

T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
FARMAKOĞNOZİ ANABİLİM DALI
FİTOTERAPİ PROGRAMI

***Trifolium longidentatum* Nábělek BİTKİSİNİN
İZOFLAVONOİTLERİ YÖNÜNDEN DEĞERLENDİRİLMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Ecz. Özlem ILGINER

Tez Yöneticisi
Prof. Dr. Nurgün KÜÇÜKBOYACI

ANKARA
Haziran 2012

T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
FARMAKOĞNOZİ ANABİLİM DALI
FİTOTERAPİ PROGRAMI

***Trifolium longidentatum* Nábělek BİTKİSİNİN
İZOFLAVONOİTLERİ YÖNÜNDEN DEĞERLENDİRİLMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Ecz. Özlem ILGINER

Tez Yöneticisi
Prof. Dr. Nurgün KÜÇÜKBOYACI

ANKARA
Haziran 2012

**T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
Sağlık Bilimleri Enstitüsü**

**Farmakognozi Ana Bilim Dalı Yüksek Lisans Programı
çerçevesinde yürütölmüş olan bu çalışma aşağıdaki jüri tarafından
Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.**

Tez Savunma Tarihi : 03/07/2012

**Prof. Dr. Turhan BAYKAL
Gazi Üniversitesi
Jüri Başkanı**

**Doç. Dr. Betül SEVER YILMAZ
Ankara Üniversitesi**

**Prof. Dr. Nurgün KÜÇÜKBOYACI
Gazi Üniversitesi**

İÇİNDEKİLER		
Kabul ve Onay		I
İçindekiler		II
Resimler ve Şekiller		VI
Tablolar		VIII
1. GİRİŞ ve AMAÇ		1
2. GENEL BİLGİLER		4
2.1	BOTANİK KISIM	5
2.1.1.	Leguminosae Familyası	5
2.1.2.	<i>Trifolium</i> L. Cinsi	8
2.1.3.	<i>Trifolium longidentatum</i> Nábělek	9
2.2	KİMYASAL KISIM	11
2.2.1.	<i>Trifolium</i> Türlerinin Kimyasal Bileşimi Üzerine Yapılan Çalışmalar	11
2.2.1.1.	İzoflavonoitler	12
2.2.1.2.	İzoflavonoitlerin Kimyasal Yapıları	19
2.3.	<i>Trifolium</i> Türlerinin Biyolojik Aktiviteleri	22
2.3.1.	<i>In vitro</i> çalışmalar	22

2.3.1.1.	Östrojenik etki	22
2.3.1.2.	Kemoprotektif etki	24
2.3.1.3.	Kardiyovasküler sistem üzerine etki	26
2.3.1.4.	Anti-inflamatuvar etki	26
2.3.1.5.	Antioksidan etki	26
2.3.1.6.	Prostat hiperplazisi ve prostat kanseri üzerine etki	29
2.3.1.7.	Parkinson Hastalığı Üzerine Etkileri	30
2.3.1.8.	Enzim Aktiviteleri	31
2.3.2.	<i>In vivo</i> çalışmalar	32
2.3.2.1.	Östrojenik etki	32
2.3.2.2.	Kemoprotektif etki	33
2.3.2.3.	Kardiyovasküler sistem üzerine etki	33
2.3.2.4.	Anti-inflamatuvar etki	34
2.3.2.5.	Antioksidan etki	34
2.3.2.6.	Kemik mineral yoğunluğu üzerine etki	35
2.3.2.7.	Prostat hiperplazisi ve prostat kanseri üzerine etki	36
2.3.2.8.	Antidiyabetik aktivite	36
2.3.2.9.	Karaciğer hasarı üzerine etkileri	37
2.3.2.10.	Dermatolojik Etkileri	37

2.3.2.11.	Bağıışıklık Sistemi Üzerine Etkileri	38
2.3.3.	Klinik çalışmalar	38
2.3.3.1.	Menopoz semptomları üzerine etki	38
2.3.3.2.	Kemoprotektif etki	40
2.3.3.3.	Kardiyovasküler sistem üzerine etki	42
2.3.3.4.	Kemik mineral yoğunluğu üzerine etki	45
2.3.3.5.	Prostat hiperplazisi ve prostat kanseri üzerine etki	47
2.3.3.6.	Dermatolojik Etkileri	50
2.3.4.	Biyotransformasyon	51
2.3.5.	Preparatları	52
2.3.6.	Standardizasyon	54
2.3.7.	Kullanım dozu	55
2.3.8.	Yan Etkileri	55
2.3.9.	İlaç etkileşimleri	56
2.3.10.	Kontrendikasyonları	57
3.	GEREÇ ve YÖNTEM	58
3.1.	Materyal	58
3.1.1.	Bitkisel Materyal	58

3.1.2.	HPLC Analizinde Kullanılan Standartlar	59
3.1.3.	HPLC cihazı	59
3.1.4.	HPLC Analizinde Kullanılan Solvanlar	59
3.2.	Yöntemler	60
3.2.1.	İzoflavonların HPLC ile Miktar Tayini	60
3.2.1.1.	Ekstrelerin Hazırlanması	60
3.2.1.2.	Standart Çözeltilerin Hazırlanması	60
3.2.1.3.	HPLC Yöntemi	61
4.	BULGULAR	63
4.1.	İzoflavonların HPLC ile Miktar Tayinine Ait Bulgular	63
4.1.1.	Kalibrasyon Eğrileri	63
4.1.2.	<i>Trifolium longidentatum</i> 'daki izoflavonların HPLC ile Miktar Tayini	69
5.	TARTIŞMA ve SONUÇ	71
6.	ÖZET	75
7.	SUMMARY	76
8.	KAYNAKLAR	77
9.	ÖZGEÇMİŞ	89

RESİMLER ve ŞEKİLLER		
Resim/Şekil No:	Resim/Şekil Adı:	Sayfa No:
Resim 1	<i>Trifolium longidentatum</i> Nábělek Genel görünüş	9
Resim 2	<i>Trifolium longidentatum</i> Nábělek Çiçek ve Yaprak	10
Şekil 1	<i>T. pratense</i> , <i>T. repens</i> , <i>T. dubium</i> ve <i>T. corniculatus</i> 'dan izole edilen izoflavonoitler	13
Şekil 2	<i>Trifolium pratense</i> 'den izole edilen izoflavonlar ve glukozitler	14
Şekil 3	<i>Trifolium pratense</i> ' den izole edilen izoflavonlar	15
Şekil 4	<i>Trifolium</i> türlerinden izole edilen pterokarpan yapısında izoflavonoitler	17
Şekil 5	<i>Trifolium pratense</i> köklerinden izole edilen izoflavonoitler	18
Şekil 6	Temel flavonoit yapıları	20
Şekil 7	<i>Trifolium pratense</i> 'de bulunan başlıca izoflavonoitler	21
Şekil 8	Genistein ve 17 β -östradiol'ün yapısal benzerliği	22
Şekil 9	Daidzein'in biyotransformasyonu	51
Şekil 10	Daidzein'in ana metabolitleri	52
Şekil 11	Standart daidzein, genistein, formononetin, biokanin A ve 6-metoksiflavonon (IS)'un HPLC kromatogramı	64

Şekil 12	Standart daidzein kalibrasyon grafiği ve doğru denklemi	65
Şekil 13	Standart genistein kalibrasyon grafiği ve doğru denklemi	66
Şekil 14	Standart formononetin kalibrasyon grafiği ve doğru denklemi	67
Şekil 15	Standart biokanin A kalibrasyon grafiği ve doğru denklemi	68
Şekil 16	<i>Trifolium longidentatum</i> metanol ekstresinin HPLC kromatogramı	70

TABLolar

Tablo No:	Tablo Adı:	Sayfa No:
Tablo 1	HPLC analizinde uygulanan gradient elüsyon	62
Tablo 2	Kalibrasyon eğrisinin hazırlanmasında daidzein için kullanılan pik alanları	65
Tablo 3	Kalibrasyon eğrisinin hazırlanmasında genistein için kullanılan pik alanları	66
Tablo 4	Kalibrasyon eğrisinin hazırlanmasında formononetin için kullanılan pik alanları	67
Tablo 5	Kalibrasyon eğrisinin hazırlanmasında biokanin A için kullanılan pik alanları	68
Tablo 6	<i>Trifolium longidentatum</i> ekstralarında % daidzein, genistein, formononetin ve biokanin A miktarları	69

1. GİRİŞ ve AMAÇ

Leguminosae familyasının önemli taksonlarından birisi olan *Trifolium* cinsi, her iki yarıkürenin subtropikal ve ılıman bölgelerinde, özellikle de Akdeniz bölgesi'nde, 300 kadar tür ile geniş yayılış göstermektedir^{1,2}. Ülkemizde “yonca” adıyla bilinen *Trifolium* türleri, çeşitli rahatsızlıkların tedavisinde halk ilacı olarak kullanılmakta ve bazı yörelerde gıda olarak tüketilmektedir. Bazı türler hayvan yemi olarak geniş alanlarda ekilmektedir. Türk halk tıbbında, *T. arvense* L., *T. pratense* L. (kırmızı yonca, çayır tıfılı, çayır dutu) ve *T. repens* L. (beyaz yonca) ekspektoran, analjezik, antiseptik ve romatizma ağrılarını dindirici olarak kullanılmaktadır. *T. pratense* ve *T. ambiguum* M. Bieb.'un çiçek durumları Erzurum ve Kars yöresinde gıda olarak tüketilmektedir³. *T. pratense*, *T. repens*, *T. resupinatum* L., *T. incarnatum* L., *T. hybridum* L., *T. pannonicum* Jacq., *T. subterraneum* L., *T. purpureum* Loisel., *T. fragiferum* L., *T. ambiguum*, *T. nigrescens* Viv. subsp. *petrisavii* (Clementi) Holmboe ve *T. medium* L. Akdeniz bölgesinde koyun ve sığırlar için yem bitkisi olarak yetiştirilen türler arasındadır⁴.

Avrupa ve Asya'da geniş yayılış gösteren *Trifolium pratense* (Red clover)'nin çiçekleri Amerikan yerlileri tarafından merhem şeklinde, haricen yara iyileştirici olarak, psöriazis ve ekzema gibi cilt hastalıklarının tedavisinde ve ekspektoran etkisi nedeniyle dahilen solunum yolları rahatsızlıklarında kullanılmıştır⁵⁻⁷.

T. pratense önemli “fitoöstrojen” kaynaklarından birisidir. Fitoöstrojenler non-steroidal, polifenolik yapıda, östrojen benzeri biyolojik aktivite gösteren bitkisel kaynaklı bileşiklerdir. İzoflavonoitler, flavonoitler, stilbenler ve lignanlar olmak üzere başlıca dört grupta toplanırlar. Bu bileşikler, yapısal olarak insanda başlıca fizyolojik östrojen olan 17 β -östradiol'e çok benzedikleri için, memelilerdeki östrojeni taklit ederler. Bu

nedenle menopozal semptomlar gibi östrojenle ilgili durumlarda ve östrojenle ilgili prostat, meme kanseri, osteoporoz ve kardiyovasküler hastalıklarda protektif etkiye sahiptirler. Yapılan *in vivo* ve *in vitro* çalışmalar neticesinde, izoflavonların östrojenik aktivitesinin steroidale östrojenlerin 1/100 – 1/100000'i kadar olduğu belirlenmiştir. İzoflavonlar vücutta belirlenen iki östrojen reseptöründen (ER) ER α ile zayıf, fakat ER β ile neredeyse östrojenler kadar iyi bağlanırlar. Fitoöstrojenler östrojen agonisti veya antagonisti etkiye sahiptir. Vücutta doğal östrojen üretimi az olduğunda fitoöstrojenler, hücredeki östrojen reseptörlerine bağlanarak zayıf östrojenik etki gösterirler. Östrojen üretimi fazla olduğunda ise reseptöre bağlanabilmek için doğal östrojenle yarışır ve zayıf bir östrojen olduğundan antiöstrojenik etki gösterirler^{8,9}.

Bugün fitoöstrojenlerce zengin besinler özellikle menopozal semptomların giderilmesinde ve östrojenle ilgili hastalıklarda (prostat, kardiyovasküler hastalıklar, osteoporoz ve kanser) protektif etkilerinden dolayı çok tüketilmektedir. Epidemiyolojik çalışmalar fitoöstrojen bakımından zengin diyetle beslenen toplumlarda kardiyovasküler hastalıklar, osteoporoz, meme, prostat ve bağırsak kanserleri ile ilgili şikayetlerin daha az görüldüğünü, premenopozal dönemdeki kadınlarda endokrin değışiklikler oluşturarak menstrual siklus uzunluğunu etkilediğini ve postmenopozal dönemdeki kadınlarda östrojen yetersizliğine bağlı semptomların daha hafif yaşandığını göstermiştir^{10,11}.

T. pratense'nin östrojenik etkisinden içerdğ i izoflavonoidler sorumlu bulunmaktadır. *T. pratense* izoflavonoid olarak başlıca formononetin, biokanin A ve bu bileşiklerin glikozitleri veya 6"-O-malonil türevlerini içermektedir. Bunun yanı sıra minör aglikonlar olarak glisitein, irilon, orobol, pratensein, pseudobaptigenin ve prunetin taşır^{12,13}. *T. pratense*'nin yaprak, çiçek veya toprak üstü kısımlarından hazırlanan standart ekstraktları başlıca biokanin A ve formononetin ile daha az miktarda

genistein ve daidzein içerirler. Bugün *T. pratense*'nin izoflavon ekstrelerini içeren preparatlar, Avrupa ve Amerika'da gıda takviyesi olarak menopozal şikayetleri gidermek amacıyla yaygın olarak kullanılmaktadır^{6,7}.

Ülkemiz florasında *Trifolium* cinsi 13'ü endemik olmak üzere 130 takson ile temsil edilmektedir¹⁴⁻¹⁸. Ülkemizde yetişen *Trifolium* türlerini taşıdıkları izoflavonları bakımından incelediğimiz önceki çalışmamızda, farklı lokalitelerden toplanan *Trifolium pratense*'nin iki varyetesinin (*T. pratense* var. *pratense* ve *T. pratense* var. *sativum*) topraküstü kısımlarından hareketle hazırlanan ekstrelerde, daidzein, genistein, formononetin ve biokanin A'nın HPLC ile miktar tayinleri belirlenmiştir¹⁹. Çalışmalarımızın devamında, daha önce üzerinde herhangi bir araştırma yapılmamış endemik ve Güney Doğu Anadolu'da dar yayılış gösteren bir *Trifolium* türü olan *Trifolium longidentatum* Nábëlek doğal olarak yetiştiği bölgeden toplanmıştır. Bu türün toprak üstü kısımlarında daidzein, genistein, formononetin ve biokanin A'nın HPLC ile miktarlarının belirlenmesi ve böylece daha önce üzerinde çalışma yapılmamış olan *T. longidentatum*'un izoflavonları bakımından değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

“*Trifolium longidentatum* Nábělek Bitkisinin İzoflavonoitleri Yönünden Değerlendirilmesi” isimli çalışmamıza ait teorik bilgiler, bitkinin ait olduğu familya ve genusa ait bilgilerin verildiği ve bitkinin morfolojik özelliklerinin açıklandığı “Botanik Kısım” ile kimyasal ve biyolojik aktivite tayinlerine yönelik araştırmaların yer aldığı “Kimyasal Kısım” başlıkları altında toplanmıştır.

Trifolium türleri üzerine bugüne kadar yapılan araştırmalar sonucunda elde edilen bileşikler kimyasal gruplarına göre sınıflandırılarak verilmiştir. Bu bölümü, *Trifolium* türlerinin biyolojik aktivitelerinin yer aldığı çalışmalar izlemektedir.

