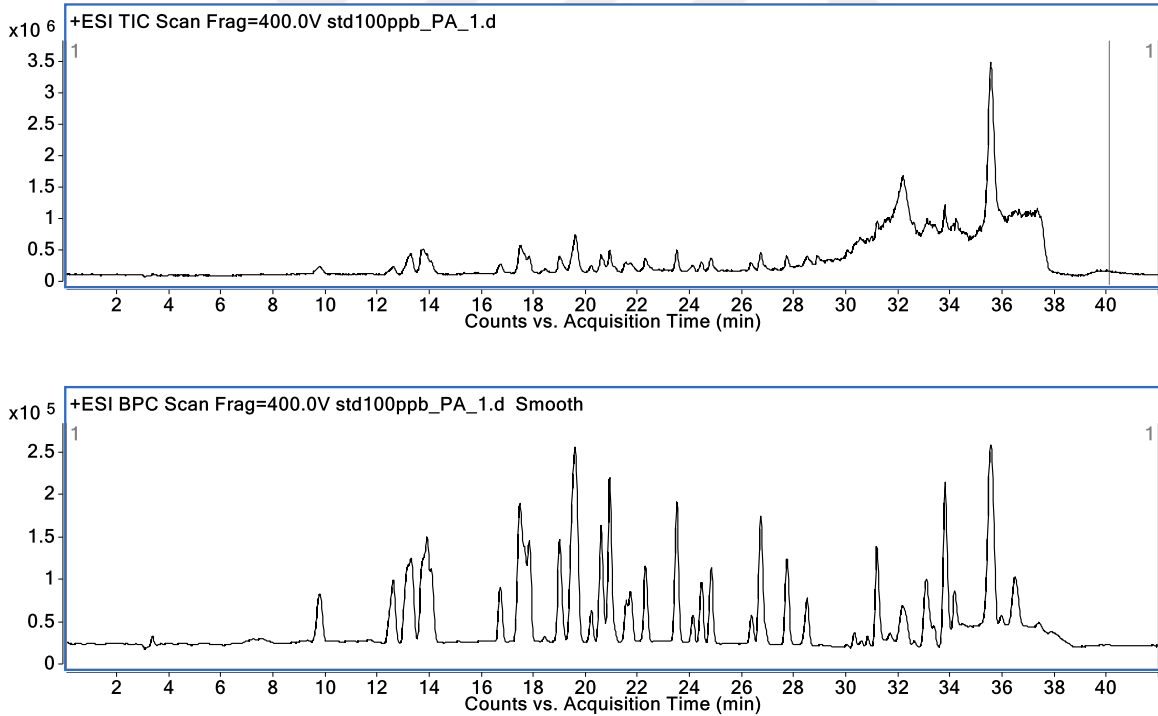
MRKS	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
MRN	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
MRS	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
MRH	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
MRL	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	15,23	n.d.
MRF	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	20,00	n.d.
MRO	7,13	50,24	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
MRD	n.d.	n.d.	n.d.	2,70	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
MRB	5,87	68,73	n.d.	4,49	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
TUSF	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	1,31	4879,40
SOI	334,98	9013,50	6,27	16,85	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
SOU	390,15	1212,65	1,75	9,16	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
HP	11,86	45,37	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

Çizelge 4.2. ve Çizelge 4.3'de gösterilen ve numunelerimizde aradığımız PA'lar ve N-oksitlerinin kodlamaları: Echimidine (Em), Echimidine-N-oksit (EmN), Erucifoline (Er), Erucifoline-N-oksit (ErN), Europine (Eu), Europine-N-oksit (EuN), Heliotrine (Hn), Heliotrine-N-oksit (HnN), İntermedine (Im), İntermedine-N-oksit (ImN), Jacobine (Jb), Jacobine-N-oksit (JbN), Lasiocarpine (Lc), Lasiocarpine-N-oksit(LcN), Lycopsamine (La), Lycopsamine-N-oksit (LaN), Monocrotaline (Mc), Monocrotaline-N-oksit(McN), Retrorsine (Re), Retrorsine-N-oksit (ReN), Senecionine (Sc), Senecionine-N-oksit (ScN), Seneciphylline (Sp), Seneciphylline-N-oksit (SpN), Senecivernine (Sv), Senecivernine-N-oksit (SvN), Senkirkine (Sk), Trichodesmine (Td).

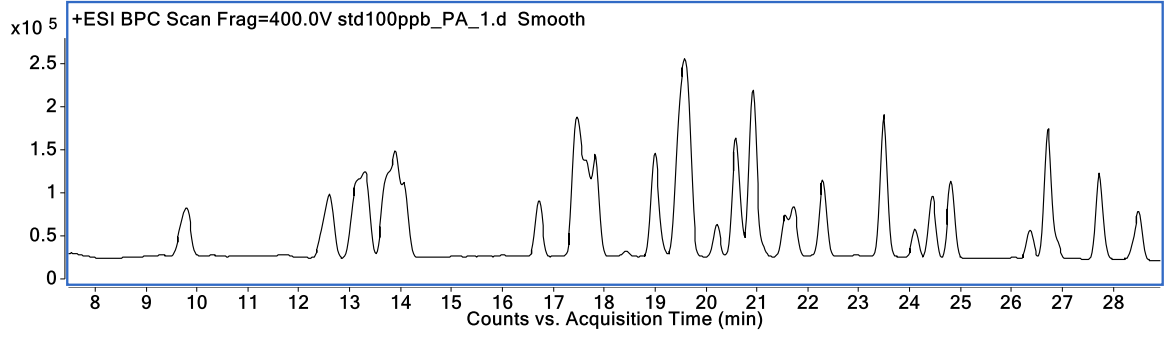
4.2. PA'ların ve N-oksitlerinin LC-MS QTOF Cihazından Elde Edilen Kromatogramlar

LC-MS QTOF cihazından elde edilen kromatogramlara göre Şekil 4.1.'de standart kromatogram eğrileri görülmektedir. Bu eğriler toplam iyon yükünü temsil etmektedir. Şekil 4.2.'de ise ekstrakte edilen numunelerin ekstraksiyon iyonlarına ait kromatogramları gösterilmektedir. Bu kromatogram piklerinde aynı renkte görülenler izomer olduklarını ifade etmektedir. Çalışma prensibimiz genel hatlarıyla, tespit etmek istediğimiz maddelerin LC'de uygun ayrımı yapıp, MS'te iyonlaşmaları ve parçalanmaları sağlandıktan sonra quadropol kısmında alıkonma sürelerinin eldesi ile beraber konfirmasyonları sağlanır. Ayrıca parçalanma ürünlerinin de elde ettiğimiz verilerle uyumlu çıkması beklenir.

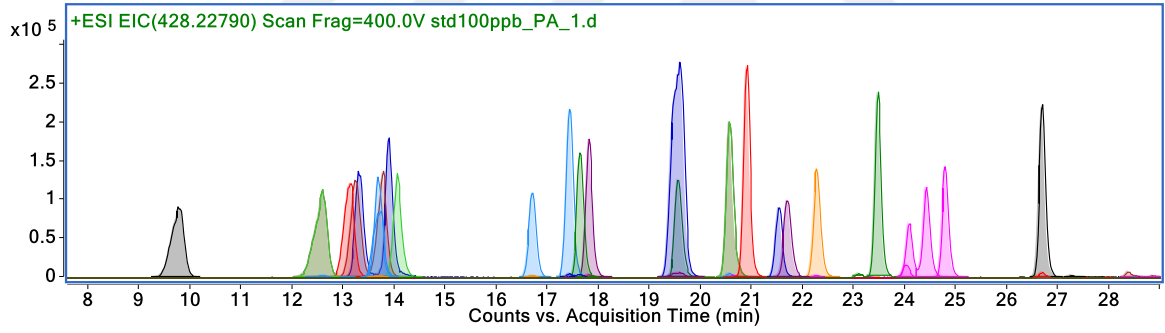
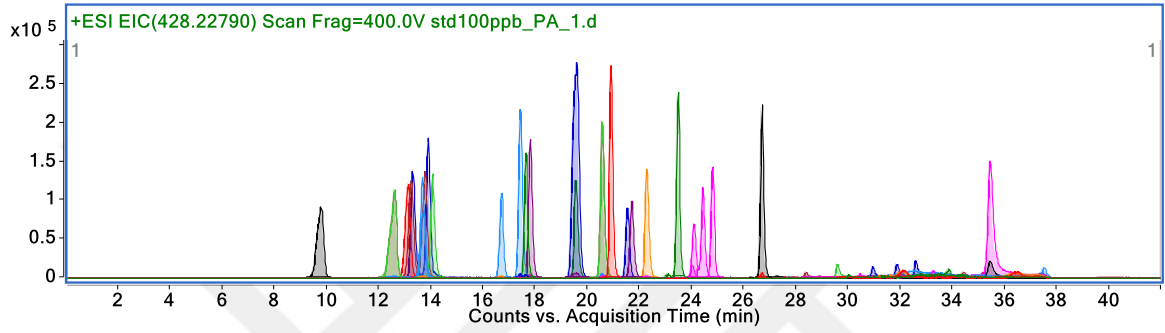
Miktar tayini matris eşleştirme standardı ile yapılmıştır. Methanol ve matris içerisinde hazırlanan standart ile çalışıldı. Şekil 4.3.'te Matris eşleştirmesi ve 1-2.5-5-10-25-50-100 ng/ml olmak üzere 7 farklı konstantrasyonda elde edilmiş kalibrasyon eğrileri verilmiştir.



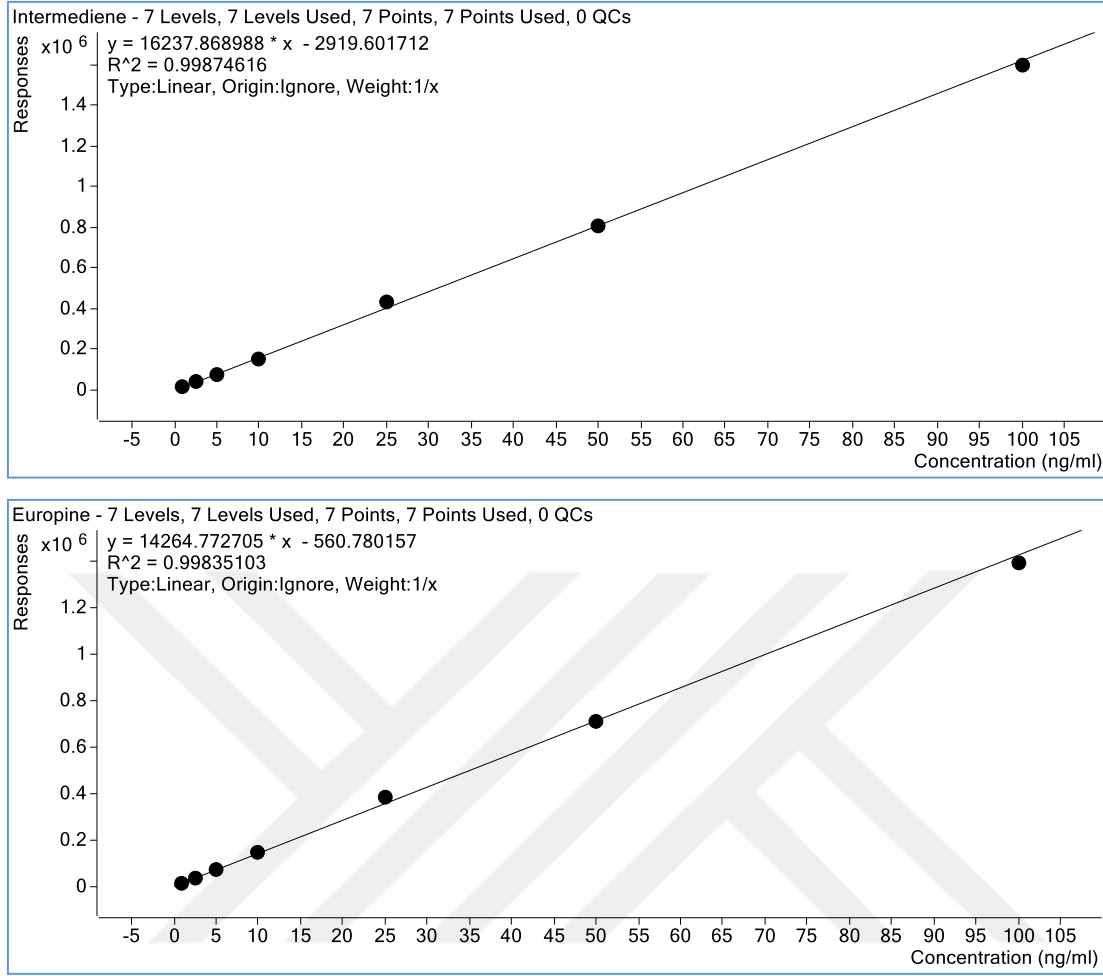
Şekil 4.1. LC-MC QTOF standart kromatogramı (EIC)