2.1. Botanik Kısım

Trifolium longidentatum Nábělek'in sistematikteki yeri¹⁴

Bölüm:	Spermatophyta
Altbölüm:	Angiospermae
Sınıf:	Dicotyledonae
Altsınıf:	Dialypetalae
Takım:	Fabales
Familya:	Leguminosae
Alt familya:	Papilionoideae
Tribus:	Trifoliae
Cins:	<i>Trifolium</i> L.
Section:	<i>Trifolium</i>
Tür:	<i>Trifolium longidentatum</i> Nábělek

2.1.1. Leguminosae Familyası (Baklagiller)

Leguminosae familyası, çiçekli bitkiler arasında Compositae'den sonra gelen ikinci büyük familyadır. Aralarında kserofitler ve suda yaşayanlar da bulunur. Tropik, subtropik ve ılıman iklim kuşağında yaygın olan bu familya yaklaşık olarak 600 cins ve 13000 kadar tür bulunur ve bir kısmından önemli droglar elde edilir^{20,21,1}.

Birçok Leguminosae bitkisinde karakteristik bir özellik olarak, *Rhizobium* türü bakteri nodülleri bulunur. Bu bakteri havadaki azotu alıp diğer azotlu bileşiklere dönüştürme yeteneğini taşır. Bu nedenle fakir toprakları kuvvetlendirmek amacıyla bu familya bitkilerinden yararlanılır^{7,20}.

Famulya bitkileri çok geniş yayılışlı, ot, çalı, küçük ya da bk aa şeklindedir, aralarında tırmanıcı olanlar da bulunur. Yapraklar alternan dizilişli, genellikle stipulalı, pennat, digitat, trifoliat veya basittir. Çiçekler aktinomorf veya zigomorf, genellikle hermafrodit, rasemus, spika veya umbella iek durumlu veya tek çiçeklidir. Sepaller (4-) 5. Petaller (1-) 5, serbest veya nadiren kısmi olarak birleşiktir. Stamenler 4-çok sayıda, genellikle 10, ya hepsi tüp şeklinde birleşik (monodelf) veya st stamen serbest (diadelf) ya da hepsi serbesttir. Karpel 1, nadiren birkaç, st durumlu, meyve legmen, bazen lomentum. Tohum 1-çok sayıda²².

Leguminosae famulyası bitkileri  alt famulya altında toplanır. En zengin olan Papilionoideae (Papilionaceae; Fabaceae) 400 kadar cins, Mimosoideae (Mimosaceae) 50 kadar cins ve Caesalpinioideae (Caesalpiniaceae) 150 kadar cinsi kapsar. Bu alt famulyalar çok geniş olduklarından birer famulya olarak da kabul edilir^{20,21,1}.

1) Caesalpinioideae (Syn: Caesalpiniaceae): Çoğunlukla odunlu bitkilerdir. Yapraklar imparipinnat, bazen bipennat veya basittir. Çiçekler zigomorf. Petaller tomurcukta yükselici-imbrikat (kiremit) dizili, nadiren petalsız. Stamenler serbest, 5-10 adet. Meyve legmen veya lomentum^{21,22}.

2) Mimosoideae (Syn: Mimosaceae): Çoğunlukla odunlu bitkilerdir. Yapraklar bipennat veya fillodik. Çiçekler aktinomorf. Petaller tomurcukta valvat dizilişli. Stamenler serbest, 4-çok sayıda. Meyve legmen^{21,22}.

3) Papilionoideae (Syn: Papilionaceae; Fabaceae): Bu alt famulya bitkilerinin en çarpıcı özelliği çiçeklerinin zigomorf oluşu ve kelebeğe benzemesidir. Geniş yayılış ve değişik hayat formu gösteren bitkilerin, tropiklerde yetişenleri çoğunlukla odunsu, diğerleri ise otsudur.

Yapraklar paripennat, imparipennat, digitat, trifoliat veya tek. Çiçekler zigomorf. Kaliks gamosepal ve 5 lobludur. Korollanın 5 petalinden üçü serbest, ikisi birleşiktir. Şekil bakımından birbirine benzemeyen petaller değişik isimlerle açılırlar. Üstte bulunan petal büyük ve diktir, veksillum (bayrakçık) adını taşır; iki yanda bulunan petaller kanada benzediği için ala (kanatçık) adı verilmiştir; altta bulunan birleşmiş olan iki petal kayığa benzer ve karina (kayıkçık) denir. Tomurcuktayken karinayı kanatlar örter, veksillum da hepsini sarmış durumdadır. Korolla nadiren tek bir veksillum indirgenmiştir. Stamenler (5-)10, monodelf veya diadelf, nadiren serbest. Ovaryum bir karpelden yapılmış, 1 gözlü, tek veya çok ovüllü; meyve legumen veya lomentumdur; legumen meyveler orta damar ve ventral dikiş boyunca açılır^{21,22}.

Yurdumuzda 70 kadar cins ve 1000 kadar tür yetişir. Tıbbi bitkiler bakımından da zengin bir altfamilya olan Papilionaceae'nin yaygın cinsleri; *Astragalus* L., *Vicia* L., *Lathyrus* L., *Trifolium* L., *Coronilla* L., *Melilotus* L. Cinsleridir^{21,22}.

2.1.2 *Trifolium* L. Cinsi

Bir veya çok yıllık bitkilerdir. Yapraklar trifoliat veya nadiren 5-9 yaprakçıklı digitat, genellikle kenarları dentat. Stipulalar belirgin, petiole yapışık. Çiçekler sapsız veya saplı başçıklarda ya da kısa rasemus, nadiren tek, brakteli veya braktesiz. Kaliks değişken, bazen şişkin, kaliks boğazı açık veya kapalı; kaliks dişleri birbirine eşit veya farklı uzunlukta. Korolla pembe, kırmızıdan eflatuna kadar, beyaz veya sarı. Stamenler diadelf. Meyve genellikle kaliksin içinde, 1-2(-10) tohumlu¹⁴.

Trifolium genusu her iki yarıkürenin subtropikal ve ılıman bölgelerinde 250-300 kadar tür ile yayılış göstermektedir^{1,2}. Bu türlerden *T. pratense* L., *T. repens* L., *T. incarnatum* L., *T. resupinatum* L., *T. hybridum* L., *T. pannonicum* Jacq., *T. subterraneum* L., *T. fragiferum* L. ve *T. medium*'un L. hayvan yemi olarak kültürü yapılmaktadır².

Türkiye Florasının tür sayısı bakımından 9. zengin cinsidir. Ülkemizde doğal olarak yetişen 96 tür, 4 alttür, 39 varyete bulunmaktadır. Toplam takson sayısı 130 olan cins, 13 endemik türe sahiptir. *Trifolium* cinsinin endemik taksonları; *T. euxinum*, *T. barbulatum*, *T. pachycalyx*, *T. aintabense*, *T. longidentatum*, *T. davisii*, *T. caudatum*, *T. pannonicum* subsp. *elongatum*, *T. roussaeum*, *T. apertum* var. *kilaeum*, *T. chlorotrichum*, *T. rhizomatosum* ve *T. batmanicum*'dur¹⁴⁻¹⁸.

2.1.3. *Trifolium longidentatum* Nábělek

25-40 cm boyunda çok yıllık bitkiler. Yaprakçıklar oblong-eliptik, 1.5-4 cm boyutunda, obtus veya hafif emerginat. Çiçek durumu ovoid, meyvede uzamış, 2-2.5 cm genişliğinde, saplı. Kaliks 10 damarlı; tüp silindirik, iç yüzey tüylü, boğaz kapanmış, kaliks dişleri akut, farklı uzunlukta. Korolla pembemsi, 25 mm'ye kadar. Çiçeklenme dönemi 6-8. aylar. 1800-3300 m yüksekliklerde, subalpin çayırlarda yayılış gösterir. Endemik, İran-Turan elementidir. Güney Doğu Anadolu'da dar yayılışlı bir türdür¹⁴.



Resim 1: *Trifolium longidentatum* Nábělek Genel görünüş



Resim 2: *Trifolium longidentatum* Nábělek Çiçek ve Yaprak

2.2. Kimyasal Kısım

2.2.1. *Trifolium* Türlerinin Kimyasal Bileşimi Üzerine Yapılan Çalışmalar

Trifolium genusu üzerindeki kimyasal çalışmalar genellikle fenolik bileşikler üzerinde yoğunlaşmıştır. Birçok *Trifolium* türünden bugüne kadar fenolik bileşik olarak; basit fenolik bileşikler, başlıca izoflavonoitler olmak üzere çeşitli flavonoit türevi bileşikler ve kumarinler izole edilmiştir. Bu bileşikler yanında *Trifolium* türlerinden saponinler, siyanogenetik heterozitler, megastigman glikozitleri, çeşitli uçucu bileşikler, lipitler ve steroid yapısında bileşikler tespit edilmiştir. Genusun taşıdığı saponinler ise genellikle oleanan tipinde triterpenik bileşiklerdir. *Trifolium* türlerinden izole edilen kimyasal bileşikler üzerinde ayrıntılı literatür bilgisi, son zamanlarda Anabilim Dalı'mızda yapılan bir Yüksek Lisans tez çalışmasında* ve Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmakognozi Anabilim Dalı'nda yapılan bir Doktora Tezinde** verildiği için burada tekrar bahsedilmemiştir. Yaptığımız literatür taramasında, tez konumuzu oluşturan *Trifolium longidentatum* Nábëlek üzerine bugüne kadar yapılmış fitokimyasal herhangi bir çalışmaya rastlanılmamıştır. Bu nedenle tezimizin bu kısmında, incelediğimiz genus üzerinde araştırma konumuzu oluşturan izoflavonoitler ayrıntılı olarak ele alınmıştır.

*Kadioğlu, O. *Trifolium pratense* L.'nin Fitoterapide Önemi. Yüksek Lisans Tezi. Ankara. Ankara: Gazi Üniversitesi; 2008.

**Renda, G. Bazı *Trifolium* L. Türleri Üzerinde Farmakognozik Araştırmalar. Doktora Tezi. Ankara: Hacettepe Üniversitesi; 2010.

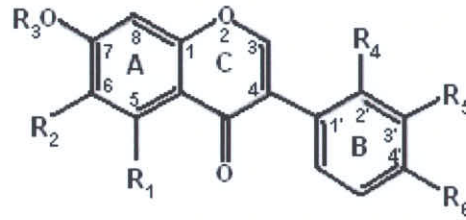
2.2.1.1. İzoflavonoitler

Yapısal ve fonksiyonel olarak memeli östrojenini taklit eden ve bundan dolayı östrojen benzeri biyolojik aktiviteler gösteren fitoöstrojenlerin büyük bir grubunu, Fabaceae familyası için karakteristik bileşikler olan izoflavonoitler oluşturmaktadır⁸. *Trifolium* türleri üzerinde yapılan çalışmalara bakıldığında, fitoöstrojenik etkilerinden dolayı izoflavonoitleri üzerinde yoğunlaştığı görülmektedir.

T. pratense'nin metanollü ekstresinden kromatografik yöntemler kullanarak biokanin A, ononin, daidzein, daidzein-7-glikozit, formononetin, genistein, 7- β -D-glikozil-5,7-dihidroksi-4'-metoksiizoflavon ve bu bileşiğin 5-malonat türevi izole edilmiştir²³. Bir başka çalışmada, *T. pratense* köklerinin metanollü ekstresinden 5,4'-dihidroksi-6,7-metilendioksiizoflavon ve bu bileşiğin 4'-O- β -D-glikoziti izole edilerek yapısı aydınlatılmıştır²⁴. Yine aynı araştırmacılar tarafından, *T. pratense*'nin köklerinden kalikosin, psödobaptigenin, pratensein, formononetin, genistein ve biokanin A ve bunun yanında 3 tane glikozit yapısında izoflavonoitin (ononin, rotindin ve genistin) izolasyonu bildirilmiştir²⁵.

T. repens'den yeni bir açilli izoflavon türevi bileşik olarak, genistein 7-(2"-p-kumaroilglukozit) izole edilmiştir²⁶. *T. pannocinum*'un yapraklarından izoflavonoit glikoziti olarak genistin'in izole edildiği bildirilmiştir²⁷.

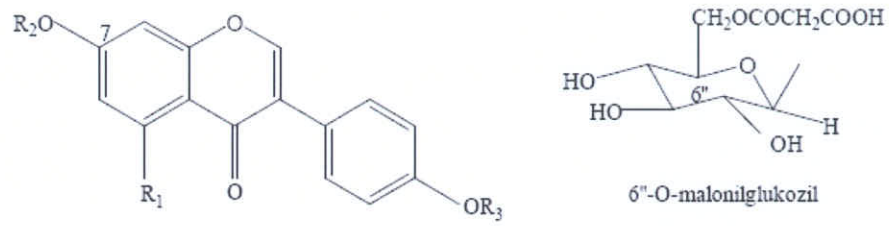
T. pratense, *T. repens*, *T. dubium* ve *T. corniculatus*'un yapraklarından hareketle metanollü ekstraktları hazırlanmış ve bu ekstraktlar C-18 ters faz kolonlarda, sıvı kromatografi (Liquid Chromatography, LC) uygulanarak incelenmiştir. Bileşikler diod array (DA) UV absorpsiyon, floresans, kütle spektrometresi kullanılarak üç farklı modda analiz edilmiştir. Bitkilerde varlığı tespit edilen izoflavonoid türevi bileşikler aşağıda verilmiştir (Şekil 1)²⁸.



İzoflavon	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	R ₆
Afrormosin	H	OCH ₃	H	H	H	OCH ₃
Biokanin A	OH	H	H	H	H	OCH ₃
Kalikosin	H	H	H	H	OH	OCH ₃
Daidzein	H	H	H	H	H	OH
Formononetin	H	H	H	H	H	OCH ₃
Genistein	OH	H	H	H	H	OH
Glisetin	H	OCH ₃	H	H	OH	OH
İrilin B	OH	OCH ₃	H	OH	H	H
İrilon	OH	OH	CH ₃	H	H	OH
3-Metillorobol	OH	H	H	H	OCH ₃	OH
Pratensein	OH	H	OH	H	OH	OCH ₃
Psödobaptigenin	H	H	H	H	OH	OCH ₃
Teksasin	H	OH	H	H	H	OCH ₃

Şekil 1: *T. pratense*, *T. repens*, *T. dubium* ve *T. corniculatus*'dan izole edilen izoflavonoidler

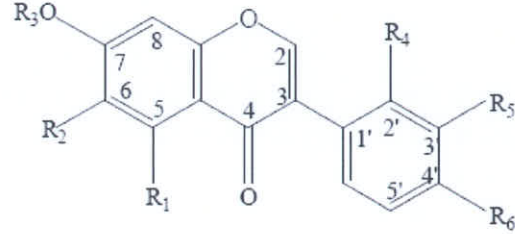
T. pratense üzerine yapılan diğer bir çalışmada, yaprakların izoflavonlar, glukozitleri ve glukozit malonatlarını taşıdığı belirlenmiştir (Şekil 2)²⁹.



Bileşik	R ₁	R ₂	R ₃
Daidzein	H	H	H
Daidzin	H	7-O-β-D-glc	H
Genistein	OH	H	H
Genistin	OH	7-O-β-D-glc	H
Formononetin	H	H	CH ₃
Ononin	H	7-O-β-D-glc	CH ₃
Formononetin-7-O-β-D-Glc-6''-O-Mal	H	7-O-β-D-glc-6''-O-mal	CH ₃
Biyokanın A	OH	H	CH ₃
Sissotrin	OH	glc	CH ₃
Biyokanın A -7-O-β-D-Glc-6''-O-Mal	OH	7-O-β-D-glc-6''-O-mal	CH ₃

Şekil 2: *Trifolium pratense*'den izole edilen izoflavonlar ve glukozitler

Bir başka çalışmada *T. pratense*'nin topraküstü kısımlarından katı-faz ekstraksiyon (solid-phase extraction) metodu ile hazırlanan ekstrelerde, C-18 ters faz kolonlar kullanılarak LC-MS tekniği ile 14 izoflavon malonat glikoziti ve 6 izoflavon asetil glikoziti'nin varlığı tespit edilmiştir (Şekil 3)¹².