Şekil 4.1. LC-MC QTOF standart kromatogramı (EIC) (devam)

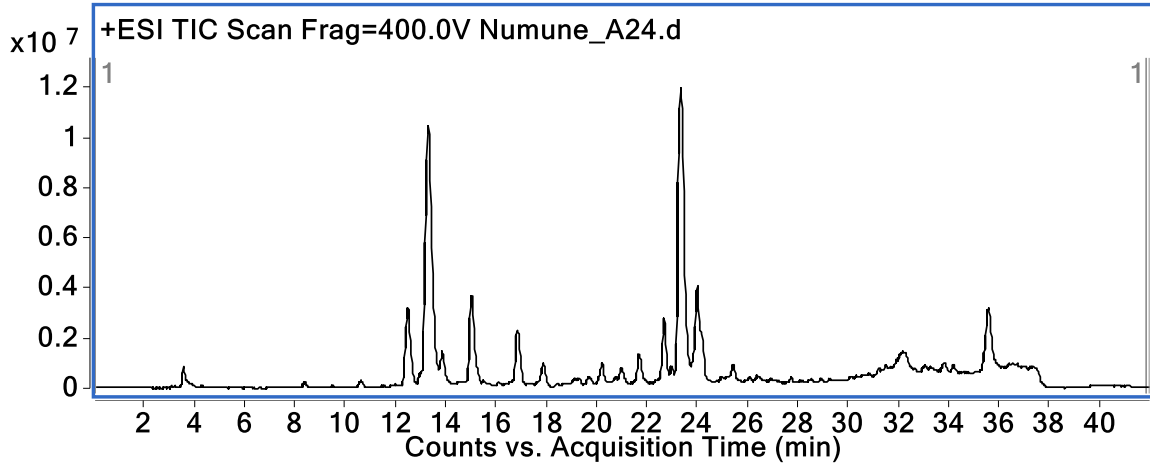


Şekil 4.2. LC-MC QTOF ekstraksiyonların standart kromatogramı

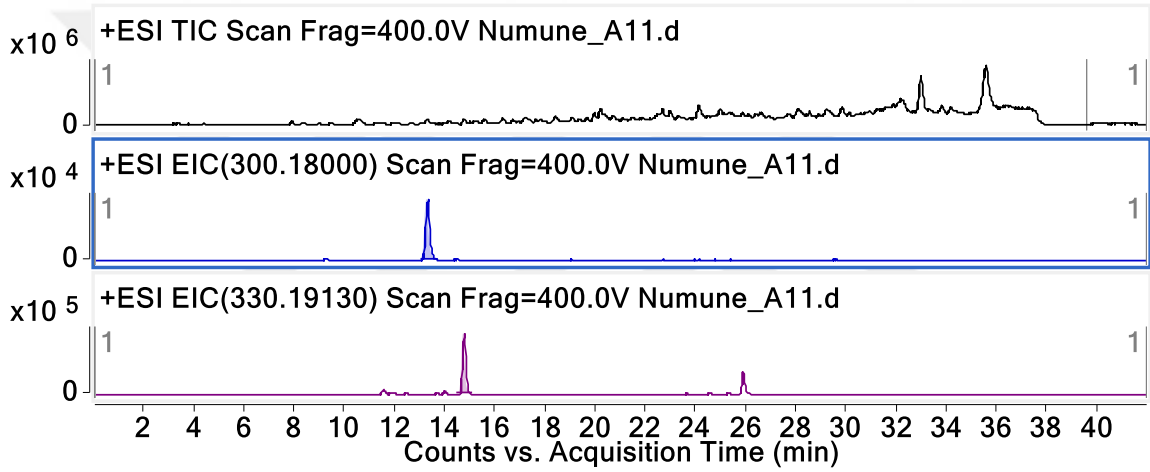


Şekil 4.3. Matris eşleştirme, 7 noktalı örnek kalibrasyon eğrisi

Kendi bünyesinde PA'ları üretebildiği bilinen *Symphytum officinale* (karakafes) otuna ait numune kromatogramı Şekil 4.4'te verilmiştir. Bu kromatogram bize PA'ların ve N-oksitlerinin spesifik edilmemiş içeriğindeki tüm iyonları gösteren halini temsil etmektedir. Şekil 4.5.'te ise ortada intermedine ve altta europine PA'larına ait kromatogramlar verilmiştir.

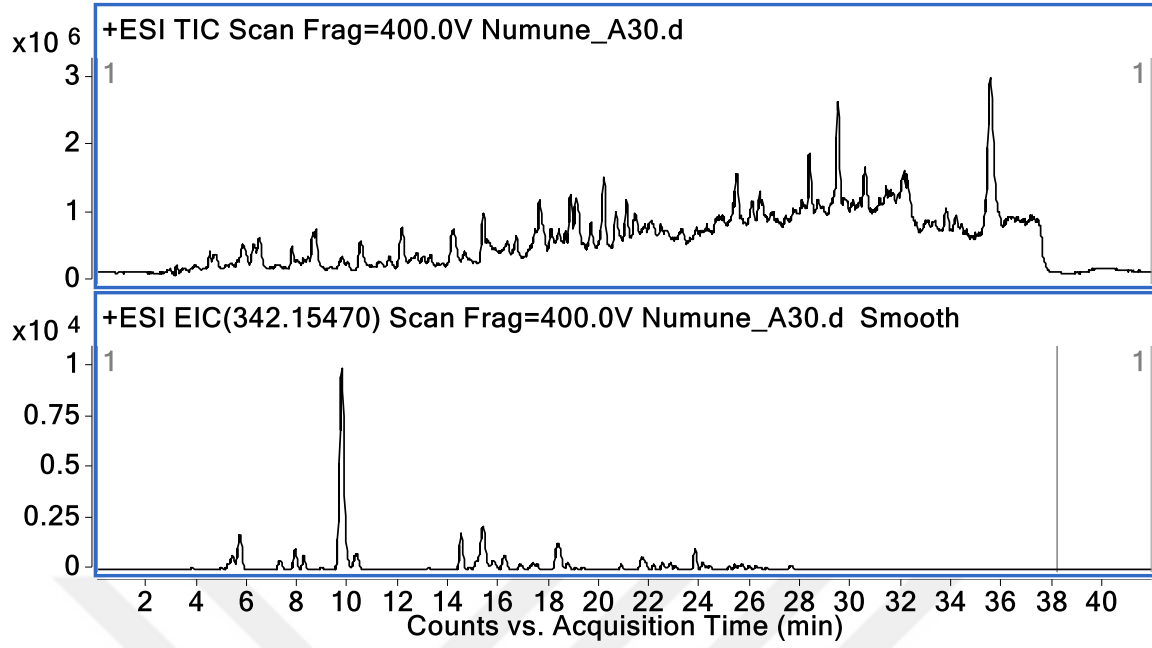


Şekil 4.4. Tipik numune kromatogramı (*Symphytum officinale*)

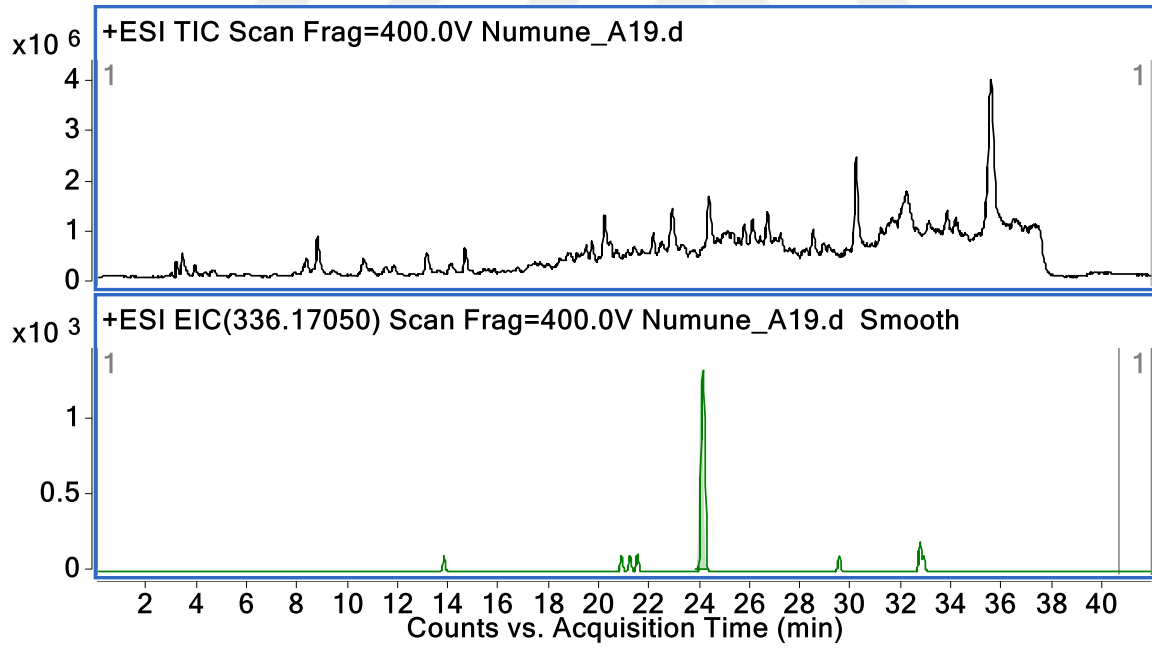


Şekil 4.5. Intermedine (orta) ve europine (alt) PA'larına ait kromatogramları

Şekil 4.6.'te CKBT kodlu tablet numunesine ait tipik kromatogramı (üstte) ve bu numunedeki monocrotaline N-oksit formunun kromatogramı (altta) gösterilmiştir. Şekil 4.7. de papatya çayı numunesinin standart kromatogramı (EIC) ve bu numunede tespit edilen senecionine PA'sının kromatogramı verilmiştir.