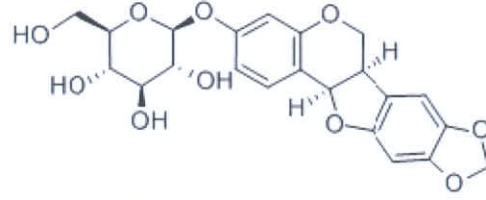


Bileşik	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	R ₆
Daidzin	H	H	Glc	H	H	OH
Glisetin-7-O-B-D-Glc	H	OCH ₃	Glc	H	H	OH
Kalkosin-7-O-B-D-Glc	H	H	Glc	H	OH	OCH ₃
Genistin	OH	H	Glc	H	H	OH
Daidzein-7-O-B-D-Glc-6"-O-Mal	H	H	Glc-Mal	H	H	OH
3-Metilorobol-7-O-B-D-Glc	OH	H	Glc	H	OCH ₃	OH
Prateasin-7-O-B-D-Glc	OH	H	Glc	H	OH	OCH ₃
Kalkosin-7-O-B-D-Glc-6"-O-Mal	H	H	Glc-Mal	H	OH	OCH ₃
Pseudobaptigenin-7-O-B-D-Glc	H	H	Glc	H	OH	OCH ₃
Daidzein-7-O-B-D-Glc-6"-O-Asetat	H	H	Glc-O-Ac	H	H	OH
Ononin	H	H	Glc	H	H	OCH ₃
Genistein-7-O-B-D-Glc-6"-O-Mal	OH	H	Glc-Mal	H	H	OH
Orobol-7-O-B-D-Glc-6"-O-Mal	OH	H	Glc	H	OH	OH
3-Metilorobol-7-O-B-D-Glc-6"-O-Mal	OH	H	Glc-Mal	H	OCH ₃	OH
Prateasin-7-O-B-D-Glc-6"-O-Mal	OH	H	Glc-Mal	H	OH	OCH ₃
Daidzein	H	H	H	H	H	OH
İrilon-4'-O-7-O-B-D-Glc	OH	OH	CH ₃	H	H	Glc
Pseudobaptigenin-7-O-B-D-Glc-6"-O-Mal	H	H	Glc-Mal	H	OH	OCH ₃
Glistein	H	OCH ₃	H	H	H	OH
Orobol	OH	H	H	H	OH	OH
Formononetin-7-O-B-D-Glc-6"-O-Mal	H	H	Glc-Mal	H	H	OCH ₃
Afromosin-7-O-B-D-Glc	H	OCH ₃	Glc	H	H	OCH ₃
Sissotrin(Biokanin A-7-O-B-D-Glc)	OH	H	Glc	H	H	OCH ₃
İrilin B-7-O-B-D-Glc	OH	OCH ₃	Glc	OH	H	H
İrilon-4'-O-7-O-B-D-Glc-6"-O-Mal	OH	OH	CH ₃	H	H	Glc-Mal
Trifosid	OH	H	CH ₃	H	H	Glc
Pseudobaptigenin-7-O-B-D-Glc-6"-O-Asetat	H	H	Glc-O-Ac	H	OH	OCH ₃
Formononetin-7-O-B-D-Glc-6"-O-Asetat	H	H	Glc-O-Ac	H	H	OCH ₃
Teksasin-7-O-B-D-Glc-6"-O-Mal	H	OH	Glc-Mal	H	H	OCH ₃
İrilin B-7-O-B-D-Glc-6"-O-Mal	OH	OCH ₃	Glc-Mal	OH	H	H
3'-Metilorobol	OH	H	H	H	OCH ₃	OH
Genistein	OH	H	H	H	H	OH
Biokanin A-7-O-B-D-Glc-6"-O-Mal	OH	H	Glc-Mal	H	H	OCH ₃
Pratensein	OH	H	OH	H	OH	OCH ₃
Prunetin-4'-O-B-D-Glc-6"-O-Mal	OH	H	CH ₃	H	H	Glc-Mal
Pseudobaptigenin	H	H	H	H	OH	OCH ₃
İrilon-4'-O-B-D-Glc-6"-O-Asetat	OH	OH	CH ₃	H	H	Glc-O-Ac
Formononetin	H	H	H	H	H	OCH ₃
Prunetin-4'-O-B-D-Glc-6"-O-Asetat	OH	H	CH ₃	H	H	Glc-O-Ac
Biokanin A-7-O-B-D-Glc-6"-O-Asetat	OH	H	Glc-O-Ac	H	H	OCH ₃
İrilon	OH	OH	CH ₃	H	H	OH
Biokanin A	OH	H	H	H	H	OCH ₃

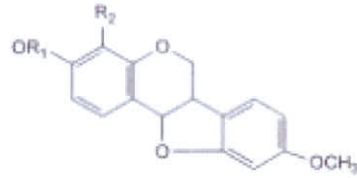
Şekil 3: *Trifolium pratense*'den izole edilen izoflavonlar

T. pratense, *T. repens*, *T. hybridum* ve *T. campestre* üzerinde yapılan bir çalışmada, bu türlerin yaprak, gövde, kök ve çiçeklerinde bulunan izoflavon yapısındaki bileşikler High-performance liquid chromatography-UV-electrospray ionization-mass spectrometric detector (HPLC-UV-ESI-MSD) yöntemi ile incelenmiştir. Yapılan analizler neticesinde, bitkilerin izoflavon aglikonları, glikozitleri ve glikozit malonatlarını içerdiği, bitkilere tek tek bakıldığında ise *T. pratense*'nin yaprak ve gövdesinde 31, *T. repens*'in gövde ve çiçeklerinde 9, *T. hybridum*'un yaprak, gövde ve köklerinde 11 ve *T. campestre*'nin yaprak ve köklerinde ise 4 izoflavonoit tespit edilmiştir. Ayrıca *T. pratense*'nin asit hidroliz ile hazırlanmış yaprak ekstraktlarında ters faz HPLC yöntemi ile daidzein, formononetin, genistein, psödobaptigenin, glisitein, kalikosin, prunetin, biokanin A, irilon, pratensein'in miktar tayini yapılmıştır³⁰.

Trifolium türlerinde izoflavonoitlerin bir bölümünü oluşturan pterokarpan yapısında da bileşikler bulunmuştur. *T. pratense*'nin metanollü ekstresinden kromatografik yöntemler ile diğer izoflavonoit yapılarının yanında, pterokarpan yapısında bir izoflavonoit olan trifolirhizin izole edilmiştir²³. *T. pratense*, *T. repens* ve *T. hybridum*'un kökleri üzerine yapılan bir çalışmada, pterokarpan yapısında inermin, trifolian, homopterokarpin, medikarpin, 4-metoksimedikarpin ile inermin ve medikarpin'in glikozitleri izole edilmiştir. Bu çalışmada ayrıca, *T. repens* ve *T. hybridum*'un köklerinden pterokarpanların yanında formononetin, pseudobaptigenin ve genistein de elde edilmiştir (Şekil 4)³¹.



Trifolirhizin

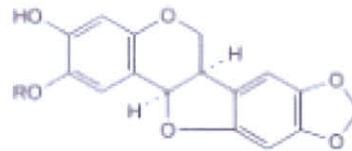


$R_1 = R_2 = H$ Medikarpin

$R_1 = \beta\text{-Glukoz}$ $R_2 = H$ Medikarpin glikoziti

$R_1 = H$ $R_2 = OCH_3$ 4-Metoksimedikarpin

$R_1 = OCH_3$ $R_2 = H$ Homopterokarpin



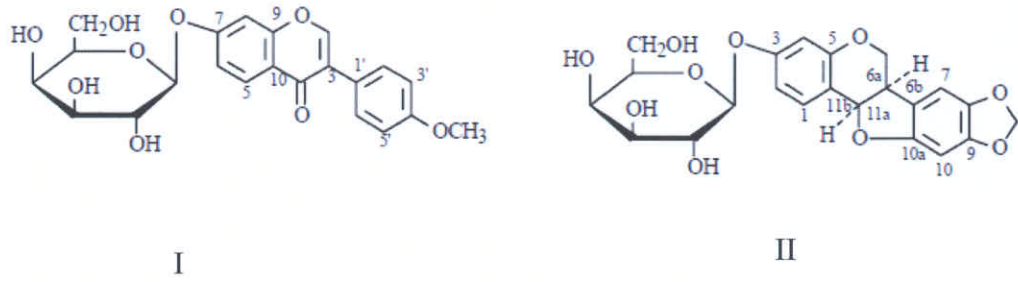
$R = H$ Inermin

$R = CH_3$ Trifolian

Şekil 4: *Trifolium* türlerinden izole edilen pterokarpan yapısında izoflavonoitler.

T. resupinatum var. *microcephalum*'un flavonoitleri üzerine yapılan bir çalışmada, bitkiden izoflavonoit yapısında genistein (genistein-7-*O*- β -glukozit), formononetin ve formononetin-7-*O*- β -glukozit izole edilmiştir³².

Son yıllarda yapılan bir çalışmada, *T. pratense* köklerinden formononetin ve iki yeni izoflavonoit glikoziti, formononetin-7-*O*- β -D-galaktopiranozit (I) ve inermin-3-*O*- β -D-galaktopiranozit (II) izole edilmiştir (Şekil 5)³³.



Şekil 5: *Trifolium pratense* köklerinden izole edilen izoflavonoitler

T. pratense L. izoflavonoitleri üzerine son yıllarda yapılan diğer bir çalışmada, bitkiden izoflavon yapısında formononetin, prunetin, genistein, prunetin-4'-*O*- β -D-glukopiranozit, izoflavon galaktoziti olarak formononetin-7-*O*- β -D-galaktopiranozit, inermin-3-*O*- β -D-galaktopiranozit ve genistein-7-*O*- β -D-galaktopiranozit ve yeni bir monoglukozit bileşik olarak prunetin-4'-*O*- α -D-glukopiranozit ile (+)-pinitol izole edilmiştir³⁴.

2.2.1.2. İzoflavonoitlerin Kimyasal Yapıları

Flavonoitler difenilpropan yapısında olup, piran halkasının oksidasyon derecesine ve fenil halkasının piran halkasına 2. veya 3. konumdan bağlanmasına göre aşağıda belirtildiği gibi sınıflandırılmaktadır. Şekil 6'da temel flavonoit yapıları verilmektedir³⁵.

Sınıflandırılmaları:

2-Fenilbenzopirilyumlar (örn: antosiyaninler)

2-Fenilkromonlar

Flavonlar, flavonoller ve dimerleri

Flavanonlar ve dihidroflavonoller (2,3-dihidrotürevleri)

İzoflavonlar ve izoflavononlar (3-fenilkroman türevleri)

2-Fenilkromanlar

Flavanlar

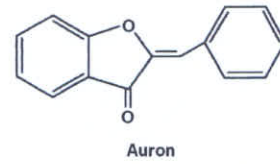
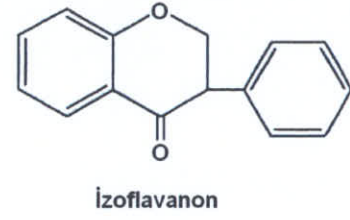
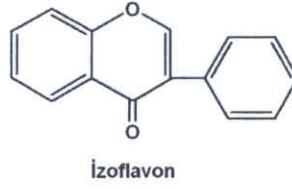
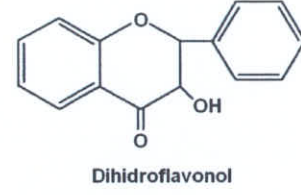
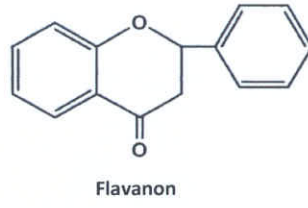
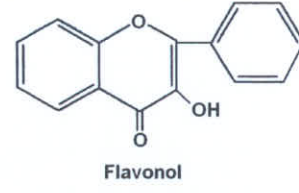
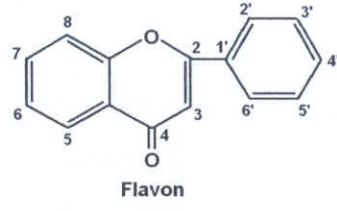
Flavan-3-oller ve flavan-3,4-dioller (oligomer ve polimerler)

Kalkonlar ve dihidrokalkonlar (piran halkası açık)

2-Benziliden kumaranonlar (auronlar)

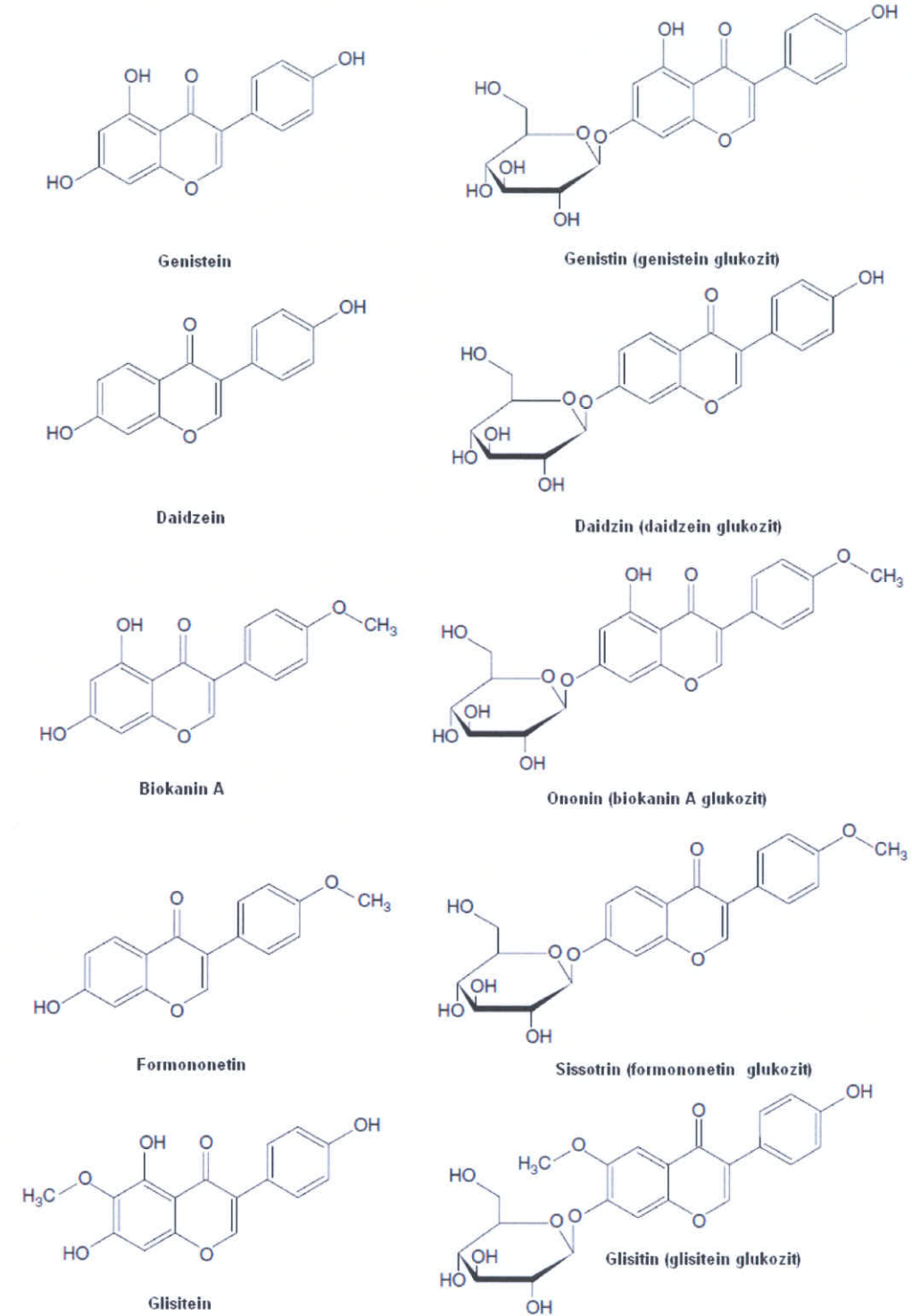
3-Fenilkroman iskeletine sahip izoflavonoitler, bitkiler aleminde dar yayılışlı ve özellikle Fabaceae familyasında sık rastlanan bileşiklerdir. Dar yayılışlarına rağmen doğadan 1600 kadar izoflavonoit yapısı bildirilmiştir. Doğada serbest veya heterozitleri halinde bulunurlar

^{35,36}



Şekil 6: Temel flavonoit yapıları

T. pratense'de bulunan başlıca izoflavonoit yapıları Şekil 7'de verilmiştir.



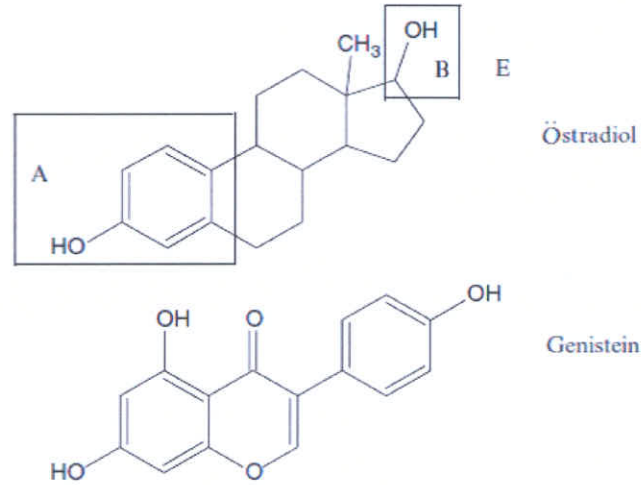
Şekil 7: *Trifolium pratense*'de bulunan başlıca izoflavonoitler

2.3. *Trifolium* Türlerinin Biyolojik Aktiviteleri

2.3.1. *In vitro* çalışmalar

2.3.1.1. Östrojenik etki

İzoflavonlar, 17β -östradiol'e benzer kimyasal yapıda oldukları için östrojenik aktivite gösterirler (Şekil 8). 17β -östradiol steroidal iskeletin 3. konumunda fenolik bir grup ve 17. konumunda bir sekonder alkol grubu taşır, hidrofobik ve esnek olmayan bir yapıya sahiptir. *T. pratense*'de bulunan biokanin A, genistein, daidzein ve formononetin başlıca fitoöstrojenlerdir ve vücutta eksik olan östrojenin yerini alabilirler. Östrojen reseptörü β (ER β)'ya, östrojen reseptörü α (ER α)'dan daha fazla afiniteleri vardır. Menopoz sonrası gibi vücutta östrojen üretiminin az olduğu durumlarda östrojen reseptörlerine bağlanırlar ve böylece östrojenik etki gösterirler. Premenopoz gibi vücutta östrojenin fazla olduğu durumlarda ise izoflavonlar doğal östrojen ile yarışabilirler ve zayıf östrojenik aktiviteye sahip olduklarından antiöstrojenik etki gösterirler^{8,37,38}.



Şekil 8: Genistein ve 17β -östradiol'ün yapısal benzerliği

İzoflavonoitlerin östrojenik etkisi ilk olarak, koyunların bazı yonca türlerini yediklerinde kısırlaştıklarının saptanması ile ortaya çıkmıştır. Fitoöstrojenler ve östrojenler ortak bir etki mekanizmasına sahiptir. Bunun nedeninin, 17β -östradiol'ün steroid çekirdeği ile izoflavonların polifenolik halkasının yapısal benzerliği olduğu düşünülmektedir. 4' ve 7 Konumlarında hidroksil bulunan izoflavonların östrojenik etkili olduğu, bu etkinin 5 konumunda hidroksil sübstitüenti olan izoflavonoitlerde arttığı belirlenmiştir. Ayrıca 4'ten fazla bulunan hidroksil sübstitüentinin veya 4' konumundaki metoksillenmiş sübstitüentin izoflavonoitlerin östrojenik aktivitesini yok ettiği tespit edilmiştir³⁹. Flavon ve izoflavonoitlerle yapılan bir çalışmada, östrojenik aktivite açısından sıralama incelenmiş ve genistein> kemferol> naringenin> apigenin> daidzein> biokanin A> formononetin> luteolin> fisetin> kateşin/taksifolin> hesperetin şeklinde bulunmuştur⁴⁰.

İzoflavon içeriği % 9 (kuru ağırlık) olarak saptanan iki standardize *T. pratense* ekstresinin (Menoflavon®) östrojenik aktivitesi, maya iki plazmit sistemi ile ER α ve ER β kullanılarak değerlendirilmiştir. ER α için, yaklaşık 1 g *T. pratense* ekstresi başına 18 μ g 17β -östradiol ve ER β için, 1 g *T. pratense* başına 78 μ g 17β -östradiole karşılık gelen transaktivasyonel kapasiteye bağlı östrojenik aktivite elde edilmiştir. Ortaya çıkan farklılık, ER β 'nın izoflavonlara daha yüksek ilgi göstermesi ile açıklanmıştır. Yüksek izoflavon içeriği ve ER β 'ya ER α 'dan daha yüksek transaktivasyonel etkisi nedeniyle, *T. pratense* ekstresinin hormon replasman tedavisi için alternatif terapötik potansiyele sahip olduğu belirtilmiştir⁴¹.

T. pratense ekstresi östrojen reseptör-pozitif meme kanseri hücrelerinde hücre proliferasyonunu stimüle etmiştir. Ekstre intrasellüler estradiol reseptörlerine bağlanarak östrojen agonisti gibi etki etmiştir. *T. pratense* ekstresi, progestin aktivitesinde son ürün olan alkalın fosfatazın

progesteron indüksiyonunu *in vitro* olarak inhibe ettiğinden dolayı antiprogesterin olarak tanımlanmıştır⁴². Bir hipoteze göre, endometrium ve meme hücreleri proliferasyonu, ER β aktivasyonu ile artmamaktadır. Progesteron reseptörü (PR) ve androjen reseptörü (AR)'ne ilgi, Hormon Replasman Tedavisi (HRT)'nde yaygın olarak kullanılan Premarin®'in faydalı bir özelliği olarak kabul edilmektedir. *T. pratense* ürünleri, tamamen farklı bileşikler içermesine rağmen, benzer bir etki şekli göstermiştir⁹.

2.3.1.2. Kemoprotektif etki

T. pratense ekstresinden izole edilen ana bileşen biokanin A, karsinojen bir bileşik olan benzo(a)piren'in hücre kültürlerindeki aktivasyonunu inhibe etmiştir. Bu kemoprotektif etkinin, biokanin A'nın karsinogenezis metabolizmasını inhibe ederek, DNA'ya bağlanmasını engellemesi ile gelişmiş olabileceği düşünülmüştür⁴³. Araştırmalarda, vejeteryanların plazmasında seks hormonları bağlayıcı globulin (SHBG) seviyelerinin daha yüksek olduğu ve buna bağlı olarak seks hormonları yıkımının azaldığı, meme ve prostat kanseri riskinin düştüğü tespit edilmiştir. Yapılan bir çalışmada, genistein'in *in vitro* olarak, insan hepatokarsinom (Hep-G2) hücrelerinin SHBG oluşturmaları ve hücre proliferasyonu üzerindeki etkileri incelenmiştir. Genistein'in, Hep-G2 hücrelerinin SHBG yapımını belirgin ölçüde artırır iken bu kanser hücrelerinin proliferasyonunu da baskıladığı gözlenmiştir. Ayrıca bu sırada SHBG yapımı da yüksek kalmaya devam etmiştir⁴⁴.

Başka bir çalışmada, izoflavonların insan meme karsinom hücre serileri MDA-468 (östrojen reseptörü negatif), MCF-7 ve MCF-7-D-40'ın (östrojen reseptörü pozitif) gelişimi üzerine etkileri incelenmiştir. Genistein tüm hücre serilerinde güçlü inhibitör etki (EC₅₀ = 6.5-12.0 μ g/ml) gösterir iken, Biokanin A ve daidzein daha zayıf inhibitör etki (EC₅₀ =20-34 μ g/ml) göstermişlerdir. İzoflavon β -glikozitleri, genistin ve daidzin'in ise çok

az etkili oldukları ($EC_{50} > 100 \mu\text{g/ml}$) görülmüştür. Çalışma sonucunda, izoflavonların MDA-468 ve MCF-7 hücreleri karşılaştırılarak, tümör hücresi oluşumunu inhibe etmeleri için, östrojen reseptörü varlığı gerekmediği tespit edilmiştir⁴⁵. Diğer bir çalışmada, 6 farklı flavonoitin (hesperetin, galangin, naringenin, kersetin, baikalein, genistein), östrojen reseptör pozitif MCF-7 insan meme kanseri hücrelerinin proliferasyonu üzerine etkileri ölçülmüştür. Etki mekanizmalarını saptayabilmek amacıyla, fazla östrojen ilavesi ile flavonoitlerin inhibe ettiği hücre proliferasyonu üzerine etkileri değerlendirilmiştir. Flavonoitlerin zayıf östrojenler olarak hareket ettikleri düşünülerek, ilave edilen 17β -östradiol'ün, hücre proliferasyonunda meydana gelen inhibisyonu tersine çevirmesi beklenmiştir. Beklenen bu etki sadece genistein ile muamele edilen hücrelerde ve yaklaşık % 100 oranında gözlenmiştir. Çalışma sonucunda; Genistein'in *in vitro* olarak östrojen reseptörlerine bağlandığı, diğer flavonoitlerin ise reseptöre bağlanmak için östrojenle yarışmayıp daha farklı bir etki mekanizması ile antiproliferatif etki gösterdiği saptanmıştır³⁹.

Farklı polaritedeki *T. pratense* ekstreleri, osteoblastik osteosarkom hücrelerini (HOS58) uyarma yeteneği açısından test edilmiştir. Osteoblastisite açısından işaretleyici olarak alkalın fosfataz (ALP) aktivitesi seçilerek, tüm ekstreler izoflavon içeriği açısından incelenmiştir. Butanol ve metanol ekstrelerinin ALP veya hücresel protein üretimi üzerine hiçbir etkilerinin olmadığı, kloroform ekstresinin inkübasyonda enzim aktivitesini belirgin ölçüde arttırdığı görülmüştür. Elde edilen bulgular, *T. pratense* izoflavonoitlerinin osteoblastik hücre aktivitesini uyarmada rolü olduğunu göstermiştir⁴⁶.

İnsan meme kanser hücreleri (MCF-7) üzerinde yapılan bir başka çalışmada, genistein'in hücrelerdeki koruyucu bir mekanizma olan programlanmış hücre ölümünde değişikliğe sebebiyet vererek, bir hücre dizisinde zararlı mutasyonlar ve muhtemel kanser proliferasyonuna neden

olacak hasarı önlediği tespit edilmiştir. Bu etkiyi, genistein'in, hücre fonksiyonları ve hücre bölünmesini düzenlemek için gerekli olan fosforlayıcı proteinlerden sorumlu, tirozinkinaz enzimini inhibe ettiği ve birçok hücrede büyümeyi önleyerek gösterdiği saptanmıştır⁴⁷.

2.3.1.3. Kardiyovasküler sistem üzerine etki

İzoflavonların aterosklerozun ilk basamağında etkili olabileceği düşünülerek yapılan bir çalışmada, bir pozitif feed-back (geri bildirim) mekanizması olarak genistein'in insan doku kültürlerinde hücre adezyon moleküllerinin ekspresyonunu inhibe ettiği tespit edilmiştir⁴⁸.

2.3.1.4. Anti-inflamatuvar etki

Trifolium resupinatum var. *microcephalum*'un etanollü ekstresinin anti-inflamatuvar aktivitesi artritlik sıçanlarda ölçülmüştür. Freund adjuvanıyla uyarılmış pençe ödeminde önemli derecede azalma tespit edilmiştir. Ayrıca peroksidasyonda inhibe edilmiştir. Bu etkiler bitkinin içeriğindeki triterpen saponinlerine ve flavonoit bileşiklerinin radikal süpürücü etkisine bağlanmıştır⁴⁹.

T. pratense L. bitkisinin kuru ekstresi üzerinde yapılan *in vitro* bir çalışmada izoflavonlarının (daidzein, genistein, formononetin ve biokanin A) anti-inflamatuvar etkileri araştırılmıştır. *In vitro* Boyden metodu kullanılarak yapılan çalışmada, izoflavonların lökosit migrasyonunu inhibe ederek (kemotaksis) anti-inflamatuvar etki gösterdiği belirlenmiştir⁵⁰.

2.3.1.5. Antioksidan etki

Meyve, sebze ve tahıllardaki fitokimyasal bileşikler geniş alanda tespit edilen biyolojik aktiviteleri nedeniyle dikkat çekmektedir. Son

yıllarda flavonoit grubu bileşiklerin antioksidan etkilerini konu alan geniş çalışmalar yapılmaktadır. *T. pratense* ve soya'dan izole edilen glikozitler ve izoflavonoit aglikonlar (genistein, daidzein) fenolik içerikleri ve antioksidan potensi bakımından karşılaştırılmıştır. Glikozitlerin fenolik içerikleri daha yüksek olmasına rağmen, aglikonlarına nazaran daha az antioksidan aktivite gösterdikleri belirlenmiştir. Fenolik içerik ve total antioksidan aktivite arasında doğrudan bağlantı bulunamamıştır. *T. pratense* ekstresinin polifenol içerik açısından soya ekstresinden daha zengin olduğu bildirilmiştir⁵¹.

Trifolium resupinatum var. *microcephalum*'un etanollü ekstresinin antioksidan aktivitesi artritlik sıçanlarda ölçülmüştür. Freund adjuvanıyla oluşturulmuş pençe ödeminde önemli derecede azalma tespit edilmiştir. Ayrıca peroksidasyon da inhibe edilmiştir. Bu etkiler bitkinin içeriğindeki triterpen saponinlere ve flavonoit bileşiklerinin radikal süpürücü etkisine bağlanmıştır⁴⁹.

Türkiye için endemik olan *T. pannonicum* subsp. *elongatum*'un çiçeklerinden hazırlanan metanollü ekstrenin DPPH metoduyla antioksidan aktivitesi ölçülmüş ve yüksek antioksidan aktiviteye sahip olduğu tespit edilmiştir. Bu çalışmada, *T. pannonicum* subsp. *elongatum*'un çiçeklerinin etilasetat ekstresinden kersetin-3-galaktozit (hiperozit), kersetin-3-glukozit (izokerketin), kersetin ve luteolin-7-galaktozit izole edilmiştir⁵².

Soya ve *T. pratense*'nin değişik izoflavonlarının antioksidan özelliklerini aydınlatmak için yapılan diğer bir çalışmada; 1,5 ve 10 µg/mL konsantrasyonlarda alfa deoksiriboz oksidan metodu ve 10 µg/mL'de pirogallol otooksidan metodu kullanılmıştır. Çalışma sonucunda genistein en yüksek, formononetin en düşük aktiviteyi göstermiştir. Bunun nedeni,

izoflavonların yapılarındaki hidroksil gruplarını farklı konumlarda bulundurmaları olarak açıklanmıştır⁵³.