Şekil 4.6. CKBT kodlu tablet numunesi standart kromatogramı ve Monocrotaline N-oksit



Şekil 4.7. Papatya çayı numunesinde standart kromatogramı (EIC) ve senecionine

CKME (Yeşil Çay Kapsül) numunesinde tek tip (intermedine) olmak üzere toplamda 0,06 µg/g PA, CKBT (Yeşil Çay Kapsül) numunesinde iki tip olmak üzere toplamda 0,07 µg/g PA, CKHT (Yeşil Çay, Guarana ve diğ. Tablet) numunesinde tek tip olmak üzere toplamda 0,05 µg/g PA, CSUN (Yeşil Çay (Markasız)) numunesinde tek tip olmak üzere toplamda 0,04 µg/g PA, CSKB (Yeşil Çay) numunesinde tek tip olmak üzere toplamda 0,06 µg/g PA, FAFM (Form Çayı demlik poşet: Sınameki, ısırgan, papatya ve diğ.) numunesinde tek tip olmak üzere toplamda 0,22 µg/g PA, FACF (Form Çayı demlik poşet: Yeşil çay, acı çehre, kekik) numunesinde tek tip olmak üzere toplamda 0,03 µg/g PA, FPFC (Form Çayı demlik poşet: Sınameki, Kantaron ve diğ.) iki tip olmak üzere toplamda 0,11 µg/g PA, FUC (Zayıflama Çayı: Markasız: Yeşil çay ve diğ.) numunesinde tek tip olmak üzere toplamda 2,46 µg/g PA, FUK (Zayıflama Çayı Markasız: Yeşil çay, Kekik ve diğ.) numunesinde üç tip olmak üzere toplamda 0,84 µg/g PA, MRL (Papatya Çayı demlik poşet) numunesinde tek tip olmak üzere toplamda 0,02 µg/g PA, MRF (Papatya Çayı) numunesinde tek tip olmak üzere toplamda 0,02 µg/g PA, MRO (Papatya Çayı) numunesinde tek tip olmak üzere toplamda 0,06 µg/g PA, MRB (Papatya Çayı) numunesinde tek tip olmak üzere toplamda 0,06 µg/g PA, TUSF (Öksürük Otu) numunesinde iki tip olmak üzere toplamda 4,88 µg/g PA, SOI (Kara Kafes Otu) numunesinde iki tip olmak üzere toplamda 9,37 µg/g PA, SOU (Kara Kafes Otu Markasız) numunesinde iki tip olmak üzere toplamda 1,61 µg/g PA, HP (Sarı Kantaron) numunesinde tek tip olmak üzere toplamda 0,06 µg/g PA tespit edilmiştir.



5. TARTIŞMA

Çalışmamızda PA varlığı yeşil çay ve yeşil çay takviyeleri, form çayları olarak pazarlanan kilo kontrolünde yardımcı olduğu iddiası taşıyan karışık içeriklere sahip çaylarda ve papatya çayları, karışık bitki çayı gibi ürünlerin miktar tayinleri gerçekleştirilmiştir. Ayrıca aktarlardan temin edilen karakafes otu, öksürük otu gibi bu alkaloidleri içeren bitkiler yine bitkisel çay olarak aktardan satın alınmış ve ölçümleri gerçekleştirilmiştir.

PA'lar, farklı bitki türleri tarafından ikincil metabolitler olarak sentezlenen büyük bir doğal toksin grubudur. Çeşitli PA'nın besin zincirindeki varlıklarının bir sonucu olarak insanlar ve hayvanlar için oldukça toksik olduğu bilinmektedir. PA hakkında toksisiteyi hakkındaki çok sayıda farklı çalışma genel bilgiler kısmında sunulmuştur.

PA farklı mono veya dikarboksilik asitler (nesin asitler olarak tanımlanır) ile pirolizidin türevli kısımların (nesin bazları olarak tanımlanır) bir birleşimi olarak tanımlanabilir. Özellikle, pirolizidin halka sisteminin 1,2 pozisyonunda çift bağa sahip olan 1,2-doymamış PA metabolik aktivasyona uğrama ve proteinler ve DNA ile kolayca reaksiyona girebilen reaktif pirol türleri oluşturma potansiyelleri nedeniyle daha yüksek toksisiteye sahip olarak kabul edilirler.

Çoğu PA, hayvanlarda veya in vitro sistemlerde kapsamlı bir şekilde test edilmemiş olsa da test edilen PA ile ilgili bilgiler bu bileşiklerin hepatotoksisite, gelişimsel toksisite, genotoksisite ve karsinogenesite ile ilgili etkilerini ortaya koymaktadır. Toksisite kimyasal yapıya bağlıdır, türe özgüdür, cinsiyet, yaş ve mevcut metabolik duruma göre farklılık gösterir. Hem gelişmekte olan hem de gelişmiş ülkelerde şüpheli PA zehirlenmesi vakaları bildirilmiştir.

Mevcut verilere dayanarak, IARC lasiokarpin, monokrotalin ve ridellini insanlar için olası kanserojen olarak sınıflandırırken (kategori 2B), değerlendirilen diğer PA'lar mevcut sınırlı bilgi nedeniyle sınıflandırılmaz kategorisinde yer almaktadır (kategori 3) (IARC, 2002).

PA'lar birçok bitki tarafından sentezlenir ve insan ortamında her yerde bulunur. 6000 bitkide 660'tan fazla PA tanımlanmıştır. Bitkilerin PA içerikleri bitkinin bölümü, mevsim doğal biyolojik varyasyonlar ve türlere bağlı olarak farklılık göstermektedir. Bu türlerin diğer bitkilerle birlikte hasadı, gıda maddeleri, bitkisel ilaçlar, takviyeler ve içecekler gibi biyolojik ürünleri kontamine edebilirler. PA son zamanlarda yeşil, siyah ve bitki çayları, bal,

süt, marul, yeşil sebzeler ve ayrıca bitkisel tıbbi ürünler ve diyet takviyeleri dâhil olmak üzere giderek daha fazla gıda maddesinde tespit edilmektedir.

Çaylar, infüzyonlar ve takviyelerin üretimi için birçok ham bitkisel malzeme, pratik olmaması ya da türleri yetiştirmek için ticari talebin düşük olması nedeniyle hala doğadan sağlanmaktadır.

PA'ların insanlarda toksisitesi, bitkisel ilaçlar ve çaylar içeren PA'nın yutulması sonrası yayımlanan zehirlenme vaka raporlarında ve PA içeren yabani otlarla kontamine tahıl tüketimi ile ilişkili ölümleri de kapsayan salgın vakalarıyla belgelenmiştir. PA'nın kısa dönem toksisitesinde ana hedef organlar olarak karaciğer ve akciğerdir ve toksisite özellikle hepatik veno-tıkanıcı hastalığın (HVOD) başlangıcı ile ilişkilidir. İnsanda, günde 0.015 mg/kg vücut ağırlığına karşılık gelen toksik bir PA dozunun yutulması, akut veno-tıkanıcı hastalığa neden olur 70 kg'lık bir yetişkin için bu, günde 1 mg toplam PA'ya karşılık gelmektedir. Venöz tıkanıklık ve kısıtlı kan akışının bir sonucu olarak çevre dokuda nekroz, fibrozis, nodüler rejenerasyon, siroz ve ardından karaciğer yetmezliği meydana getirebilir. Dünya genelinde akut zehirlenme vakaları çok nadir olarak görülmektedir. Bu bileşiklerle ilgili PA gelişmiş ülkelerde, öncelikle uzun süreli, düşük doz maruziyetten kaynaklanan kronik hasarlar beklenebilir endişe kaynağıdır.

Ülkemizde Tarım ve Orman Bakanlığı'nın 16/08/2021 tarihinde güncellediği "Bitkiler listesi"nde, PA ürettiği bilinen *Borago officinalis* diğer adıyla Hodan olarak bilinen bitkinin toprak üstünde bulunan yaprak, çiçek, çiçek durumu, gövde ve dal gibi kısımlarının ayrı ayrı veya birlikte kullanılamayacağı belirtmiştir. Fakat tohumlarından elde edilen *Borago* yağının kullanılmasında bir sakınca görülmemektedir (T.C. Tarım ve Orman Bakanlığı, 2021b). 2011 yılında EFSA CONTAM Paneli, gıda ve yemlerde PA varlığıyla ilgili insan ve hayvan sağlığına yönelik riskleri değerlendirmiştir. 2016 yılında ise EFSA tarafından yeni verileri içeren bir maruziyet değerlendirmesi yayınlamış ve risk karakterizasyonunu güncellemiştir. Paneli, PA'ların karsinojen risklerini değerlendirmek için günde 237 µg/kg vücut ağırlığı olan yeni bir "Referans Noktası" oluşturmuş, özellikle çay ve bitkisel infüzyonların sık ve yüksek tüketicileri için PA maruz kalmayla ilgili olarak insan sağlığı için olası bir endişe olduğu sonucuna varmıştır. PA üreten bitkilere dayalı gıda takviyelerinin tüketiminin, akut toksisiteye neden olduğu bilinen doz aralığına çok yakın (yani 100 kattan daha düşük) maruz kalma seviyelerine yol açabileceğini kaydetmiştir. PA'ların toksik ve kanserojen potansiyelini belirlemek için tavsiye de yayınlamıştır (EFSA CONTAM, 2017b;

EFSA, 2016). T.C. Ticaret Bakanlığı'ndan alınan bir yazıya atıfla, 14 Aralık 2020 tarihinde yayınlanan, L 420 sayılı AB Resmi Gazetesi'nin 2020/2040/AB sayılı Komisyon Tüzüğü ile bazı gıdalarda maksimum PA limiti belirlenmiştir. Bu kapsamda 1881/2006/AT sayılı Tüzük'ün değiştirildiği bildirilmiştir. Söz konusu Tüzük kapsamında bitkisel infüzyonlar, çay, bitkisel içerikli ve polen bazlı gıda takviyeleri gibi ürünlere belirlenen limitler yer almaktadır. Tüzük kapsamında rooibos, anason (*Pimpinella anisum*), melisa, papatya, kekik, nane, limon mineçiçeği (kuru ürün) bitkisel infüzyonları ve bebekler/çocuklar için kullanılan yeşil çay (*Camellia sinensis*) ve yeşil çay aromalı çaylar (kuru ürün) hariç tutulduğunda, bitkisel infüzyonlar için maksimum PA seviyesi 200 µg/kg olarak belirlenmiştir. Bebek ve küçük çocuklar için kullanılan infüzyonlar dışarıda bırakıldığında yeşil çay ve aromalı çayı (kuru ürün) için maksimum limit 150 µg/kg'dır. Bebek ve küçük çocuklar için bu infüzyonların maksimum PA limiti kuru ürünler için 75 µg/kg ve sıvılar için 1 µg/kg olarak sınırlandırılmıştır. Polen bazlı takviye edici gıdalar haricinde bitki özlü takviye ediciler için maksimum limit 400 µg/kg iken polen, polen ürünleri ve polen bazlı takviye edici gıdalar için 500 µg/kg olarak belirlenmiştir. Kurutulmuş hodan, yaban mersini, mercanköşk ve kekik bitkileri haricinde diğer kuru otlar için maksimum PA seviyesi 400 µg/kg'dır. Hodan, yaban mersini, mercanköşk ve kekik (kurutulmuş) ve yalnızca bu kuru otlardan oluşan karışımlar için maksimum PA limiti 1000 µg/kg'dır. Kimyon tohumları (tohum baharatı) için belirlenen maksimum PA seviyesi ise 400 µg/kg olarak belirlenmiştir. Bu Tüzük AB üye devletlerinde kabul gördüğünden ve ülkemiz içinde bağlayıcı niteliktedir ve 1 Temmuz 2022 tarihinde yürürlüğe girecektir. 1 Temmuz 2022 tarihinden önce yasalara uygun olarak piyasaya sürülen ve Tüzük ekinde yer alan ürünler 31 Aralık 2023 tarihine kadar piyasada kalabileceği ifade edilmiştir (EC, 2020).