T. pratense bitkisinin yapısındaki izoflavonların (daidzein, genistein, biokanin A ve formononetin) önemli miktardaki polifenolik içerikleri nedeniyle kuvvetli antioksidan ve radikal süpürücü özellikleri bulunmaktadır. Yapılan bir başka çalışmada, *T. pratense* ekstresinde, soya ekstresinde ve *T. pratense* içerikli katkı maddelerindeki total polifenol içeriği belirlenerek, radikal süpürücü kapasiteleri ile antioksidan aktiviteleri değerlendirilmiştir. *T. pratense* ekstresinde (153 mg/g) ve *T. pratense* içerikli katkı maddelerinde (114 mg/g) toplam polifenol konsantrasyonunun soya ekstresine oranla (18 mg/g) oldukça fazla olduğu bulunmuştur. DPPH radikal süpürücü kapasite açısından *T. pratense* ekstresinin (EC_{50} : 0.32 mg/mL; anti-radikal güç (ARP): 7), *T. pratense* içerikli katkı maddelerine (EC_{50} : 0.50 mg/mL; ARP: 5) oranla yüksek, soya ekstresine oranla (EC_{50} : 1.09 mg/mL; ARP: 2) çok yüksek etkiye sahip olduğu saptanmıştır. Bu sonuçlar gözönüne alındığında, izoflavonların ve polifenollerin güçlü antioksidan ve radikal süpürücü etkilerinin bulunduğu, besin değerleri, fizyolojik ve sağlık destekleyici etkileri sayesinde gıda desteği ve gıda katkısı olarak kullanılabileceği bildirilmiştir⁵⁴.

İzoflavonların antioksidan etkilerinin değerlendirildiği bir çalışmada, izoflavonlar ve bu izoflavonların oksidatif ve bakteriyel metabolitlerinin antioksidan aktivitesini incelenmiştir. Bu amaçla, oksijen radikal absorbans kapasiteleri, düşük dansiteli lipoproteinlerin ve tiyobarbitirik asit'in *in vitro* oksidasyon ölçümleri gerçekleştirilmiştir. Genistein ve daidzein'in oksidatif metabolitleri olan ekuol, üç ölçümde de en yüksek antioksidan aktiviteyi göstermiştir. Metabolitlerin çoğu pozitif kontrol kersetin ve askorbik asit'ten daha etkili bulunmuştur. Formononetin (daidzein'in 4'-O-metil eteri) en düşük antioksidan aktiviteyi göstermiştir⁵⁵.

Reaktif oksijen türleri (ROS); kanser, ateroskleroz, romatoid artrit ve diyabet gibi pek çok hastalığın oluşumuna neden olmakta veya bu hastalıkları tetiklemektedir. Bu nedenle, soya ve *T. pratense*'de bulunan izoflavonların olası antikanserojenik aktivitesi üzerine odaklanmış pek çok çalışma yapılmıştır. Terapötik etkinin ekstrenin standardizasyonuna ve kalitesine bağlı olduğu bildirilmiştir. Bu konuda yapılan bir çalışmada, iki farklı izoflavon ihtiva eden ekstre (izoflavonoit karışımı olan izoflavin beta ve kuru *T. pratense* ekstresi) total flavonoit, izoflavonoit, toplam polifenol ve toplam protein içerikleri bakımından incelenmiş, ayrıca *in vitro* antioksidan aktivitelerine bakılmıştır. Test sonuçlarına göre, her iki ekstrede doza bağımlı olarak önemli ölçüde antioksidan aktivite göstermiştir. Sonuç olarak, kimyasal bileşimin ve *in vitro* antioksidan aktivitenin, ekstrelerin standardizasyonunda yardımcı olabileceği belirtilmiştir⁵⁶.

Sabudak ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada, beş *Trifolium* türünün (*T. balansae*, *T. stellatum*, *T. nigrescens* subsp. *petrisavii*, *T. constantinopolitanum* ve *T. resupinatum* var. *resupinatum*) hekzan ekstreleri antioksidan etkileri β -karoten renk giderim testi, DPPH serbest radikal süpürücü aktivite, metal iyonlarını şelatlama aktivitesi ve total fenol içerikleri bakımından incelenmiştir. İncelenen bütün *Trifolium* türlerinin yalnızca β -karoten-linoleik asit sisteminde antioksidan etkiye sahip oldukları tespit edilmiştir. En yüksek aktivite β -karoten-linoleik asit sisteminde *T. nigrescens* subsp. *petrisavii* ve *T. constantinopolitanum*'da görülmüştür⁵⁷.

2.3.1.6. Prostat hiperplazisi ve prostat kanseri üzerine etki

Doku kültüründe yapılan bir çalışmada, genistein'in benign prostat hiperplazisini önlediği ve prostat kanserinin ilerlemesini inhibe ettiği bildirilmiştir. Yapılan bir başka çalışmada ise, genistein'in prostat kanser

hücresinin invazyonuna etkisi araştırılmış ve sonuçta genistein'in invazyonu inhibe ettiği tespit edilmiştir⁵⁸.

2.3.1.7. Parkinson Hastalığı Üzerine Etkileri

Nörodejeneratif bozuklukla ilişkilendirilen Alzheimer ve Parkinson gibi farklı nörolojik hastalıklarda, oksidatif stresle indüklenmiş nöronal hücre ölümünün rolü olduğu düşünülmektedir. İzoflavonların nöroprotektif etkisi incelenmiş ve izoflavonların H₂O₂ ile indüklenen hücre ölümüne karşı nöroprotektif etkiye sahip olduğu, bu etkilerinin antioksidan aktiviteleriyle ilgili olabileceği bildirilmiştir⁵⁹.

İzoflavonların beyin fonksiyonları üzerine etkileri bazı çalışmalarda incelenmiştir. Bu konuda yapılan bir çalışmada, izoflavonların hidrosiyamik asit içeren insan kortikal hücre dizisinde, *in vitro* kültür ortamında glutamat toksisitesine karşı nöroprotektif etkisi araştırılmıştır. Glutamat toksisiteyle ilişkili olduğu düşünülen Alzheimer, Parkinson gibi nörodejeneratif hastalıklara karşı, izoflavonların antioksidan ve östrojenik etkileri nedeniyle insan kortikal nöronları üzerinde koruyucu etkisi olduğu tespit edilmiştir⁶⁰.

Parkinson hastalığındaki en önemli patolojik değişikliğin dopaminerjik nöronların dejenerasyonundan kaynaklandığı düşünülerek, izoflavonların Parkinson hastalığı üzerine etkileri incelenmiştir. Bu çalışmada, izoflavonların dopamin geri alımındaki lipopolisakkaritlerle (LPS) indüklenmiş düşüşü azalttığı saptanmıştır. Ayrıca, izoflavonların mikroglianin LPS tarafından indüklenen aktivasyonunu, tümör nekroz faktör-alfa'nın üretimini, mezensefalik nöron glia hücrelerindeki nitrik oksit ve süperoksit miktarlarını önemli ölçüde inhibe ettiği tespit edilmiştir. Sonuç olarak, izoflavonlar arasında potansiyel koruyucu etkinin büyükten

küçüğe pratensein, daidzein, kalikosin, formononetin ve irilon olarak sıralanabileceği saptanmıştır⁶¹.

2.3.1.8. Enzim Aktiviteleri

İnsan, hayvan ve hücre kültürleri üzerinde yapılan birçok çalışma, fitoöstrojenlerin menopozal sendromun önlenmesi, osteoporoz, kanser ve kalp hastalıklarında önemli rol oynadığını göstermiştir. Muhtemel etki mekanizmasının östrojenik ve antiöstrojenik etkiye, kanser hücresi farklılaşmasının indüklenmesine, tirozin kinaz enziminin inhibisyonuna, DNA topoizomerez aktivitesine ve antioksidan etkisine bağlı olabileceği belirtilmiştir⁶².

Tirozin kinaz hücre fonksiyonları ve hücre bölünmesini düzenlemek için gerekli olan, fosforlayıcı proteinlerden sorumlu enzimdir. Genistein'in tirozinkinaz enzimini inhibe ederek, birçok hücrede büyümeyi önlediği saptanmıştır. Ayrıca genistein'in DNA onarıcı enzim olan topoizomerazı inhibe ederek oksidatif DNA hasarından hücreyi koruduğu ve antioksidan olarak hareket ettiği tespit edilmiştir⁶³.

Fitoöstrojenlerin steroid metabolizmasını etkileyen enzimler üzerindeki etkilerinin, östrojenik ve antiöstrojenik özelliklerinin açıklanmasında önemli olabileceği bildirilmiştir. İzoflavonların plasenta ve overlerdeki mikrozomlarda aromataz enzimini baskılayarak androjenlerin östrojenlere dönüşümünü bloke ettiği ve özellikle genistein'in östron'un östrodiol'e çevrilmesinden sorumlu olan 17 β -östradiol oksidoredüktaz enzimini baskıladığı yapılan araştırmalarla gösterilmiştir⁶⁴.

Non-steroidal anti-inflamatuvar ilaçların uzun süreli kullanımları ile kanser görülme sıklığında ki azalma ilişkilendirilmiş ve bu etkinin siklooksijenaz (COX) enzim inhibisyonu mekanizması ile ilgili

olduğu saptanmıştır. İzoflavon bakımından zengin diyetle beslenen toplumlarda kanser görülme sıklığında azalma olması, izoflavonların COX inhibitör aktivitelerinin incelenmesine neden olmuştur. Yapılan 2 ayrı hücre deneyi ile *T. pratense*'de bulunan izoflavonların fare makrofaj hücrelerinde ve insan monositlerinde prostaglandin E₂ ve/veya tromboksan B₂ sentezini belirgin bir şekilde inhibe ettiği görülmüştür. Araştırmacılar diyetle alınan izoflavonların COX enzim inhibisyonu yaparak, toplumda bazı kanserlerin düşük oranda görülmesine neden olabileceğini belirtmiştir⁶⁵.

CYP24, D vitamini metaboliti olan 1,25-dihidroksivitamin D3'ün dekompozisyonundan sorumlu enzim olup, genistein CYP24'ün aktivitesini azaltmaktadır. 1,25-dihidroksivitamin D3 prostat ve kolorektal kanser hücrelerinde antimitotik etki gösterir. CYP24'ün yüksek olması, prostat hücrelerinde bulunan 1,25-dihidroksivitamin D3 miktarını azaltır. Genistein kullanımı ile CYP24'ün inhibisyonu sayesinde, 1,25-dihidroksivitamin D3'ün antimitotik etkisinden faydalanılmaktadır. Bu yüzden genistein bakımından zengin diyetin prostat kanserinden korunmada etkili olabileceği düşünülmektedir⁹.

2.3.2. In vivo çalışmalar

2.3.2.1. Östrojenik etki

T. pratense'nin dişi koyunlarda uterin ağırlığını ve meme ucu çevresini arttırdığı, ayrıca servikal mukoza viskoelastisitesini azalttığı gözlenmiştir^{66,67}.

T. pratense'den izole edilen izoflavonların östrojen benzeri aktivitelerini incelemek için Sprague-Dawley dişi sıçanlarda ovaryumlar çıkarılarak düşük östrojen aktivitesi oluşturulmuştur. *T. pratense*'den ekstre edilen izoflavonların farklı konsantrasyonları (51.22, 66.72, 70.21 mg/kg) sıçanlara uygulanmış ve üreme organları ile serumdaki estradiol

(E2) seviyeleri kontrol grubu ile karşılaştırılmıştır. Kontrol grubuna kıyasla vajinal epitelyal hücrelerinin karnifikasyon indekslerinde orta ve yüksek dozlu gruplarda %40 ve %50 artış gözlenmiştir. İzoflavon dozuna bağlı olarak estradiol (E2) seviyelerinde önemli ölçüde artış görülmüştür⁶⁸.

Yapılan bir başka çalışmada, ovaryumu alınmış, yetişkin dişi fareler üzerinde 6 ay süre ile oral olarak verilen formononetin'in östrojenik etkisi incelenmiş ve östrojenik etki, uterus ağırlığındaki değişimle değerlendirilmiştir. Çalışma sonucunda formononetin'in östrojenik etkisi olduğu ve östrojenik etkisinin doza bağlı olmadığı bulunmuştur⁶⁹.

2.3.2.2. Kemoprotektif etki

Yapılan bir çalışmada, 32 yetişkin fareye insanlarda kullanılan doza eşdeğer dozda *T. pratense* izoflavonları ve plasebo verilmiştir. Bulgular endometriyal histoloji, α -östrojen reseptörü ve Ki67 proteininin ekspresyonu ile incelenmiştir. Deney sonucunda, *T. pratense*'nin endometriyumun hücre proliferasyonunda artış yapmaksızın α -östrojen reseptör stimülasyonu sağladığı tespit edilmiştir⁷⁰.

2.3.2.3. Kardiyovasküler sistem üzerine etki

Kolesterol düşürücü mekanizmaların ve soya izoflavonlarının lipoprotein oksidasyonu ve serum kolesterol düzeyi inhibisyonu ile ateroskleroz riskine karşı koruyucu etkilerinin incelendiği bir çalışmada, düşük dansiteli lipoprotein (LDL) reseptörü bulunan ve LDL reseptörü eksik olan farelere soya izoflavonları bakımından zengin diyet verilmiştir. Çalışma sonucunda, izoflavonların LDL reseptörlere bağlanmasını ve yıkımını arttırarak kolesterolü düşürdüğü, ancak LDL reseptöründen yoksun farelerde izoflavonların lipid düşürücü etkilerinin olmadığı tespit edilmiştir. Bu durum LDL reseptör aktivitesindeki artışın kolesterol

düşürücü mekanizmalarda etkinliğini ve ateroskleroz riskine karşı koruyucu etkisi olabileceğini göstermiştir⁷¹.

Diğer bir çalışmada, 6 ay süre ile soya izoflavonları bakımından zengin diyetle beslenen maymunlarda lokal uygulanan asetil kolin, koroner arterde vazodilatasyona yol açmıştır. Aynı sürede soya izoflavonları bakımından fakir diyetle beslenen maymunlarda ise, vazokonstrüktör cevap görülmüştür. Çalışma sonucunda, soya izoflavonlarının vasküler reaktiviteyi olumlu yönde etkileyebileceği belirtilmiştir⁷².

2.3.2.4. Anti-inflamatuvar etki

T. pratense L. bitkisinin kuru ekstresi ile yapılan *in vivo* bir çalışmada izoflavonların (daidzein, genistein, formononetin ve biokanin A) anti-inflamatuvar etkinliği araştırılmıştır. Çalışmada sıçanların ayağına 50 ve 100 mg/kg dozlarla karragenan uygulanmıştır. Her iki dozda da dikkate değer bir şekilde ödemin inhibe edildiği saptanmıştır. Sonuçta izoflavonların anti-inflamatuvar etkiye sahip oldukları bildirilmiştir⁵⁰.

2.3.2.5. Antioksidan etki

1 günlük dişi ve erkek piliçler rastgele seçilerek 5 gruba ayrılmış ve 10'luk her grup 4 tekrarlı çalışılmıştır. Kontrol grubundaki piliçler temel besinlerini tüketmişlerdir. 1., 2., 3. ve 4. grup ise temel besine eklenmiş olan 5,10, 20 ve 30 mg/kg *T. pratense* ekstresini tüketmişlerdir. Elde edilen bulgularda, bağışıklık sağlayan göstergelerde, total serum proteini ve globulinde artış olduğu tespit edilmiştir. İmmun fonksiyonlar ve antioksidan aktivitede 5-20 mg/kg grubunda artış olduğu gözlenmiştir⁷³.

Yapılan bir başka çalışmada, ovaryumu alınmış, yetişkin dişi fareler üzerinde 6 ay süre ile oral olarak verilen formononetin'in antioksidan etkisi incelenmiştir. Antioksidan etki süperoksit dismutaz, katalaz, glutatyon peroksidaz ve malonaldehit içeriğindeki değişimle değerlendirilmiştir. Çalışma sonucunda formononetin'in güçlü serbest radikal süpürücü etkisi olduğu bulunmuştur⁶⁹.

Soya izoflavonlarının 28 erkek sıçan üzerinde karbon tetraklorür (CCl₄) ile deneysel olarak oluşturulmuş plazma paraoksanaz ve arilesteraz enzim düzeyleri üzerine etkileri incelenmiştir. CCl₄ uygulanan grupta antioksidan enzim olan paraoksanaz düzeyleri ile plazma arilesteraz düzeyleri azalırken, soya izoflavon uygulaması sonucunda bu enzimlerin plazma düzeylerinde anlamlı artışlar görülmüştür. Sonuç olarak, soya izoflavonlarının artmış olan lipit peroksidasyon ürünlerini azalttığı, oksidatif hasarı önlemede antioksidan özelliğe sahip bazı enzimleri stimüle ettiği için antioksidan etkinliğe sahip olduğu belirtilmiştir⁷⁴.

2.3.2.6. Kemik mineral yoğunluğu üzerine etki

Kemik yetersizliği, genç yetişkinlik döneminde kazanılan kemik kütlesine, kemik kaybının başladığı yaşa, kayıp oranına ve hormonal, mekanik, genetik faktörler ile beslenme faktörlerine bağlı olup kırık oluşumuna sebep olabilmektedir. Östrojen eksikliğinin kemik kaybını hızlandırması nedeni ile kadınlarda görülen osteoporozun menopoza da ilişkili olduğu saptanmıştır. 75 yaşından önce alınan ve uzun dönem kullanılan hormon replasman tedavisinin, kemik kaybının önlenmesine katkı yapabileceği belirtilmektedir. Ancak hormon replasman tedavisi ile meme kanseri riski artmaktadır. Yapılan hayvan deneyleri sonucunda fitoöstrojenlerin, kemik oluşumunu arttırarak, kemik yıkımını ve kemik kaybını önlediği saptanmıştır. Bu nedenle fitoöstrojenler, osteoporoz'un

önlenmesinde hormon replasman tedavisine alternatif olarak önerilmiştir^{75,76}.

2.3.2.7. Prostat hiperplazisi ve prostat kanseri üzerine etki

Prostat kanserinin gelişimine karşı fitoöstrojenlerin koruyucu etkileri, 3,2'-dimetil-4-aminobifenil ve testosteron propionat ile indüklenen sıçanlar üzerinde plasebo kontrollü bir çalışmada incelenmiştir. İzoflavon karışımı içeren (genistein, %74; daidzein, %21) diyet verilerek, prostat ve seminal veziküllerdeki adenokarsinomların gelişimi araştırılmıştır. Çalışma sonucunda, adenokarsinomların gelişiminin, izoflavon diyeti uygulanan sıçanlarda kontrol grubuna kıyasla anlamlı oranda daha düşük olduğu tespit edilmiştir^{77,78}.

Diğer bir çalışmada, 250 mg/kg genistein içerikli diyet verilen farelerde, genistein'in prostat kanserine karşı koruyucu etkileri incelenmiştir. Çalışma sonucunda genistein'in prostat adenokarsinom insidansını azalttığı, kanserden koruyucu etkisinin ise, spesifik üreme hormon reseptörleri ve büyüme hormonu yolları ile ilişkili olduğu belirtilmiştir. Erkek sıçanlar üzerinde yapılan başka bir çalışmada, genistein'in diyetle alımı ile üreme hormon reseptörü ekspresyonunu azalttığı ve fitoöstrojen bakımından zengin diyetin hormona bağlı prostat kanserinin insidansını düşürdüğü saptanmıştır⁹.

2.3.2.8. Antidiyabetik aktivite

Trifolium alexandrium bitkisinin toprak üstü kısımları, tohumları ve köklerinden hazırlanan sulu ekstraktların glukoz yüklenmiş sıçanlarda güçlü antidiyabetik aktivite gösterdiği tespit edilmiştir⁷⁹.

2.3.2.9. Karaciğer hasarı üzerine etkileri

Karbon tetraklorür (CCl_4)'e bağlı karaciğer hasarında meydana gelen lipid peroksidasyonu oldukça önemli olup, bu hasara bağlı olarak ilerleyen süreç sonunda, karaciğer fibrozu ve siroz oluşabileceği bildirilmiştir. Bu sebeple CCl_4 , deneysel karaciğer hasarı oluşturulmasında yaygın olarak kullanılmaktadır. CCl_4 uygulanmış sıçanlarda oksidatif stres ve buna bağlı olarak ortaya çıkan karaciğer hasarı ile fibrozis arasında ilişki olduğu yapılan çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir. Bu konuda yapılan bir çalışmada, soya izoflavonlarının 28 erkek sıçan üzerinde CCl_4 ile deneysel olarak oluşturulmuş karaciğer hasarı üzerine etkileri incelenmiştir. Çalışma sonucunda, soya izoflavonlarının deneysel olarak oluşturulmuş CCl_4 hasarına bağlı olarak gelişen karaciğer harabiyetini önlemede etkili olduğu tespit edilmiştir⁷⁴.

2.3.2.10. Dermatolojik Etkileri

Genistein ve daidzein gibi izoflavonların, antiaging preparatlar arasında yer almasının, antikarsinojenik, antipigmenter ve antioksidan özelliklerine bağlı olduğu düşünülmektedir. İnsan keratinosit kültürlerinde hyaluronik asit üretimini arttırmaları ve topikal kılsız farelerde dermiste hyaluronik asit boyamalarıyla yoğunluk artışının gösterilmesi, deri yaşlanmasının geciktirdiğini düşündürmüştür. Bu da genistein ve daidzein'in antiaging kozmetik ürünlerde kullanımı konusunda önemli bir gelişme olarak değerlendirilmiştir⁸⁰.

Yapılan pek çok çalışma, genistein'in potansiyel bir antioksidan ve protein tirozin kinazın spesifik inhibitörü olması nedeniyle, belirgin olarak antifotokarsinojenik ve antifotoaging etkileri olduğunu göstermiştir. Genistein'in hayvan çalışmalarında UVB (ultraviyole-B) ışın indüksiyonu ile oluşan cilt kanserlerini ve fotohasarı önlediği, fotohasar ile

tetiklenen cilt yaşlanmasını engellediği saptanmıştır. Bu etki mekanizması; antioksidan etkinliğe, oksidatif ve fotodinamik DNA hasarından ve cilt kanserlerinden korumaya bağlanmıştır. Ayrıca genistein'in maling melanom metastazını inhibe ettiği ve pulmoner maling melanom metastazını inhibe etmede, daidzein'e göre daha etkili olduğu belirtilmiştir⁸¹.

2.3.2.11. Bağışıklık Sistemi Üzerine Etkileri

Murin modeli kullanılarak yapılan bir çalışmada, oral olarak 20-40 mg/kg vücut ağırlığı dozunda uygulanan daidzein'in, spesifik olmayan murin bağışıklığını uyararak, humoral bağışıklığı aktive ettiği ve hücresel bağışıklığı arttırdığı saptanmıştır. Ayrıca, daidzein ve genistein'in ayrı ayrı ve ikisinin birarada, mitojenler tarafından aktive edilen murin splenositlerinin proliferasyonuna ve interlökin-2 (IL-2) ve IL-3 salgılanmasına etkileri incelenmiştir. Daidzein'in, uygun fizyolojik konsantrasyonlarda (0.01-10 µM) lenfosit aktivasyonunu arttırdığı gözlenmiştir. Bu bağışıklığı uyarıcı etki, daidzein'in kanseri önlemede rol oynayabileceğini göstermiştir⁴⁰.

2.3.3. Klinik çalışmalar

2.3.3.1. Menopoz semptomları üzerine etki

Günde en az 3 defa sıcak basmasının gözlemlendiği 37 kadın hasta 3 ay süre ile izlenmiştir. Hastalar üç gruba bölünerek; birinci gruba plasebo, ikinci gruba 40 mg *T. pratense* ekstresi (bir tablet Promensil®), üçüncü gruba 160 mg *T. pratense* ekstresi (4 tablet Promensil®) verilmiştir. Üç ay süre sonunda gruplar arasında sıcak basma sıklığı açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığı gözlenmiştir. Ayrıca vajinal pH veya folikül stimüle edici hormon (FSH) ya da seks hormonu bağlayıcı globulin (SHBG)'in serum düzeyleri de fark etmemiştir. Ancak kontrol

grubunda diyetle izoflavon tüketimine bağılı olarak ürener flavon seviyesinin arttığı gözlenmiştir. Bu nedenle çalışma sonucunun kontrol grubu seçimindeki yanlışlıktan kaynaklandığı belirtilmiştir⁸². Diğer bir randomize, çift kör çalışmada günde 3 kereden fazla sıcak basmasının gözleendiği 51 kadın seçilmiştir. Bireyler iki gruba bölünerek 3 ay süre ile günde 1 tablet Promensil® veya plasebo almışlardır. Çalışma sonucunda, sıcak basması, vajinal kuruluk veya ultrason tetkikleri açısından gruplar arasında bir fark olmadığı gözlenmiştir⁸³.

Günde beş defadan fazla sıcak basması şikayeti ve 12 aydan uzun bir süredir amenoresi olan 30 kadınla yapılan randomize, çift kör, plasebo kontrollü çalışmada, kadınlara ilk dört hafta plasebo tablet verilmiştir. Takip eden 12 hafta boyunca ise, plasebo veya 80 mg *T. pratense* izoflavonları içeren preparat (Promensil®) verilmiştir. İlk dört haftalık dönemde sıcak basmaları % 16 azalırken, daha sonraki 12 haftalık dönemde, plasebo verilen grupta daha fazla bir düşüş olmadığı, izoflavon verilen grupta ise % 44 dolayında istatistiksel olarak belirgin bir azalma olduğu görülmüştür⁸⁴. Başka bir çalışmada rastgele seçilen ve haftada 35 kezden fazla sıcak basması şikayeti olan 252 postmenapoz kadında Promensil® (günde 82 mg), Rimostil® (günde 57 mg) veya plasebonun etkisi 12 hafta boyunca izlenmiştir. Bu çalışmanın sonucunda her üç grupta da sıcak basması sıklığına karşı anlamlı bir iyileşme gözlenmemiştir⁸⁵. Başka bir çalışmada 16 hafta boyunca Promensil® (günde 40 mg) kullanan 30 hastada gözlenen etkiler plasebo grubu ile karşılaştırılmıştır. Çalışma sonucunda Promensil® kullanan grupta, plasebo grubuna göre sıcak basması sıklığında ve şiddetinde anlamlı bir düşüş olduğu belirtilmiştir⁸⁶.

Hormon tedavisi almayan ve 40 yaş üzerinde olan 60 kadın üzerinde yapılan çift kör, randomize, çapraz gruplu bir çalışmada, deneklerle iki grup oluşturulmuştur. 90 günlük kontrol dönemi ve 7 günlük

arınma dönemleri arasında deneklere 180 gün boyunca günde 80 mg *T. pratense* izoflavon ihtiva eden ticari preparat veya plasebo verilmiştir. 90. ve 180. günlerde yapılan sitolojik incelemeler sonucunda, *T. pratense* ekstresindeki izoflavonların menopoz semptomlarını anlamlı oranda azalttığı tespit edilmiştir⁸⁷.

Batı toplumunda çok yaygın olan periyodik meme ağrısının hormonal kaynaklı olduğu düşünülmektedir. Birçok tedavi yönteminin araştırılması sonucunda, hastalığın nadiren de olsa antiöstrojen tedaviyi gerektirdiği sonucuna ulaşılmıştır. İzoflavonların premenstrual dönemde zayıf antiöstrojenik etki gösterdiği ve herhangi bir yan etkisinin olmadığı saptanmıştır. Çift kör, randomize, 2 ay süreli bir çalışmada, 12 kadın üzerinde plasebo kontrollü, 40 mg ve 80 mg dozlarda izoflavon verilerek karşılaştırma yapılmıştır. Bu süre sonucunda, ağrıdaki azalmanın plaseboda % 13, günde 40 mg izoflavon kullanımında % 44, günde 80 mg izoflavon kullanımında % 31 olduğu bildirilmiştir⁸⁸.

Yapılan epidemiyolojik çalışmalarda, farklı ülkelerde menopoz belirtilerinden biri olan sıcak basmasının görülme sıklığı araştırılmıştır. Elde edilen bulgularda, Avrupa ve Kuzey Amerika'daki kadınlarda sıcak basması sıklığı yüksek oranda iken, Japonya, Çin ve Güneydoğu Asya ülkelerinde daha düşük oranda olduğu görülmüştür. Sıcak basması sıklığının daha düşük oranda görülmesinin, ülkelerin östrojenik madde içeren bitkileri diyetlerinde bulundurmalarından kaynaklandığı düşünülmüştür⁷⁵.

2.3.3.2. Kemoprotektif etki

Yapılan bir çalışmada, erken dönem meme kanseri tanısı yeni konulan kadın hastalardan, herhangi bir tedavi uygulanmadan önce 72 saatlik idrar ve kan örnekleri alınmıştır. İdrar örnekleri içerdikleri

izoflavon fitoöstrojenler (daidzein, genistein, ekuol) ve lignanlar (enterodiol ve enterolakton) bakımından analiz edilmiştir. Menarj yaşı, alkol ve total yağ alımı gibi faktörler belirlendikten sonra elde edilen bulgular, yüksek miktarda ekuol ve enterolakton atılımının, meme kanseri riskinde anlamlı azalmaya neden olduğunu göstermiştir⁸⁹.

Yapılan birçok çalışma ile genistein'in kanserli dokuda vaskülarizasyonu önlediği ve böylece tümör gelişimini sınırladığı gösterilmiştir. Menstrual siklusu kısa süren kadınlar arasında meme kanseri riski daha yüksek olup günde 45 mg izoflavon tüketen kadınların foliküler dönemlerinin 2.5 gün daha uzun olabildiği ve böylece izoflavonların meme kanseri riskini azaltabileceği belirtilmiştir⁹⁰.

Vejeteryan olmayan, 21-29 yaş arasındaki 6 sağlıklı kadın üzerinde yapılan bir çalışmada, bireyler iki gruba bölünmüştür. Bir gruba izoflavon içeriği yüksek olan soya proteini (45 mg izoflavon), diğer gruba izoflavon içeriği daha düşük olan diyet verilmiştir. İzoflavon bakımından zengin diyet tüketen grupta menstrual siklusun 1-5 gün uzadığı gözlenmiştir. Her iki grupta ovülasyonun yaklaşık 3. gününde foliküler fazda ve luteal fazda, plazma estradiol konsantrasyonu ölçülmüştür. İzoflavon bakımından zengin diyet tüketen grupta, menstrual siklusun foliküler fazında estradiol düzeyinin belirgin olarak arttığı gözlenmiştir. Bununla birlikte menstrual siklusun ortalarında luteal fazda, iki grup arasında önemli bir fark görülmemiştir. Çalışma sonucunda menstrual siklusun ve kısmen foliküler fazın uzaması nedeni ile izoflavonların meme kanseri riskinin azalmasında etkili olabileceği belirtilmiştir⁹¹.

Yapılan birçok epidemiyolojik çalışma ile Batı Yarımkürede çoğunlukla hormon bağımlı kanserlerin görülmesinin, alınan diyet ile olan ilişkisi araştırılmıştır. Elde edilen bulgular doğrultusunda, diyetinde yüksek

düzeyde fitoöstrojen bulunan toplumlarda kanser sıklığının düşük olduğu ve fitoöstrojenlerin kemoprotektif etkisi olabileceği belirtilmiştir¹⁰.