Etkili risk değerlendirmesi ve risk kontrolünün geleneksel amacı, insanlarda morbidite ve mortaliteyi önlemektir. Gerçek dünyadaki kanıtlardan bireysel veya toplam PA için tolere edilebilir insan eşik dozları belirlenmemiştir ve mevcut önerilen düzenleyici eşik değerleri yalnızca deneysel verilere dayanmaktadır. Deneysel çalışmalar, klinik çalışmalar ve epidemiyolojik veriler, çay tüketimini çeşitli kanser türleri, tip 2 diyabet ve kardiyovasküler hastalıklar için risk azaltma dahil olmak üzere faydalı sağlık etkilerine bağlamaktadır. Tüm tıbbi ürünler için pazara erişim için pozitif bir risk-fayda oranı zorunludur.

AB Komisyonu yönetmeliğinin taslak versiyonunda maksimum seviyeler olarak çaylarda papatya ve kekikte 400 µg/kg, yeşil çay için 150 µg/kg, bebekler ve küçük çocuklar için 75 µg/kg, sıvı olanlarda ise 1 µg/kg ürün limitlerini belirlemiştir. Gıda takviyelerinde

maksimum seviyeler 150 µg/kg olarak yer almıştır. Buna ek olarak, bazı AB ülkeleri bu arada daha katı ulusal düzenlemeler benimsemiştir. Örneğin Belçika salata sosu dahil hoda yağ içeren tüm ürünleri yasaklamıştır. Alman Sağlık Otoritesi ise 6 haftaya kadar 1 µg ve zaman sınırlaması olmadan 0.1µg sınır değerleri belirlemiştir. Bitkisel ürünlerde 3 yıllık bir geçiş dönemi boyunca günde maksimum 1,0 µg PA alımına yol açan bir bitkisel tıbbi ürün kontaminasyon seviyesi kabul edilebilir olarak öngörülmüştür. Bu süre zarfında, üreticilerinin, kontaminasyonu günde 0,35 µg PA'yı geçmeyen günlük alımla sonuçlanan bir seviyeye kadar düşürmek için önlem almaları gerektiği belirtilmektedir.

Çalışmamızda Alman Bfr protokolü temel alınarak 28 adet PA tanımlaması gerçekleştirilmiştir. LC-MS QTOF dayalı ölçümü yapılan PA'lar arasında, toksik ve karsinogen olduğu düşünülen siklik diesterli PA'ları senesifilin, retrorsine, senesiyonin ve/veya bunlara karşılık gelen N-oksitleri de bulunmaktadır. Çalışmamızda N-oksitler beklenildiği şekilde PA'lardan daha yüksek düzeylerde bulunmuştur.

Symphtum officinale' de temel olarak bulunan PA'lar intermedine, lycopsamine bunların N-oksitleri ve Asetil formlarıdır. *S.Officinale*' nin küçük genç yaprakları, yaşlı yapraklardan daha yüksek alkaloid içeriğine sahiptir ve kökler, diğer kısımlardan daha yüksek konsantrasyonlarda PA içerir (Avula ve diğerleri, 2015). Bulunan iki farklı numunenin analizi gerçekleştirilmiştir. Numunemize dışarıdan bakınca yaprak, çiçek ve köklerin bir karışımı görülmektedir. Avula ve arkadaşlarının çalışmasında intermedine sırasıyla kök kanallar ve yapraklarda 0,28-12,4, 8,2 ve 0,16-6 µg/g olarak saptanmıştır. İlk numunemizde intermedine ve N-oksiti sırasıyla 0,33 ve 9,01 µg/g ikinci numunemizde intermedine ve N-oksiti sırasıyla 0,39 ve 1,21 µg/g olarak saptanmıştır. Lycopsamine miktarları Avula ve diğerlerinin (2015) çalışmasında kök kanallar ve yapraklarda sırasıyla 0,8-15, 1±0,6 ve 0,18-3,4 µg/g bulunmuştur (Avula ve diğerleri, 2015). Çalışmamızda lycopsamine ve N-oksidi miktarları ise bu çalışmayla karşılaştırıldığında oldukça düşük sırasıyla 0,01-0,02 µg/g olarak ölçülmüştür. Her iki örneğimizin PA alkaloidleri toplamı sırasıyla 9,37 ve 1,613 µg/g olarak saptanmıştır (9371,6; 1613,71 µg/kg ürün). Taslak metinde yer alan diğer çaylarda bulunabilecek maksimum miktar olan 150 µg/g limitinin oldukça üstünde olduğu görülmektedir. Paketin üzerinde belirtildiği şekli ile bir tutam çayı 1 bardak sıcak suda hazırlandığı zaman bir tutam yaklaşık 2g olarak hesaplanabilir, günde üç kez alım yapılırsa dozun en yüksek ürünümüz için 56,23 µg'a çıkabileceği tahmin edilebilir. Akut zehirlenmede HVOD 'un görüldüğü 70kg'lık birey için hesaplanan 1000 µg dozun uzağında olmakla birlikte kronik olarak alınabilecek dozları çok üzerindedir. Ridker ve diğerleri

(1985) 6 ay boyunca günlük 0,7 mg/kg vücut ağırlığı dozda maruz kalan bir bireyde HVOD raporlamışlardır (Ridker ve diğerleri, 1985). Rasenack ve diğerleri (2003) yaptıkları çalışmada 0,014-0,017 µg/kg *S.officinale*'ye maruz kalan fetusün öldüğünü raporlamıştır. Çayın infüzyon şeklinde tüketilmesinin fetus için risk oluşturacağı öngörülmektedir (Rasenack ve diğerleri, 2003).

Senkirkine, *T. farfara* bitkileri tarafından üretilen başlıca PA'dır. Senecionine ve senecionine-N-oksit de tespit edilebilir seviyelerdedir fakat senkirkine kıyasla çok düşük miktarlarda saptanmıştır. Avula ve diğerleri (2015) tarafından yapılan çalışmada *T. farfara*'nın çiçek örneği analizi sonucu edilen edilen senkirkine konsantrasyonunun 2,8 µg/g olduğu bulunmuştur. Çalışmamızda ise senkirkin konsantrasyonu 4,88 µg/g olarak saptanmıştır (Avula ve diğerleri, 2015). Senesionin N-oksit düşük miktarlarda 1,31 ng/g olarak tespit edilmiştir. Schoff ve diğerleri (2013), *T. Farfara*'nın 10 yaprağının akut zehirlenmeye neden olduğunu raporlamıştır (Schroff ve diğerleri, 2013). Niceliği şüpheli olan Roulet ve diğerlerinin (1988) raporunda, 9 ay boyunca 0,6 mg/kg vücut ağırlığı *T.Farfara*'ya maruz kalan bir kadında HVOD vakası bildirmiştir (Roulet ve diğerleri, 1988). Numunemizin günde 3 kez 2g kullanılmasıyla maruz kalınacak miktar yaklaşık 30 µg olarak hesaplanabilir. Bu da akut zehirlenme vakasından oldukça uzak görülmektedir. Eyer (2018) *Tussilago*'nun akut toksisite riskinin olası olmadığını belirtmektedir (Avila ve diğerleri, 2020). 4880 µg/kg değeri Avrupa Birliği taslak metninde yer alan 150 µg/kg ürün ve Alman Federal Sağlık Bakanlığı tarafından belirtilen değerlerin ise üzerindedir. Alman otoritesi *T. Farfara* için farklı bir 10 µg/gün (6 hafta) değeri belirlemiştir. Ölçümlediğimiz ürün bu limite göre günde bir kez 2g altında kullanılmalıdır (Lambrecht, 2016).

PA içerdiği bilinen karakafes otu ve öksürük otu dışarıda bırakıldığında diğer örneklerimizin beyan edilen içeriklerinde PA üreten bitki tipi bulunmamaktadır. Tespit edilen PA'lar kontaminasyon nedeniyle bu bileşikleri içereceklerdir. Örneklerimizde tespit edilen PA'lar şu şekilde olmuştur. Tek bileşenli çay ürünlerinde daha az miktarlarda PA'ya rastlanırken karışım halindeki numunelerde ise daha yüksek miktarlarda PA'ya rastlanmıştır. Çalışmamızda daha az toksik olduğu genel kabul gören intermedine ve N-oksiti en fazla rastlanan PA olmuştur.

Mulder ve diğerleri (2015;2017) yeşil, siyah, nane, rooibos, papatya ve bir bitki karışımı olan bitki çaylarında PA dağılımı incelendiğinde, en sık görülenin senecionin tipi (senecionin, retrorsine, seneciphylline, senecivernine ve N-oksitleri) olarak saptamışlardır.

Likopsamin- ve heliotrin-tipleri daha az sıklıkta bulundu, intermedinin en yaygın olarak saptanmıştır, bunu likopsamin-N-oksit ve heliotrin-N-oksit izlemiştir. Mulder ve arkadaşları çalışmalarında bitkisel çayların %91'i ve gıda takviyelerinin %60'ı en az bir PA tespit etmişlerdir (Mulder 2015, Mulder 2017). Çalışmamızdaki numunelerimizin (34) PA üreten bitkiler haricinde % 44'ünde (15) en az bir PA'ya rastlanmıştır.

Çalışmamızda yeşil çay çerçevesinde kapsüller ve çaylar olmak üzere çeşitli örnekler incelenmiştir. Kapsül çeşitlerinden 3 yeşil çay kapsül ve 3 yeşil ve diğer içerikli kapsüller analiz edilmiştir. Yeşil çay ve diğer bileşenli örneklerin sadece birinde 48,11 ng intermedine N-oksit'e rastlanmıştır. 3 yeşil çay kapsülünün 2 tanesinde PA rastlanmıştır. Bu çalışmada test edilen monokrotalin, monokrotalin-N-oksit ve trikodesmin gibi diğer siklik diesterlerden monokrotalin N-oksit formuna bir yeşil çay kapsülünde oldukça düşük miktarda 33,62 ng/g olarak günde 3 kez alınması tavsiye edilen 650mg yeşil çay içeren kapsülde rastlanmıştır. Günde 3 kez tüketildiği takdirde kişi 55.47 ng=0,06 µg monokrotalin-N-oksit'e maruz kalacağı hesaplanabilir. Ayrıca bu örnekte 10,71 ng/g intermedine ve 29,82 ng/g N-oksiti tespit edilmiştir. Biri demlik poşet olmak üzere incelenen üç yeşil çay örneğinde demlik poşet örneğinde PA saptanamazken, açık yeşil çay örneklerinde intermedine ve N-oksidi tespit edilmiştir. Avrupa Birliği düzenlemesi taslak metindeki *C.Sinensis* için belirlenmesi düşünülen 150 µg/kg (ng/g) ürün düzenlemesi göz önüne alınırsa yeşil çay örneklerin bu düzeyin altında PA içerdikleri görülmektedir. Kapsüller incelendiği zaman CKME (Yeşil Çay Kapsül) numunesinde tek tip (intermedine) olmak üzere toplamda 0,06 µg/g PA, CKBT (Yeşil Çay Kapsül) numunesinde iki tip olmak üzere toplamda 0,07 µg/g PA, CKHT (Yeşil Çay, Guarana ve diğ. Tablet) numunesinde tek tip olmak üzere toplamda 0,05 µg/g PA'ya rastlanmıştır. Bu değerler bilinen en katı düzenleme olan Alman Federal düzenlemesinin limit değerlerinin altındadır.