Yapılan epidemiyolojik çalışmalar sonucunda, kolon kanserinin Amerika'da en yaygın görülen ikinci kanser türü olduğu tespit edilmiştir. Erkeklerde birinci sırada akciğer kanseri, kadınlarda ise meme kanseri yer almaktadır. Hormon düzeyinin kolon kanseri ile kuvvetli ilişkisi olmadığı ancak, başka muhtemel mekanizmalarla etiyojisinde rol oynadığı bilinmektedir. Genistein tarafından indüklenebilir nitritoksit sentezinin bastırılması, etin sindirilmesi sırasında oluşan endojen N-nitrozasyonunun izoflavonlar tarafından inhibe edilebileceğini ve kolon kanserinin önlenmesinde etkili olabileceğini düşündürmüştür⁷⁵.

Hormon bağımlı kanser sıklığında doğu ile batı arasında görülen epidemiyolojik farklılıkların, kısmen Asya'da tüketimi daha fazla olan fitoöstrojenlerle ilişkili olduğu belirtilmiştir. Yüksek miktarda pirinç, soya ürünleri, balık ve sebze ile beslenen Japonlarla yapılan bir çalışmada, gaz kromatografisi-kütle spektrometrisi (GC-MS) yöntemi ile 10 kadın ve 9 erkekte enterolakton, enterodiol, daidzein, ekuol, o-desmetilangolesin'in idrarda atılan miktarı ölçülmüştür. Lignanların atılım oranı düşük iken, izoflavonoidlerin miktarı yüksek bulunmuştur. Çalışma sonucunda, meme kanserinden ölümlerin düşük olmasının, soya ürünlerinin yüksek oranda tüketimi ile ilgili olabileceği bildirilmiştir⁹².

2.3.3.3. Kardiyovasküler sistem üzerine etki

Arteriyel uyum önemli bir kardiyovasküler risk faktörü olarak görülmekte ve bu uyumun menopoza birlikte azalarak sistolik hipertansiyona yol açtığı ve sol ventrikülün çalışma yükünü arttırdığı bilinmektedir. Yapılan bir çalışmada menopoza döneminde artan bu kardiyovasküler riskin, izoflavon alınmasıyla azaltılabilme ihtimali

araştırılmıştır. 40 mg ve 80 mg/gün doz uygulanarak, 17 kadındaki arteriyel uyum ölçülmüştür. 5 haftalık plasebo döneminin ardından, 5 haftalık tedavi döneminde, basınç (karotid arter) ve hacim (aorta akış) ilişkisi ultrason ile ölçülerek her dönem sonrasında arteriyel uyum saptanmıştır. Plazma lipitleri her dönemde iki kez ölçülmüş, izoflavonların idrarla atılım miktarı da tespit edilmiştir. Çalışmada 3 kadın plasebo kontrol olarak yer almış, diğer kadınlar ise 5 hafta süresince, sırasıyla önce 40 mg daha sonra 80 mg izoflavonlar ile tedavi edilmiştir. Arteriyel uyum; 80 mg dozda, plaseboya göre % 23 oranında artmıştır. 40 mg dozda ise, 80 mg doza oranla az miktarda daha düşük bulunmuştur (plasebo, 19.7 ± 1.5 , 40 mg 23.7 ± 0.7 , 80 mg, 24.4 ± 1.4). Plazma lipitlerinin ise belirgin olarak değişmediği gözlenmiştir. Bu çalışma sonucunda izoflavon tedavisi, menopoz sonrasında kardiyovasküler fonksiyonların iyileşmesi için potansiyel yeni bir terapotik yaklaşım olarak değerlendirilmiştir⁹³. Başka bir çalışmada ise, premenopoz dönemde olan 14 sağlıklı kadına 2 menstrual siklus boyunca 86 mg/gün izoflavon, takip eden 2 menstrual siklus boyunca da plasebo verilmiştir. Çalışmanın sonucunda LDL oksidasyonu, total kolesterol veya trigliserit seviyelerinde herhangi bir değişiklik olmaz iken, HDL-3 seviyesinde artış gözlenmiştir⁹⁴.

Kardiyovasküler bir hastalığı bulunmayan ve en az bir yıldır postmenopozal dönemde olan 13 kadın üzerinde çift kör, plasebo kontrollü bir çalışma yapılmıştır. Birinci grup 5 hafta boyunca plasebo, ikinci grup 5 hafta süresince 1 tablet Promensil®, üçüncü grup ise 5 hafta 2 tablet Promensil® almıştır. Çalışma sonucunda, Promensil® alan grupta ana arterlerin elastikiyeti plasebo gruba göre artarken, iki doz grubu arasında herhangi bir farkın olmadığı tespit edilmiştir. Plazma lipid seviyelerinde ise herhangi bir fark olmadığı gözlenmiştir⁹³.

Bir başka çalışma da, postmenopozal dönemdeki 46 kadına genistein, daidzein, formononetin ve biokanin A içeren preparat

(Rimostil®), tek kör plasebo ve arınma dönemleri arasında, çift kör olarak verilerek fitoöstrojenlerin değişik dozlarının lipid metabolizması üzerindeki etkileri incelenmiştir. Hastalar rastgele ayrılarak, 6 ay boyunca 28.5 mg, 57 mg veya 85.5 mg fitoöstrojen almışlardır. Altı ayın sonunda, serum yüksek yoğunluklu lipoprotein (HDL) değerleri, artış büyüklüğü doza bağlı olmaksızın ($p=0.005$, $p=0.043$, $p=0.007$), % 15.7 ile % 28 oranında artmıştır. Aynı şekilde artış büyüklüğü doza bağlı olmaksızın ($p=0.007$, $p=0.002$, $p=0.027$), serum apolipoprotein B belirgin şekilde, % 11.5-17 oranında düşmüştür. Tüm dozlarda endometriyal kalınlık artmıştır. Ancak bir kontrol grubu eşliğinde çalışılmaması nedeni ile bu sonuçlar yorumlanırken dikkatli olunması gerektiği belirtilmiştir⁹⁵.

Postmenopozal dönemde olan ve diyet veya oral hipoglisemikle tedavi gören tip II diabetes hastası 16 kadın, rastgele, çiftkör, çapraz çalışmaya katılarak, 4 hafta boyunca günde 50 mg *T. pratense* izoflavonu almışlardır. Her tedavi dönemi sonunda, 24 saat kan basıncı kayıtları alınmış ve asetilkolin, nitroprusit ve L-nitromonometilarginin'e (L-NMMA) önkol vasküler cevap ölçülmüştür. Plasebo ile karşılaştırıldığında, günlük ortalama sistolik ve diastolik kan basıncının belirgin şekilde daha düşük olduğu görülmüştür. Ayrıca, L-NMMA'yı takiben önkol vasküler cevabındaki artışın da belirgin oranda olduğu tespit edilmiştir. Bu da bazal endotelial fonksiyonların daha iyi duruma geldiğini göstermiştir. Plazma lipoproteinleri, şekere bağlı hemoglobin, asetilkolin ve nitroprusite yanıt plaseboyla karşılaştırıldığında belirgin bir farklılık göstermemiştir. Elde edilen verilerle, menopoza sonrası tip II diyabetli kadınlarda *T. pratense* ile izoflavon takviyesinin, kan basıncını ve endotelial fonksiyonu olumlu yönde etkileyebileceği belirtilmiştir⁹⁶.

Yüksek vücut kitle indeksine sahip ve hormon tedavisi almayan 60 postmenopozal kadınla yapılan bir çalışmada, *T. pratense* kaynaklı izoflavon besin desteğinin lipid profili üzerine etkisi incelenmiştir.

Çalışmaya katılan hastalarla rastgele iki grup oluşturulmuştur. 90 günlük süreçlerle çaprazlanan hastalara, 90'ar gün boyunca günde 2 defa 80 mg *T. pratense* izoflavon kapsülü veya plasebo verilmiştir. 90 günün sonunda 7 günlük arınma dönemi bulunmaktadır. Çalışmanın 90. ve 180. günlerinde hastaların total kolesterol, trigliserit, HDL, LDL ve lipoprotein A (LpA) seviyeleri ölçülmüştür. Yapılan çalışma sonucunda *T. pratense* kaynaklı izoflavon besin desteğinin özellikle yüksek vücut kitle indeksine sahip postmenopozal kadınlarda total kolesterol, LDL ve LpA seviyelerini düşürdüğü tespit edilmiştir⁹⁷.

Diğer bir başka çalışmada ise, 46 orta yaşlı erkek üzerinde izoflavonların LDL kolesterol üzerine etkileri incelenmiştir. Bireylere 6 hafta boyunca, formononetin veya biokanın A bakımından zengin *T. pratense* izoflavonlarından oluşan 2 karışım verilmiştir. Biokanın A içeriği zengin olan karışımı kullanan erkeklerde LDL kolesterol değerinin önemli oranda düştüğü tespit edilmiştir⁹⁸.

Yapılan araştırmalar ile Asya toplumlarında Batı diyeti tüketenlere göre kardiyovasküler hastalık oranının daha düşük olduğu görülmüştür. Amerikan ve Japon toplumları karşılaştırılarak 40-69 yaş arası erkek ve kadınlarda kardiyovasküler hastalık görülme oranının; erkeklerde 6 kat, kadınlarda 8 kat daha düşük olduğu gözlenmiştir. Bunun nedeninin yüksek soya izoflavonu içerikli diyet tüketiminden kaynaklandığı tespit edilmiştir⁹⁰.

2.3.3.4. Kemik mineral yoğunluğu üzerine etki

Postmenopozal dönemdeki 46 kadına genistein, daidzein, formononetin ve biokanın A içeren preparat (Rimostil®), tek kör plasebo ve arınma dönemleri arasında, çift kör olarak verilerek fitoöstrojenlerin değişik dozlarının kemik metabolizması üzerindeki etkileri incelenmiştir. Hastalar,

rastgele ayrılarak 6 ay boyunca 28.5 mg, 57 mg veya 85.5 mg fitoöstrojen almışlardır. Altı ayın sonunda, proksimal radius ve dirsek kemiğinde kemik mineral yoğunluğunun 57 mg/gün dozda % 4.1 oranında ($p=0.002$), 85.5 mg/gün dozda % 3 oranında ($p=0.0239$) arttığı, 28.5 mg/gün dozda ise anlamlı bir artış olmadığı saptanmıştır. Ancak bir kontrol grubu eşliğinde çalışılmaması nedeni ile bu sonuçlar yorumlanırken dikkatli olunması gerektiği belirtilmiştir⁹⁵.

Kemik mineral yoğunluğunda ve lumbal spin kemik mineral içeriğindeki kayıp 12 ay süreyle izoflavon verilen randomize, çift kör, plasebo kontrollü bir çalışmada belirgin ölçüde azalmıştır. Yaşları 49 ile 65 arasında olan 177 kadının katıldığı bu çalışmada, 86 kişiye *T. pratense* ekstresi ihtiva eden tablet (26 mg biokanin A, 16 mg formononetin, 1 mg genistein ve 0.5 mg daidzein) ve 91 kişiye de plasebo 12 ay süreyle verilmiştir. İzoflavon alan kadınların kemik mineral yoğunluğu ve lumbal spin kemik mineral içeriğindeki kayıp plasebo ile karşılaştırıldığında azalmış (sırasıyla $p=0.03$ ve $p=0.04$) olarak bulunmuştur. Kemik oluşum markırları olan kemik spesifik alkalın fosfataz ve kollajen tip I N-propeptit tedavi alan grupta plaseboya göre belirgin derecede artmıştır (sırasıyla $p=0.04$ ve $p=0.01$)⁹⁹.

İtalya'da 3 üniversitenin medikal merkezlerinde 389 postmenopozal kadın ile yapılan randomize, çift kör, plasebo kontrollü bir çalışmada, gönüllülerin kemik mineral yoğunluğu ölçülmüştür. Deneklere plasebo ve genistein içerikli tablet uygulanmıştır. Plasebo ve genistein tabletlerinin her ikisinde ayrıca kalsiyum ve D vitamini içermektedir. Genistein alan gönüllülerde kemik alkalın fosfataz seviyesinin ve insülin benzeri büyüme faktörünün yükseldiği, endometrium kalınlığında bir değişim olmadığı saptanmıştır¹⁰⁰.

Çift kör, plasebo kontrollü yapılan diğer bir çalışmada, 45-57 yaş arasında postmenopozal 90 kadında, hormon replasman tedavisi (HRT) ve plasebo ile karşılaştırmalı olarak, genistein'in kemik metabolizmasına ve kemik yoğunluğuna etkisi incelenmiştir. HRT (17 β -östradiol 1 mg+ noretisteron) uygulanan grup ile 54 mg/gün genistein verilen grubun femoral eklemden kemik mineral yoğunluğu 12 ay boyunca izlenmiştir. Genistein verilen grubun femoral eklemden ve femurward bölgesinde kemik mineral yoğunluğunun HRT uygulanan gruba göre daha yüksek olduğu, plasebo verilen grupta ise her iki gruba göre daha düşük olduğu görülmüştür. Lumbarspin kemik mineral yoğunluğunun HRT uygulanan grupta, genistein verilen gruba oranla daha yüksek olduğu gözlenmiştir. Her üç grupta da rutin biyokimya, karaciğer fonksiyonları ve hemotolojik değerlerde anlamlı bir değişiklik olmamıştır. Postmenopozal kadınlarda serum osteokalsin (kemik gla proteini, BGP) ve alkalen fosfataz düzeyleri plasebo verilen grupta değişmezken, HRT uygulan grupta düşüş olduğu, genistein verilen grupta ise arttığı gözlenmiştir. Çalışma sonucunda genistein'in kemik mineral yoğunluğunu artırarak, osteoporoz'un önlenmesinde HRT'ne alternatif olabileceği belirtilmiştir¹⁰¹.

2.3.3.5. Prostat hiperplazisi ve prostat kanseri üzerine etki

Prostat kanseri sıklığında doğu ile batı arasında görülen epidemiyolojik farklılıkların, kısmen Asya'da tüketimi daha fazla olan fitoöstrojenlerden kaynaklandığı düşünülmektedir. Yüksek miktarda pirinç, soya ürünleri, balık ve sebze ile beslenen Japonlarla yapılan bir çalışmada, gaz kromatografisi-kütle spektrometrisi (GC-MS) yöntemi ile 10 kadın, 9 erkekte enterolakton, enterodiol, daidzein, ekuol, o-desmetilangolesin'in idrarda atılan miktarı ölçülmüştür. Lignanların atılım oranı düşük, izoflavonoitlerin miktarı ise yüksek bulunmuştur. Elde edilen bulgular doğrultusunda, prostat kanserinden ölümlerin düşük olmasının,

soya ürünlerinin yüksek oranda tüketiminden kaynaklabileceği bildirilmiştir⁹².

Yöresel gıdalarla beslenen Portekizli, Çinli ve İngiliz erkekler üzerinde yapılan karşılaştırmalı çalışmada, gaz kromatografisi-kütle spektrometrisi (GC-MS) ile plazma ve prostat sıvısındaki lignan ve izoflavon yapısındaki fitoöstrojen konsantrasyonları ölçülmüştür. Prostat sıvısında, enterolakton miktarı, sırasıyla Hong Kong, Portekiz ve İngiltere için ortalama 31, 162, 20.3 ng/ml, daidzein miktarı ise sırasıyla 70, 4.6 ve 11.3 ng/ml olarak tespit edilmiştir. Daidzein'in plazma seviyelerinin de Hong Kong'dan gelen örnekte (31.3 ng/ml), Portekiz (1.3 ng/ml) ve İngiltere (8.2 ng/ml)'ye kıyasla çok daha yüksek olduğu görülmüştür. Enterolakton'un plazmadaki seviyesinin ise benzer olduğu saptanmıştır. (sırasıyla 6.2, 3.9 ve 3.9 ng/ml). Sonuç olarak, Hong Kong'lu erkeklerin plazma ve prostat sıvılarındaki daidzein ve ekuol konsantrasyonları daha yüksek bulunmuştur. Enterolakton ise Portekiz'den gelen örneklerde daha yüksek oranda görülmüştür. Asya ve Akdeniz ülkelerinde prostat kanserinin daha az görülmesinin bu nedenle olabileceği ve soyadaki izoflavonların prostat kanserine karşı koruyucu özelliğe sahip olabileceği belirtilmiştir¹⁰².