Çalışmamızda form, detoks, zayıflama çayı gibi farklı adlandırmalı ve farklı içerikteki 11 numunenin de ölçümü yapılmıştır. Yine bu örneklerin yedi tanesi yeşil çay içermektedir. Bu örneklerin beş tanesinde PA'lara rastlanmıştır. Heliotrine ve N-oksidine sadece markasız bir karışık zayıflama çayı numunesinde rastlanmıştır. Bu örnekte ayrıca Europine ve Intermedine ölçülmüştür. Bu 11 örneğin 2 tanesinde europin ölçülmüştür. Bu örneklerden FUC (Zayıflama Çayı: Markasız: Yeşil çay ve diğ.) numunesinde tek tip olmak üzere toplamda 2,46 µg/g PA, FUK (Zayıflama Çayı Markasız: Yeşil çay, Kekik ve diğ.) numunesinde üç tip olmak üzere toplamda 0,84 µg/g PA'ya rastlanmıştır. Bu örneklerden ilki günlük 1g kullanılsa dahi Alman Federal düzenlemesinin şu anki düzenlemesinin

üzerinde PA içerirken ikincisi gelecek düzenlemenin üzerinde PA içermektedir. İlk örneğimiz günde üç kez 2g kullanıldığı takdirde yaklaşık 15 µg PA maruziyetine neden olacaktır. Ayrıca saptanan değerin, 150 µg/kg ürün taslak düzenlemesinin on kat üzerinde PA içerdiği görülmektedir.

Senecio (Compositae) cinsinin çok sayıda taksonu hepatotoksik, mutajenik, kanserojen ve antitümör aktiviteler sergileyen PA'lar açısından zengindir. Senecio türleri *Matricia recutita*'ya benzerliği nedeniyle toplama sırasında kontaminasyona neden olabilir. Çalışmamızda dört poşet ve dört paketli papatya çayının ayrıca kış çayı olarak satılan ve papatya içeren bir çayın incelemesi yapılmıştır. Dört demlik poşet çayın sadece birinde açık çayların ise tamamında oldukça düşük dozlarda PA'ya rastlanmıştır. Bu numunelerden 2 çay örneğinde 15,23 (demlik poşet) ve 20,00 ng/g (paketli çay) miktarlarında siklik diester yapıda senesioninin N-oksidine rastlanmıştır. Bir örnekte de 0,04 µg/g (4,49 ng/g) europine ve farklı bir örnekte 2,7 ng/g gibi çok düşük bir dozda lycopsamine N-oksit formu tespit edilmiştir. 2 çay örneğinde ise intermedine ve N-oksitine rastlanmıştır.

Alman Sağlık Otoritesi ise 6 haftaya kadar 1 µg ve zaman sınırlaması olmadan 0.1µg sınır değerleri ve geçiş dönemi sonrası günde 0,35 µg PA'yı geçmeyen günlük alım seviyeleri değerlendirildiğinde *S.officinale* örneklerinin ve bu değerlerin üzerinde alımlarla sonuçlanacağı görülmektedir. Bu bitkiler oral yolla tüketilmemelidir. *T.Farfara* PA içeren bitkiler arasında tedavi açısından önemli bileşikleri içerebilmektedir. Bu nedenle daha fazla sayıda toksikolojik çalışma yapılarak bu maddelerin toksisitelerinin ya da farmakolojik etkilerin daha iyi anlaşılmasına ihtiyaç vardır. PA alımı ile insan kanseri arasında nedensel bir ilişki gösterecek hiçbir epidemiyolojik veri mevcut değildir. Ancak kanıtın yokluğu, yokluğun kanıtı değildir. PA önemli kurumlar tarafından bir endişe kaynağı olarak görülmekte ve yasal tedbirler alınmaktadır. Potansiyel riski çerçevelemek için bu PA üzerinde daha uzun yıllar sürecek çalışmalar gerekmektedir.



6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Symphytum officinale' de temel olarak bulunan PA'lar Intermedine, Lycopsamine bunların N-oksitleri ve Asetil formlarıdır. İlk numunemizde Intermedine ve N-oksiti sırasıyla 0,33 ve 9,01 µg/g ikinci numunemizde Intermedine ve N-oksiti sırasıyla 0,39 ve 1,21 µg/g olarak saptanmıştır. Çalışmamızda lycopsamine ve N-oksidi miktarları ise sırasıyla 0,01- 0,02 µg/g ve olarak ölçülmüştür. *S.officinale* çaylarının oral yolla tüketilmemesi, hamilelerin özellikle tüketmemesi gerektiği vurgulanmalıdır.

T. farfara bitkileri tarafından üretilen başlıca PA olan senkirkine konsantrasyonu beklenildiği üzere 4,88 µg/g gibi yüksek bir dozda saptanmıştır. Diğer bir bulunması beklenen PA olan senesionin N-oksit oldukça düşük miktarda 1,31 ng/g olarak tespit edilmiştir. Akut toksisite riski mümkün görülmemekle birlikte mevcut örneğimiz göz önüne alındığında günlük 2g'ın altında ve 6 haftayı geçmeyecek şekilde tüketilmelidir.

Bu çalışmada test edilen ve IARC sınıflamasında 2B grubunda olan 3 PA türünden biri olan monokrotalinin sadece N-oksit formuna bir örnekte oldukça düşük miktarda 33,62 ng/g olarak günde 3 kez alınması tavsiye edilen 650 mg yeşil çay içeren kapsülde rastlanmıştır.

2 poşet papatya çay örneğinde 15,23 ve 20,00 ng/g miktarlarında siklik diester yapıda senesioninin N-oksidine rastlanmıştır. Bir örnekte de 0,04 µg/g europine ve farklı bir örnekte 2,7 ng/g gibi çok düşük bir dozda lycopsamine N-oksit formu tespit edilmiştir. Doğru *Matrisia Retuica* tüketimi ile ilgili ülkemizde uzun yıllardır bir farkındalık olmakla birlikte papatya çaylarının küçük miktarlarda kontamine olduğu görülmüştür.

Heliotrine ve N-oksidine sadece markasız bir karışık zayıflama çayı numunesinde rastlanmıştır. Bu örnekte ayrıca europine ve intermedine ölçülmüştür.

Çizelge 6.1. Analizi yapılan numunelerin PA tipindeki sayısı

Tane	Im	ImN	La	LaN	Eu	EuN	Hn	HnN	McN	ScN	Sk
Kapsül formu	2	3	-	-	-	-	-	-	1	-	-
Bitki çayları	12	12	2	3	2	1	1	1	3	3	1

Intermedine tipi PA numunelerimizden kapsül formunda olanların 2 çeşidinde, bitki çayı formunda ise 12 çeşitte tespit edilmiştir. Bunlardan zayıflama çayı olarak geçen yeşil çay içerikli markasız bitki çayı en yüksek intermedine (2,31 µg/g) miktarını göstermiştir. En yüksek miktarları 2 karakafes çayı (0,33 ve 0,39 µg/g) takip etmiştir. Intermedine N-oksit formu PA numunelerimizden kapsül formunda olanların 3'ünde, bitki çayların ise 12'sinde tespit edilmiştir. Ayrıca 9,01 µg/g seviyesi ile yaptığımız çalışmanın en yüksek miktarı karakafes otu çayında (SOI kodlu) intermedine N-oksit formunda ölçülmüştür. Bu yüksek miktar seviyelerini sırayla diğer karakafes otu çayı (SOU kodlu) ve markasız zayıflama çayı (FUK kodlu) numunelerimizde (sırasıyla 1,21 ve 0,51 µg/g) bulunmuştur. Lycopsamine tipi PA düşük miktarlarda yalnızca karakafes otu çaylarının 2'sinde tespit edilmiştir. Lycopsamine N-oksit formu ise 2 karakafes otu çayı (SOI ve SOU kodlu) ve 1 papatya çayı (MRD kodlu) olmak üzere düşük miktarlarda 3 numunemizde ölçülmüştür. Europine tipi PA 2 çeşit bitki çayı (FPFC ve FUK kodlu) numunelerinde düşük miktarlarda tespit edilmiştir. Europine-N-Oksit formu ise FUK kodlu markasız zayıflama çayı olan sadece 1 numuneden elde edilmiştir. Heliotrine tipi PA sadece 1 numunede (FUK kodlu) düşük miktarlarda tespit edilmiştir. Heliotrine-N-Oksit formu sadece 1 numunede (FUK kodlu) ölçülmüştür. Monocrotaline-N-Oksit formu PA yeşil çay kapsülü (CKBT kodlu) olan sadece 1 numunede tespit edilmiştir. Senecionine-N-Oksit formu PA toplamda 3 numunede tespit edilmiştir. Bunlar öksürük otu (TUSF kodlu) çayı ve 2 papatya (MRL ve MRF kodlu) çayıdır. Senkirkine tipi PA sadece TUSF kodlu öksürük otu çayında 4,88 µg/g olmak üzere yüksek miktarda ölçülmüştür.

Elimizdeki verilere bakıldığında bünyesinde en yüksek miktarda (9,01 µg/g) PA içeren numunemiz SOI kodlu karakafes otu çayı olmuştur. Bünyesinde en fazla farklı tipte PA içeren numune ise 6 farklı tipte PA'yı bulunduran FUK kodlu, içeriğinde yeşil çay ve kekik olan markasız zayıflama çayı olmuştur. 15 numunemizde ise herhangi bir PA tipine rastlanmamıştır.

Sonuçlar göz önüne alındığında dünyada bulunan ölçümlere benzer şekilde sonuçlar elde edilmiştir. Doğal ürünlerin güvenliliği konusunda farkındalığın arttırılmasına ihtiyaç duyulmaktadır. PA'ların genotoksik ve kanserojen etkileri dikkate alındığında, ilgili gıda gruplarında, özellikle bitki çayları ve PA içeriğini daha da asgariye indirmek için daha fazla çaba gösterilmesi gerekmektedir. Bu ekim, hasat ve temizleme (yabancı otların uzaklaştırılması) yöntemlerinin iyileştirilmesiyle başarılabılır. Tüm dünyada söz konusu sağlıklı halin iyileştirilmesi için kullanılan takviye edici gıdalar veya bitki çaylarının hazırlandığı hammaddelerinin iyi tarım uygulamalarından sağlanması kontaminasyonu azaltıcı bir unsur olarak görülmektedir. Mücadele Araştırma Enstitüsü Müdürlükleri, Tarım ve Orman İl Müdürlükleri, Gıda ve Kontrol Genel Müdürlükleri gibi kurumlar hasatın PA içeren bitkilerle kontaminasyonunu önlemesi konusunda çeşitli girişimlerde bulunmaktadır. Ülkemizde özellikle kekik hasatı gibi güvenli hasat için çeşitli çalışmalar yürütülmektedir (T.C. Tarım ve Orman Bakanlığı, 2021a). Takviye edici gıdaların üretimini gerçekleştiren firmalar da farkındalığın parçası olmalı ve güvenli hammadde temini için gerekenleri yapmalıdırlar. Bu firmaların hammadde temininde bulunduğu tedarikçilere PA'ların sağlık üzerine etkilerinden ve risk düzeyinden bahsedilip bilinçlendirilmelidir. Hedef bitkinin özenli toplanması işlemlerinde kullanılan alet ve makinaların kontaminasyona sebep olmayacak şekilde temizlenmesi önemlidir. Özellikle ihracat yapan firmaların farklı ülkelerin farklı kurallarına tabi olacaklarını göz önünde bulundurmaları gerekmektedir.

KAYNAKLAR

- Avila, C. , Breakspear, I., Hawrelak, J., Salmond, S., Evans, S. (2020). A systematic review and quality assessment of case reports of adverse events for borage (*Borago officinalis*), coltsfoot (*Tussilago farfara*) and comfrey (*Symphytum officinale*). *Fitoterapia*, 142, 104519.
- Avula, B., Sagi, S., Wang, Y.-H., Zweigenbaum, J., Wang, M., Khan, I. A. (2015). Characterization and screening of pyrrolizidine alkaloids and N-oxides from botanicals and dietary supplements using UHPLC-high resolution mass spectrometry. *Food Chemistry*, 178, 136–148.
- Bodi, D., Ronczka, S., Gottschalk, C., Behr, N., Skibba, A., Wagner, M., Lahrssen-Wiederholt, M., Preiss-Weigert, A., and These, A. (2014). Determination of pyrrolizidine alkaloids in tea, herbal drugs and honey, *Food Additives & Contaminants: Part A*, 31(11), 1886-1895.
- Boppré, M., Colegate, S. M., and Edgar, J. A. (2005). Pyrrolizidine alkaloids of *Echium vulgare* honey found in pure pollen. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(3), 594–600.
- Bras, G., Hill, K. R. (1956). Veno-occlusive disease of the liver essential pathology. *The Lancet*, 268(6935), 161–163.
- Brauchli, J., Ltithy, J., Zweifel, U., and Schlatter, C. (1982). Pyrrolizidine alkaloids from *Symphytum officinale* L. and their percutaneous absorption in rats. *Experientia*, 38(9), 1085–1087.
- Bruggeman, I. M., and van der Hoeven, J. C. M. (1985). Induction of SCEs by some pyrrolizidine alkaloids in V79 Chinese hamster cells co-cultured with chick embryo hepatocytes. *Mutation Research Letters*, 142(4), 209–212.
- Bull, M. B., and Laragh, J. H. (1968). Amiloride. A potassium-sparing natriuretic agent. *Circulation*, 37(1), 45-53.
- Bundesgesundheitsamt, (1992). Bekanntmachung über die Zulassung und Registrierung von Arzneimitteln vom 05. Juni 1992 Abwehr von Arzneimittelrisiken – Stufe II, hier: Arzneimittel, die Pyrrolizidin-Alkaloide mit einem 1,2-ungesättigtem Necin-Gerüst enthalten. Bundesanzeiger no. 111 of 17 June 1992. Infusionstherapie, 14,131–132.
- Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR). (2007). *Nulltoleranzen in lebens- und futtermitteln*. Positions papier des BfR, 12, 1-20.
- Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR). (2013). *Pyrrolizidine alkaloids in herbal teas and teas*. Positions papier des BfR, 18, 1-29.
- Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR). (2014). *Determination of pyrrolizidine alkaloids (PA) in plant material by SPE-LC-MS/MS Method Protocol*, BfR-PA-Tea-2.0/2014, 1-29.
- Bundesverband der Arzneimittel-Hersteller (BAH). (2016). *Code of Practice to prevent and reduce pyrrolizidine alkaloid contaminations of medicinal products of plant origin*.
- Candrian, U., Lüthy, J., Graf, U., and Schlatter, C. (1984). Mutagenic activity of the pyrrolizidine alkaloids seneciphylline and senkirkine in drosophila and their transfer into rat milk. *Food and Chemical Toxicology*, 22(3), 223–225.

- Carballo, M., Mudry, M. D., Larripa, I. B., Villamil, E., and D'Aquino, M. (1992). Genotoxic action of an aqueous extract of *Heliotropium curassavicum* var. *argentinum*. *Mutation Research/Genetic Toxicology*, 279(4), 245–253.
- Chan, P. C. (1993). NTP technical report on the toxicity studies of riddelliine (CAS no. 23246–96–0) administered by gavage to F344/N rats and B6C3F1 mice. *Toxicity Report Series*, 27: 1-D9.
- Chan, P. C., Haseman, J. K., Prejean, J.D., Nyska, A. (2003). Toxicity and carcinogenicity of riddelliine in rats and mice. *Toxicology Letters*, 144(3), 295–311.
- Chauvin, P., Dillon, J. C., Moren, A., Talbak, S., and Barakaev, S. (1993). Heliotrope poisoning in Tadjikistan. *The Lancet*, 341(8861), 1663.
- Cheeke, P. R. (1988). Toxicity and metabolism of pyrrolizidine alkaloids. *Journal of Animal Science*, 66(9), 2343–2350.
- Chen, L., Mulder, P. P. J., Louisse, J., Peijnenburg, A., Wesseling, S., and Rietjens, I.M. (2017). Risk assessment for pyrrolizidine alkaloids detected in (herbal) teas and plant food supplements. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 86, 292–302.
- Chen, T., Mei, N., and Fu, P. P. (2010). Genotoxicity of pyrrolizidine alkaloids. *Journal of Applied Toxicology*, 30, 183–196.
- Chen, Y., Li, L., Xiong, F., Xie, Y., Xiong, A., Wang, Z., and Yang, L. (2021). Rapid identification and determination of pyrrolizidine alkaloids in herbal and food samples via direct analysis in real-time mass spectrometry. *Food Chemistry*, 334, 127472.
- Chojkier, M. (2003). Hepatic sinusoidal-obstruction syndrome: toxicity of pyrrolizidine alkaloids. *Journal of Hepatology*, 39, 437–446.
- Culvenor, C. C. J., Edgar, J. A., Jago, M. V., Outteridge, A., Peterson, J. E., and Smith, L. W. (1976). Hepato- and pneumotoxicity of pyrrolizidine alkaloids and derivatives in relation to molecular structure. *Chemico-Biological Interactions*, 12(3-4), 299-324.
- Diaz, G. J., Almeida, L. X., and Gardner, D. R. (2014). Effects of dietary *Crotalaria pallida* seeds on the health and performance of laying hens and evaluation of residues in eggs. *Research in Veterinary Science*, 97(2), 297–303.
- Drocourt, L., Pascussi, J. M., Assenat, E., Fabre, J. M., Maurel, P., and Vilarem, M. J. (2001). Calcium channel modulators of the dihydropyridine family are human pregnane X receptor activators and inducers of CYP3A, CYP2B, and CYP2C in human hepatocytes. *Drug Metabolism and Disposition*, 29(10), 1325-1331.
- Dusemund, B., Nowak, N., Sommerfeld, C., Lindtner, O., Schäfer, B., and Lampen A. (2018). Risk assessment of pyrrolizidine alkaloids in food of plant and animal origin. *Food and Chemical Toxicology*, 115, 63–72.
- Edgar, J. A., and Smith, L. W. (2000). Transfer of pyrrolizidine alkaloids into eggs: food safety implications. *American Chemical Society*, 118–128.
- Edgar, J. A., Colegate, S. M., Boppré, M., and Molyneux, R. J. (2011). Pyrrolizidine alkaloids in food: a spectrum of potential health consequences. *Food Additives & Contaminants: Part A*, 28(3), 308–324.
- Edgar, J. A., Molyneux, R. J., and Colegate, S. M. (2015). Pyrrolizidine alkaloids: potential role in the etiology of cancers, pulmonary hypertension, congenital anomalies, and liver disease. *Chemical Research in Toxicology*, 28(1), 4–20.

- European Food Safety Authority (EFSA). (2005). Opinion of the scientific committee on a request from EFSA related to a harmonised approach for risk assessment of substances which are both genotoxic and carcinogenic. *The EFSA Journal*, 282, 1–31.
- European Food Safety Authority (EFSA). (2011). Scientific opinion on pyrrolizidine alkaloids in food and feed. *The EFSA Journal*, 9 (11), 1–134.
- European Food Safety Authority (EFSA). (2016). Dietary exposure assessment to pyrrolizidine alkaloids in the European population. *The EFSA Journal*, 14, 1–50.
- European Food Safety Authority (EFSA). (2017a). Update: Guidance on the use of the benchmark dose approach in risk assessment. *The EFSA Journal*, 15(1):4658, 41.
- European Food Safety Authority Panel on Contaminants in the Food Chain (EFSA CONTAM), Knutsen, H. K., Alexander, J., Barregard, L., Bignami, M., Brüschweiler, B., Ceccatelli, S., Cottrill, B., Dinovi, M., Edler, L., Grasl-Kraupp, B., Hogstrand, C., Hoogenboom, L. R., Nebbia, C. S., Oswald, I. P., Petersen, A., Rose, M., Roudot, A.-C., Schwerdtle, T., Vleminckx, C., Vollmer, G., Wallace, H., Gomez Ruiz, J. A., and Binaglia, M. (2017b). Statement on the risks for human health related to the presence of pyrrolizidine alkaloids in honey, tea, herbal infusions and food supplements. *The EFSA Journal*, 15(7):4908, 34.
- European Food Safety Authority Panel on Food Additives and Nutrient Sources added to Food (EFSA ANS), Younes, M., Aggett, P., Aguilar, F., Crebelli, R., Dusemund, B., Filipic, M., Frutos, M. J., Galtier, P., Gott, D., Gundert-Remy, U., Lambre, C., Leblanc, J. C., Lillegaard, I. T., Moldeus P., Mortensen, A., Oskarsson, A., Stankovic, I., Waalkens-Berendsen, I., Woutersen, R. A., Andrade, R. J., Fortes, C., Mosesso, P., Restani, P., Arcella, D., Pizzo, F., Smeraldi, C. and Wright, M. (2018). Scientific Opinion on the safety of green tea catechins. *The EFSA Journal*, 16(4):5239, 89.
- Food and Drug Administration (FDA). (2001) *FDA advises dietary supplement manufacturers to remove comfrey products from the market*. Center for Food Safety and Applied Nutrition; College Park, MD. FDA Office of Nutritional Products, Labeling, and Dietary Supplements.
- Fu, P. P., Chou, M. W., Xia, Q., Yang, Y.C., Yan, J., Doerge, D.R., and Chan, P. C. (2001). Genotoxic pyrrolizidine alkaloids and pyrrolizidine alkaloid N-oxides — Mechanisms leading to DNA adduct formation and tumorigenicity. *Journal of Environmental Science and Health, Part C*, 19(2), 353–385.
- Fu, P. P., Xia, Q., Lin, G., and Chou, M. W. (2004). Pyrrolizidine Alkaloids—genotoxicity, metabolism enzymes, metabolic activation, and mechanisms. *Drug Metabolism Reviews*, 36(1), 1–55.
- Gimmler-Luz, M. C., Erdtmann, B., and Balbuena, R. A. (1990). The effect of the pyrrolizidine alkaloid integerrimine on the chromosomes of mouse bone marrow cells. *Mutation Research/Genetic Toxicology*, 241(3), 297–304.
- Gomez-Arroyo, J. G., Farkas, L., Alhussaini, A. A., Farkas, D., Kraskauskas, D., Voelkel, N. F., and Bogaard, H. J. (2012). The monocrotaline model of pulmonary hypertension in perspective. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, 302, 363–369.

- Green, M. H. L., and Muriel, W. J. (1975). Use of repair-deficient strains of escherichia coli and liver microsomes to detect and characterise DNA damage caused by the pyrrolizidine alkaloids heliotrine and monocrotaline. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 28(3), 331–336.
- Griffin, C. T., Gosetto, F., Danaher, M., Sabatini, S., and Furey, A. (2014). Investigation of targeted pyrrolizidine alkaloids in traditional Chinese medicines and selected herbal teas sourced in Ireland using LC-ESI-MS/MS. *Food Additives & Contaminants: Part A*, 31(5), 940–961.
- Gura, T. (2001). SNP-ing drugs to size. *Science*, 293(5530), 595.
- Gyorik, S., and Stricker, H. (2009). Severe pulmonary hypertension possibly due to pyrrolizidine alkaloids in polyphytotherapy. *Swiss Medical Weekly*, 139(13–14), 210–211.
- Habs, M., Binder, K., Krauss, S., Müller, K., Ernst, B., Valentini, L., and Koller, M. (2017). A balanced risk–benefit analysis to determine human risks associated with pyrrolizidine alkaloids (PA)—the case of tea and herbal infusions. *Nutrients*, 9(7), 717.
- Hartmann, T., Ehmke, A., Eilert, U., von Borstel, K., and Thcuring, C. (1989). Sites of synthesis, translocation and accumulation of pyrrolizidine alkaloid N-oxides in *Senecio vulgaris* L. *Planta*, 177, 98–107.
- Heath, D., Shaba, J., Williams, A., Smith, P., and Kombe, A. (1975). A pulmonary hypertension-producing plant from Tanzania. *Thorax*, 30, 399–404.
- Hessel, S., Gottschalk, C., Schumann, D., These, A., Preiss-Weigert, A., and Lampen, A. (2014). Structure-activity relationship in the passage of different pyrrolizidine alkaloids through the gastrointestinal barrier: ABCB1 excretes heliotrine and echimidine. *Molecular Nutrition & Food Research*, 58, 995–1004.
- Hincks, J. R., Kim, H.-Y., Segall, H. J., Molyneux, R. J., Stermitz, F. R., and Coulombe, R. A. (1991). DNA cross-linking in mammalian cells by pyrrolizidine alkaloids: Structure-activity relationships. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 111(1), 90–98.
- Hirono, I., Mori, H., and Haga, M. (1978). Carcinogenic activity of *Symphytum officinale*. *Journal of the National Cancer Institute*, 61(3), 865–869.
- Hoogenboom, L. A. P., Mulder, P. P. J., Zeilmaker, M. J., van den Top, H. J., Rummelink, G. J., Brandon, E. F. A., Klijnstra, M., Meijer, G.A.L., Schothorst, R., ve Van Egmond, H. P. (2011). Carry-over of pyrrolizidine alkaloids from feed to milk in dairy cows. *Food Additives & Contaminants: Part A*, 28(3), 359–372.
- International Agency for Research in Cancer (IARC). (1976). *Some naturally occurring substances. In IARC Monograph on the Evaluation of Carcinogenic Risk of Chemicals to Man*, International Agency for Research in Cancer: Lyon, 10.
- International Agency for Research in Cancer (IARC). (2002). *Some traditional herbal medicines, some mycotoxins, naphthalene and styrene*. IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans, 82.
- International Programme on Chemical Safety (IPCS). (1989). *Pyrrolizidine alkaloids health and safety guide*. Health and Safety Guide No. 26. Geneva (Switzerland): WHO, 7–17.

- Jurgens, T. M., Whelan, A. M., Killian, L., Doucette, S., Kirk, S., and Foy, E. (2012). Green tea for weight loss and weight maintenance in overweight or obese adults. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, 12, CD008650.
- Kay, J. M., Harris, P., and Heath, D. (1967). Pulmonary hypertension produced in rats by ingestion of *Crotalaria spectabilis* seeds. *Thorax*, 22, 176-179.
- Kempf, M., Heil, S., Haßlauer, I., Schmidt, L., von der Ohe, K., Theuring, C., Reinhard, A., Schreier, P., and Beuerle, T. (2010). Pyrrolizidine alkaloids in pollen and pollen products. *Molecular Nutrition & Food Research*, 54(2), 292–300.
- Kopp, T., Abdel-Tawab, M., Mizaikoff, B. (2020). Extracting and analyzing pyrrolizidine alkaloids in medicinal plants: a review. *Toxins*, 12(5), 320.
- Lambrecht, K. (2016). *Pyrrolizidine alkaloids – Impact of the public statements made by EMA and national health authorities on the pharmaceutical industry*, Wissenschaftliche Prüfungsarbeit, Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät, Berlin, 1-57.
- Ma, C., Liu, Y., Zhu, L., Ji, H., Song, X., Guo, H., and Yi, T. (2018). Determination and regulation of hepatotoxic pyrrolizidine alkaloids in food: A critical review of recent research. *Food and Chemical Toxicology*, 119, 50–60.
- Martin, P. A., Thorburn, M. J., Hutchinson, S., Bras, G., and Miller, C. G. (1972). Preliminary findings of chromosomal studies on rats and humans with veno-occlusive disease. *British Journal of Experimental Pathology*, 53, 374-380.
- Mattocks A. R., and White N. H. (1973). Toxic effects and pyrrolic metabolites in the liver of young rats given the pyrrolizidine alkaloid retrorsine. *Chemico-Biological Interactions*, 6(5), 297–306.
- Mattocks, A. R. (1968). Toxicity of pyrrolizidine alkaloids. *Nature*, 217(5130), 723–728.
- Mattocks, A. R. (1980). Toxic pyrrolizidine alkaloids in comfrey. *The Lancet*, 316, 8204, 1136-1137.
- Mei, N., Guo, L., Fu, P. P., Heflich, R. H., and Chen, T. (2005). Mutagenicity of comfrey (*Symphytum Officinale*) in rat liver. *British Journal of Cancer*, 92(5), 873–875.
- Merz, K.-H., Schrenk, D. (2016). Interim relative potency factors for the toxicological risk assessment of pyrrolizidine alkaloids in food and herbal medicines. *Toxicology Letters*, 263, 44–57.
- Mohabbat, O., Shafiq Younos, M., Merzad, A. A., Srivastava, R. N., Ghaos Sediq, G., and Aram, G. N. (1976). An outbreak of hepatic veno-occlusive disease in north-western Afghanistan. *The Lancet*, 308(7980), 269–27.
- Molyneux, R. J., Gardner, D. L., Colegate, S. M., and Edgar, J. A. (2011). Pyrrolizidine alkaloid toxicity in livestock: a paradigm for human poisoning? *Food Additives & Contaminants: Part A*, 28(3), 293–307.
- Moreira, R., Pereira, D. M., Valentão, P., and Andrade, P. B. (2018). Pyrrolizidine Alkaloids: chemistry, pharmacology, toxicology and food safety. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(6), 1668.
- Mulder, P. P. J., de Witte, S. L., Stoop, G. M., van der Meulen, J., van Wikkelaar, P. G., Gruys, E., Groot, M. J., and Hoogenboom, R. L. A. P. (2016). Transfer of pyrrolizidine alkaloids from various herbs to eggs and meat in laying hens. *Food Additives & Contaminants: Part A*, 33(12), 1826–1839.

- Mulder, P. P. J., López, P., Castelari, M., Bodi, D., Ronczka, S., Preiss-Weigert, A., and These, A. (2017). Occurrence of pyrrolizidine alkaloids in animal- and plant-derived food: results of a survey across Europe. *Food Additives & Contaminants: Part A*, 35(1), 118–133.
- Mulder, P. P. J., López, Sánchez, P., These, A., Preiss-Weigert, A., and Castellari, M. (2015). *Occurrence of pyrrolizidine alkaloids in food*. European Food Safety Authority (EFSA) supporting publication 2015, 859, 116.
- Müller-Tegethoff, K., Kasper, P., and Müller, L. (1995). Evaluation studies on the in vitro rat hepatocyte micronucleus assay. *Mutation Research*, 335, 293–307.
- National Toxicology Program (NTP). (2003). *NTP technical report on the toxicology and carcinogenesis studies of riddelliine (CAS No. 23246-96-0) in F344/N rats and B6C3F1 mice (Gavage Studies)*. NTP Technical Report Series 508 (NIH Publication No. 03-4442).
- Nedelcheva, A., Nadezhda Kostova, N., and Sidjimov, A. (2015). Pyrrolizidine alkaloids in *Tussilago farfara* from Bulgaria, *Biotechnology and Biotechnological Equipment*, 29, 1–7.
- Newberne, P. M., and Rogers, A. E. (1973). Animal model: aflatoxin carcinogenesis in the rat. *The American Journal of Pathology*, 72(1), 137–140.
- Oketch-Rabah, H. A., Roe, A. L., Rider, C. V., Bonkovsky, H. L., Giancaspro, G. I., Navarro, V., Paine, M. F., Betz, J. M., Marles, R. J., Casper, S., Gurley, B., Jordan, S. A., He, K., Kapoor, M. P., Rao, T. P., Sherker, A. H., Fontana, R. J., Rossi, S., Vuppalanchi, R., Seeff, L. B., Stolz, A., Ahmad, J., Koh, C., Serrano, J., Dog, T. L., and Ko, R. (2020). United States Pharmacopeia (USP) comprehensive review of the hepatotoxicity of green tea extracts. *Toxicology Reports*, 7, 386–402.
- Ord, M. J., Herbert, A., and Mattocks, A. R. (1985). The ability of bifunctional and monofunctional pyrrole compounds to induced sister-chromatid exchange (SCE) in human lymphocytes and mutations in *Salmonella typhimurium*. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 149(3), 485–493.
- Pavlica, D., and Samuel, I. (1970). Primary carcinoma of the liver in Ethiopia. A study of 38 cases proved at post-mortem examination. *British Journal of Cancer*, 24, 22–29.
- Pereira, T. N., Webb, R. I., Reilly, P. E. B., Seawright, A. A., and Prakash, A. S. (1998). Dehydromonocrotaline generates sequence-selective N-7 guanine alkylation and heat and alkali stable multiple fragment DNA crosslinks. *Nucleic Acids Research*, 26(23), 5441–5447.
- Petry, T. W., and Sipes, I. G. (1987). Modulation of monocrotaline-induced hepatic genotoxicity in rats. *Carcinogenesis*, 8(3), 415–419.
- Petry, T. W., Bowden, G. T., Buhler, D. R., and Sipes, K. G. (1986). Genotoxicity of the pyrrolizidine alkaloid jacobine in rats. *Toxicology Letters*, 32(3), 275–281.
- Prakash, A. S., Pereira, T. N., Reilly, P. E. B., and Seawright, A. A. (1999). Pyrrolizidine alkaloids in human diet. *Mutation Research*, 443, 53–67.
- Rasenack, R., Müller, C., Kleinschmidt, M., Rasenack, J., and Wiedenfeld, H. (2003). Venooclusive disease in a fetus caused by pyrrolizidine alkaloids of food origin. *Fetal Diagnosis and Therapy*, 18, 223–225.

- Ribeiro, L. R., Silva, A. R., Bautista, A. R. P. L., Costa, S. L., Sales, L. A., Rios, A. C. C., and Salvadori, D. M. F. (1993). Clastogenic effect of extracts obtained from *Crotalaria retusa* L. and *Crotalaria mucronata* Desv. on mouse bone marrow cells. *Mutation Research/Genetic Toxicology*, 300(3-4), 253–258.
- Ridker, P. M., Ohkuma, S., McDermott, W. V., Trey, C., Huxtable, R. J. (1985). Hepatic venoocclusive disease associated with the consumption of pyrrolizidine-containing dietary supplements. *Gastroenterology*, 88 (4), 1050-1054.
- Rieben, W. K., and Coulombe, R. A. (2004). DNA cross-linking by dehydromonocrotaline lacks apparent base sequence preference. *Toxicological Sciences*, 82, 497–503.
- Roulet, M., Laurini, R., Rivier, L., Calame, A. (1988). Hepatic veno-occlusive disease in newborn infant of a woman drinking herbal tea. *The Journal of Pediatrics*, 112(3), 433-436.
- Rubiolo, P., Pieters, L., Calomme, M., Bicchi, C., Vlietinck, A., and Vanden Berghe, D. (1992). Mutagenicity of pyrrolizidine alkaloids in the *Salmonella typhimurium*/mammalian microsome system. *Mutation Research Letters*, 281(2), 143–147.
- Sanderson, B. J. S., and Clark, A. M. (1993). Micronuclei in adult and foetal mice exposed in vivo to heliotrine, urethane, monocrotaline and benzidine. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 285(1), 27–33.
- Santos-Mello, R., Deimling, L. I., Lauer Júnior, C. M., and Almeida, A. (2002). Induction of micronuclei by alkaloids extracted from *Senecio brasiliensis* and stored for 23 years. *Mutation Research*, 516, 23–28.
- Schoental, R. (1968). Toxicology and carcinogenic action of pyrrolizidine alkaloids. *Cancer Research*, 28, 2237–2246.
- Schrenk, D., Gao, L., Lin, G., Mahony, C., Mulder, P.P.J., Peijnenburg, A., Pfuhler, S., Rietjens, I.M.C.M., Rutz, L., Steinhoff, B., and These, A. (2020). Pyrrolizidine alkaloids in food and phytomedicine: occurrence, exposure, toxicity, mechanisms, and risk assessment - A review. *Food and Chemical Toxicology*, 136, 111107.
- Schroff, F., Felgenhauer, N., Pfab, R., Stenzel, J., Eyer, F. (2013) *Acute liver failure after accidental intake of pyrrolizidine-containing plants*. (264- p)
- Schulz, M., Meins, J., Diemert, S., Zagermann-Muncke, P., Goebel, R., Schrenk, D., Schubert-Zsilavecz, M., and Abdel-Tawab, M. (2015). Detection of pyrrolizidine alkaloids in German licensed herbal medicinal teas. *Phytomedicine*, 22(6), 648–656.
- Schuster, S., Gross, R., Mayer, B., and Huebener, R. P. (1993). Thermal-noise-induced resistance and supercurrent correlation function in in YBa₂Cu₃O₇ z grain-boundary Josephson junctions. *Physical Review B*, 48(21), 16172–16175.
- Seibold-Weiger, K., Vochem, M., Mackensen-Haen, S., and Speer, C. (1997). Fatal hepatic veno-occlusive disease in a newborn infant. *American Journal of Perinatology*, 14(02), 107–111.
- Silva-Neto, J. P., Barreto, R. A., Pitanga, B. P., Souza, C. S., Silva, V. D., Silva, A. R., Velozo, E. S., Cunha, S. D., Batatinha, M. J., Tardy, M., Ribeiro, C. S., Costa, M. F., El-Bacha, R. S., and Costa, S. L. (2010). Genotoxicity and morphological changes induced by the alkaloid monocrotaline, extracted from *Crotalaria retusa*, in a model of glial cells. *Toxicon*, 55: 105–117.

- Song, Z., He, Y., Ma, J., Fu, P. P., and Lin, G. (2020). Pulmonary toxicity is a common phenomenon of toxic pyrrolizidine alkaloids. *Journal of Environmental Science and Health, Part C*, 1–17.
- Steinhof, B. (2019). Pyrrolizidine alkaloid contamination in herbal medicinal products: Limits and occurrence. *Food and Chemical Toxicology*, 130, 262–266.
- Stenmark, K. R., Meyrick, B., Galie, N., Mooi, W. J., and McMurtry, I. F. (2009). Animal models of pulmonary arterial hypertension: the hope for etiological discovery and pharmacological cure. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, 297, 1013–1032.
- T.C. Tarım ve Orman Bakanlığı. (2020). *Zehirli ve zararlı oldukları için gıda amaçlı kullanımlarda yasaklanması gereken bitkiler*. 167673, 956.
- T.C. Tarım ve Orman Bakanlığı. (2021a). *Kekikte (origanum spp.) pyrrolizidine alkaloid kontaminasyonunun önlenmesi ve azaltılması uygulama kılavuzu*. 2111.
- T.C. Tarım ve Orman Bakanlığı. (2021b). *Bitki listesi*. 957.
- Takanashi, H., Umeda, M., and Hirono, I. (1980). Chromosomal aberrations and mutation in cultured mammalian cells induced by pyrrolizidine alkaloids. *Mutation Research/Genetic Toxicology*, 78(1), 67–77.
- Tamariz, J., Burgueño-Tapia, E., Vázquez, M. A., and Delgado, F. (2018). Pyrrolizidine alkaloids. *The Alkaloids*, 80, 1099-4831.
- Tandon, B. N., Tandon, H. D., Tandon, R. K., Narndranathan, M., and Joshi, Y. K. (1976). An epidemic of veno-occlusive disease of liver in central India. *The Lancet*, 308(7980), 271–272.
- The Committee on Herbal Medicinal Products (HMPC). (2014). *Public statement on the use of herbal medicinal products containing toxic, unsaturated pyrrolizidine alkaloids (PAs)*. Final.
- The Committee on Herbal Medicinal Products (HMPC). (2016). *Public statement on contamination of herbal medicinal products/traditional herbal medicinal products with pyrrolizidine alkaloids – transitional recommendations for risk management and quality control* (EMA/HMPC/328782/ 2016).
- The Committee on Herbal Medicinal Products (HMPC). (2019). *HMPC meeting report on European Union herbal monographs, guidelines and other activities*. In: The 86th HMPC Meeting, Held on 14-16 January 2019 (EMA/HMPC/26549/2019).
- The Committee on Herbal Medicinal Products (HMPC). (2020). *Public statement on the use of herbal medicinal products containing toxic, unsaturated pyrrolizidine alkaloids (PAs) including recommendations regarding contamination of herbal medicinal products with pyrrolizidine alkaloids* (EMA/HMPC/893108/2011 Rev. 1).
- The European Commission (EC). (2020). Commission regulation (EU) 2020/2040 of 11 December 2020 amending Regulation (EC) no 1881/2006 as regards maximum levels of pyrrolizidine alkaloids in certain foodstuffs. *Official Journal of the European Union*, L420.
- Trifan, A., Opitz, S. E. W., Josuran, R., Grubelnik, A., Esslinger, N., Peter, S., Bräm, S., Meier, N., and Wolfram, E. (2018). Is comfrey root more than toxic pyrrolizidine alkaloids? Salvianolic acids among antioxidant polyphenols in comfrey (*Symphytum officinale* L.) roots. *Food and Chemical Toxicology*, 112:178-187.

- Uhl, M., Helma, C., and Knasmüller, S. (2000). Evaluation of the single cell gelelectrophoresis assay with human hepatoma (Hep G2) cells. *Mutation Research*, 468: 213–225.
- Van Egmond, M., Vermeulen, R., Peeters-Scholte, C. M. P. C., Augoustides-Savvopoulou, P., Abbink, F., Boelens, J., and van der Knaap, M. (2011). Familial hemophagocytic lymphohistiocytosis in a pediatric patient diagnosed by brain magnetic resonance imaging. *Neuropediatrics*, 42(05), 191–193.
- Wehner, F. C., Thiel, P. G., and Van Rensburg, S. J. (1979). Mutagenicity of alkaloids in the Salmonella/microsome system. *Mutation Research/Genetic Toxicology*, 66(2), 187–190.
- Weidner, M. F., Sigurdsson, S. T., and Hopkins, P. B. (1990). Sequence preferences of DNA interstrand cross-linking agents: dG-to-dG cross-linking at 5'-CG by structurally simplified analogs of mitomycin C. *Biochemistry*, 29(39), 9225–9233.
- White, R. D., Krumperman, P. H., Cheeke, P. R., Deinzer, M. L., and Buhler, D. R. (1984). Mutagenic responses of Tansy Ragwort (*Senecio Jacobaea*) plant, pyrrolizidine alkaloids and metabolites in goat milk with the salmonella/mammalian-microsome mutagenicity test. *Journal of Animal Science*, 58(5), 1245–1254.
- Wiedenfeld, H. (2011a). Toxicity of pyrrolizidine alkaloids – a serious health problem. *Marmara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 1(2), 79-87.
- Wiedenfeld, H. (2011b). Plants containing pyrrolizidine alkaloids: toxicity and problems. *Food Additives and Contaminants: Part A*, 28(3), 282-292.
- Williams, A. O., Edington, G. M., and Obakponovwe, P. C. (1967). Hepatocellular carcinoma in infancy and childhood in Ibadan, Western Nigeria. *British Journal of Cancer*, 21, 474–482.
- Willmot, F., and Robertson, G. (1920). Senecio disease, or cirrhosis of the liver due to Senecio poisoning. *The Lancet*, 196(5069), 848–849.
- Xia, Q., Chou, M. W., Kadlubar, F. F., Chan, P.-C., and Fu, P. P. (2003). Human liver microsomal metabolism and dna adduct formation of the tumorigenic pyrrolizidine alkaloid, riddelliine. *Chemical Research in Toxicology*, 16(1), 66–73.
- Yang, M., Ruan, J., Fu, P. P., and Lin, G. (2016). Cytotoxicity of pyrrolizidine alkaloid in human hepatic parenchymal and sinusoidal endothelial cells: firm evidence for the reactive metabolites mediated pyrrolizidine alkaloid-induced hepatotoxicity. *Chemico-Biological Interactions*, 243, 119-126.
- Yang, M., Ruan, J., Gao, H., Li, N., Ma, J., Xue, J., Ye, Y., Fu, P. P., Wang, J., and Lin, G. (2017). First evidence of pyrrolizidine alkaloid N-oxide-induced hepatic sinusoidal obstruction syndrome in humans. *Organ Toxicity And Mechanism*, 91(12), 3913-3925.
- Yee, S. B., Kinser, S., Hill, D. A., Barton, C. C., Hotchkiss, J. A., Harkema, J. R., Ganey, P. E., and Roth, R. A. (2000). Synergistic hepatotoxicity from coexposure to bacterial endotoxin and the pyrrolizidine alkaloid monocrotaline. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 166, 173–185.



GAZİLİ OLMAK AYRICALIKTIR..