Cerrahi müdahale ve ilaç tedavisinin potansiyel riskinin, yan etkilerinin ve gıda takviyelerinin prostat sağlığına potansiyel faydalarının anlaşılması nedeniyle, doğal tedavileri tercih eden benign prostat hiperplazisi (BPH) hastalarının sayısı sürekli artmaktadır. *T. pratense* ekstresinin, diğer bitki ekstrelerine göre 4 ana izoflavon (genistein, daidzein, formononetin ve biokanin A) içerdiği, aglikon izoflavonların reseptör seviyesinde aktif olduğu bildirilmiştir. *T. pratense* ekstrelerinin BPH belirtilerini azalttığı yönünde çalışmalar olduğu ve iyi tolere edildiği belirtilmektedir¹⁰³.

Yapılan bir kontrol çalışmasında, 97 Benign prostatik hiperplazi (BPH) ve 97 prostat kanser hastası olan, toplam 194 erkek üzerinde serumdaki daidzein, genistein ve enterolakton seviyeleri floroimmünoassay yöntemi ile tayin edilmiş ve paralel olarak serum endokrin çalışması da yapılmıştır. Değerler BPH hastalarında daha yüksek bulunmasına rağmen, istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Fitoöstrojenler ile prostat spesifik antijen (PSA), luteinleştirici hormon (LH), total testosteron ve östradiol arasında korelasyon olmadığı gözlenmiştir. Ancak, daidzein ($p=0.019$), genistein ($p=0.002$) ve tüm fitoöstrojenlerin toplamı ($p=0.005$), folikül stimüle edici hormon (FSH) ile pozitif olarak ilişkili bulunmuştur. Bu veriler, fitoöstrojenlerin, prostat kanseri patojenezinde etkili olduğunu ve prostat hiperplazisini önlemedeki potansiyelini göstermiştir. FSH ve fitoöstrojenler arasındaki yakın ilişki, potansiyel bir dengeleme mekanizması olduğunu belirtmektedir¹⁰⁴.

Prostat biyopsisinde yüksek PSA ve prostatik intraepitelyal neoplazma (PIN) seviyeleri saptanan 12 hasta ile izoflavonların uzun süreli kullanımda prostat, hormon seviyeleri, cinsel fonksiyon ve karaciğer fonksiyonlarına etkisi incelenmiştir. Hastalara 6 ay boyunca günde 160 mg *T. pratense* izoflavon ekstresi verilmiştir. Başlangıçta ve her üç ayda bir PSA, total testosteron, östrojen, LH, FSH, dehidroepiandrosteron sülfat (DHEA-s), karaciğer transaminazları (GOT, GPT, gGT), transrektal prostat volumetrisi, uluslararası prostat semptom skoru (IPSS) ile incelenmiştir. Ortalama PSA seviyeleri, başlangıçta 3. ve 6. aylarda sırasıyla, 7.7 ng/ml, 6.9 ng/ml ve 6,5 ng/ml (-% 10) bulunmuştur. Prostat hacminde 6 aydan sonra küçük bir azalma (-% 6) görülmüş, tüm seks hormonlarında düşüş tespit edilmiştir. Testosteron % 5, DHEA-s, % 25, östrojen, % 30, LH % 5, FSH % 30 oranlarında düşmüştür. Tüm transaminazlar 3 ve 6 aydan sonra artmış, IPSS 6 aydan sonra % 15 gerilemiştir. Cinsel fonksiyonlarda bir değişiklik görülmezken, ortalama hayat kalitesinin, IPSS anketlerinden

alınan cevaplar doğrultusunda, 6 aydan sonra daha iyiye gittiği saptanmıştır¹⁰⁵.

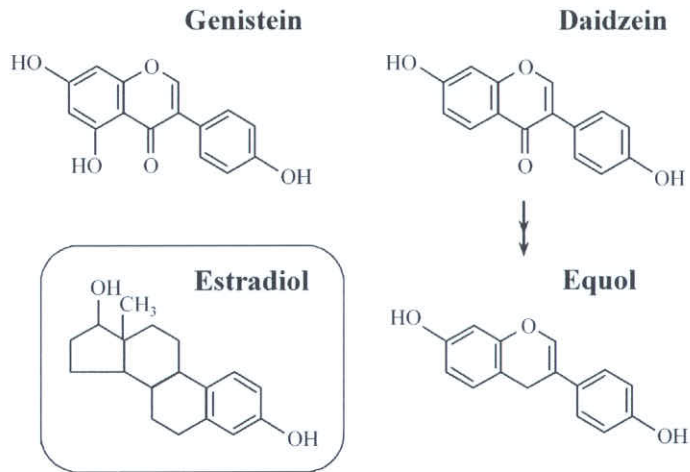
2.3.3.6. Dermatolojik Etkileri

Soya izoflavonu olan genistein'in, kuvvetli antioksidan özelliğe sahip olduğu bilinmektedir. Yapılan araştırmalar insan derisinde UV radyasyonla indüklenmiş eritem oluşumunu ve fotoyaşlanmayı engelleyebileceğini göstermiştir. Ayrıca genistein'in derideki östrojen reseptörlerine bağlandığı ve östrojen eksikliği ile oluşan deri yaşlılığı belirtilerini de azaltabileceği bildirilmiştir. Bu bilgiler doğrultusunda kozmetik üreticileri soyadan elde edilen ekstraktları cilt bakım ürünlerinde kullanmaya yönelmişlerdir. Ancak genistein'in yağda ve suda çözünürlüğünün az olması nedeniyle, özel bir taşıyıcı sistem içinde hazırlanarak deri yüzeyine uygulanması gerekmektedir. Yapılan bir çalışmada, genistein'in lipozomu hazırlanmış ve kadın denekler bu ürünü 3 ay boyunca kullanmışlardır. Genistein içeriği % 0.0099 oranında olan lipozomun, deri kalınlığında % 11 oranında artışa neden olduğu görülmüştür^{106,107}.

PUVA (psoralen ultraviyole A) tedavisi yaygın olarak dermatolojide psöriazis, vitiligo, kutanöz T lenfoma ve diğer inflamatuvar dermatozlarda uygulanan bir yöntemdir. Fakat bununla birlikte yapılan klinik çalışmalarda PUVA tedavisinin skuamöz hücre karsinomu ve malign melanoma sebep olduğu belirgin olarak saptanmıştır. Genistein'in topikal uygulamasında PUVA ile indüklenmiş kutanöz hasar morfolojik ve histolojik olarak incelenmiştir. Yapılan çalışmalarda, genistein'in PUVA'dan kaynaklanan fotohasara karşı deriyi koruduğu ve kemoprotektif ajan olarak insanlarda PUVA tedavisi nedeni ile oluşabilecek cilt kanseri riskini önlediği tespit edilmiştir⁸¹.

2.3.4. Biyotransformasyon

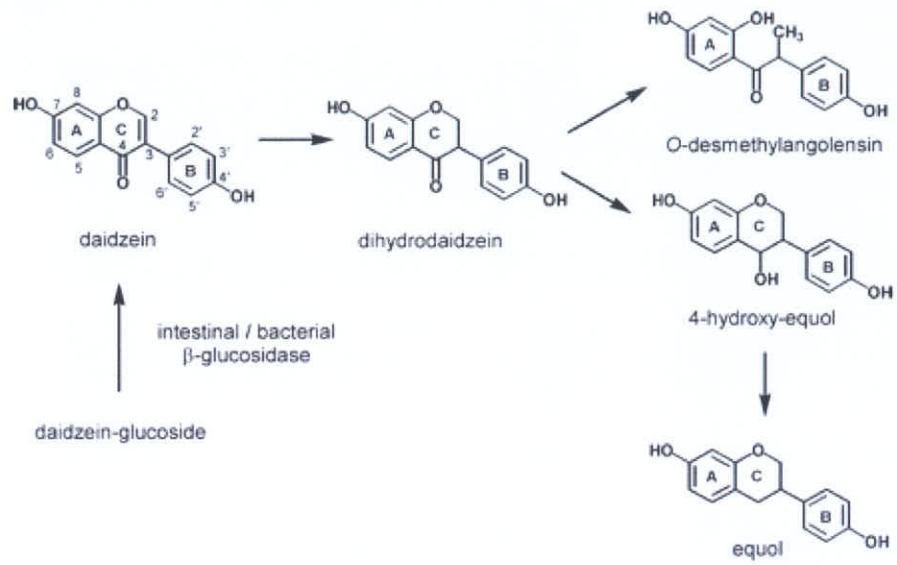
İzoflavonlar ihtiva eden gıdaların tüketimi faydalı etkilerinin belirlenmesi ile artış göstermiştir. *T. pratense*'de izoflavon glikozitleri içermektedir, bunlar; formononetin, biokanin A ve daha az oranda daidzein ve genistein glikozitleridir. Bu glikozitler, insan vücudunda hidroliz olarak aglikonlarına dönüşür, böylece formononetin ve biokanin A, daidzein ve genistein'e metabolize olur. Daidzein, barsaktaki mikroorganizmalar tarafından daha güçlü östrojenik etkiye sahip olan ekuol'e metabolize olur (Şekil 9)¹⁰⁸.



Şekil 9: Daidzein'in biyotransformasyonu.

T. pratense'nin içerdiği izoflavonlar östrojen reseptör alfa (ER α), östrojen reseptör beta (ER β), androjen reseptör (AR) ve progesteron reseptör (PR)'lere karşı afinite gösterirler. Sindirim esnasında farklı metabolik dönüşümler geçirirler. İzoflavonoit metabolitlerinin sağlığa faydalı etkilerinin incelendiği bir çalışmada, biokanin A, formononetin, genistein, daidzein, dihydrobiokanin A, dihydroformononetin,

dihydrogenistein, dihidrodaidzein, 3'-hidroksigenistein, 6-hidroksidaidzein, 6-hidroksidesmetilangolensin, ekuol, o-desmetilangolensin, angolensin ve p-etilfenol bileşiklerinin mayadaki ER α , ER β , AR ve PR'e karşı transaktivasyon potensleri test edilmiştir. Bileşikler AR ve PR'e karşı zayıf afinite göstermiştir. Ekuol izoflavonların faydalı etkilerinden sorumlu olan bileşik olarak bilinmektedir. Bu çalışmaya göre diğer metabolitlerin de etkiden sorumlu olabilecekleri düşünülmüştür (Şekil 10)¹⁰⁹.



Şekil 10: Daidzein'in ana metabolitleri.

2.3.5. Preparatları

Ülkemizde satılan Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı'ndan izinli gıda takviyesi statüsündeki *T. pratense* ekstresi veya izoflavon ihtiva eden ticari preparatlar aşağıda verilmiştir:

Denoxinal: Bu tabletler, *Chlorella pyrenoidosa* (200 mg), Dandelion (*Taraxacum officinale*) (extract 4:1-50 mg) (12.5 mg), Garlic (*Allium sativum*) (1.0 mg), Milk Thistle (*Silybum marianum*) (contains silybin- 42 mg) (50.0 mg), Burdock (*Arctium lappa*) (extract 4:1-50 mg) (12,5 mg),

Red Clover (*Trifolium pratense*) (extract 4:1-50 mg) (12.5 mg), pektin (50 mg), C vitamini (200 mg). Günlük 1 tablet kullanılması önerilmiştir¹¹⁰.

Black Cohosh & Soy Isoflavones extract: Black Cohosh (*Simisifuga*) ekstresi, *Cimicifuga racemosa* (% 2.5 triterpenoit saponin); 200 mg, soya fasülyesi ekstresi (% 40 izoflavonlar); 200 mg içermektedir. Premenstrual sendrom ve menopoz semptomlarını azaltmaya yardımcı olur. Levotiroksin, tamoksifen ve varfarin ile ayrı ayrı birlikte alındığında bu maddelerin etkinliklerini azaltabileceğinden kullanımına dikkat edilmesi gerekir. Demir ile birlikte alındığında, demirin emilimini azaltabileceği için aynı anda kullanılması tavsiye edilmez. Meme kanseri olan hastaların hekim kontrolünde kullanması tavsiye edilir. Gıda takviyesi olarak günde 2 defa 1 kapsül önerilmektedir¹¹¹.

Soy isoflavones extract: soya fasülyesi ekstresi (% 40 izoflavonlar) 100 mg içermektedir. Menopoz semptomlarını azaltmaya yardımcı olur. Levotiroksin, tamoksifen ve varfarin ile ayrı ayrı birlikte alındığında bu maddelerin etkinliklerini azaltabileceğinden kullanımına dikkat edilmesi gerekir. Demir ile birlikte alındığında, demirin emilimini azaltabileceği için aynı anda kullanılması tavsiye edilmez. Meme kanseri olan hastaların hekim kontrolünde kullanması tavsiye edilir. Gıda takviyesi olarak günde 2 veya 3 kapsül önerilmektedir¹¹¹.

Black Cohosh Root Extract plus: standardize black cohosh ekstresi (triterpen glikozitleri; 5 mg [% 2.5]) 200 mg, black cohosh kök tozu 200 mg, soya izoflavon konsantresi (izoflavon 6 mg [% 3]) 200 mg. Premenstrual sendrom ve menopoz semptomlarını azaltmaya yardımcı olur. Hamilelik ve emzirme dönemlerinde black cohosh alınması tavsiye edilmez. Günde 1-2 kapsül önerilmektedir¹¹².

Super Concentrated isoflavones with genistein and daidzein: total soya izoflavonları 38 mg içermektedir. Menopoz semptomlarını azaltmaya yardımcı olur. Hamilelik ve emzirme dönemlerinde kullanılması tavsiye edilmez. Günde 1-2 tablet önerilmektedir¹¹².

Flavoxan kapsül: izoflavon 40 mg içermektedir. Premenstrual sendrom ve menopoz semptomlarını azaltmaya yardımcı olur. Gıda takviyesi olarak günde 1-3 kapsül önerilir¹¹³.

Isoflavin tablet: soya izoflavon (genistein ve daidzein) 40 mg içermektedir. Menopoz semptomlarını azaltmaya yardımcı olur. Gıda takviyesi olarak günde 2 tablet önerilir¹¹⁴.

Phyto soya kapsül: soya ekstaktı (soya izoflavon 17.5 mg) 325 mg içermektedir. Menopoz semptomlarını azaltmaya yardımcı olur. Göğüs kanseri riski olan kişiler veya tedavi altındaki hastalar kullanmamalıdır. Hamile ve emziren kadınların kullanımına uygun değildir. Gıda takviyesi olarak günde 2 kapsül önerilmektedir¹¹⁴.

Standardize *T. pratense* ekstrelerini içeren **Avrupa'da satılan** preparatları şöyledir: Promensil, Rimostil, Trinovin, Climadil, Menoflavon, Isoflavones, Red Clover, Rotklee Tablets, Rotklee Activ Tablets, Dr.Böhm Isoflavone Dragees (*Trifolium pratense* ve *Glycine max*)¹¹⁵.

2.3.6. Standardizasyon

T. pratense'nin etanollü ekstreleri % 15 oranında izoflavon (100 g total ekstrede 15 g izoflavon) ihtiva edecek şekilde standardize edilmektedir. İzoflavonların % 0.87'si genistein, % 0.35'i daidzein, % 6.44'ü biokanin A ve % 8.67'si formononetin olarak tespit edilmiştir¹¹⁶.

2.3.7. Kullanım dozu

T. pratense ekstreleri tablet, kapsül gibi galenik preparatlar halinde kullanılmaktadır. Her doz total 40 mg total izoflavon içerecek şekilde standardize edilmiştir ve bileşiminde 4 mg genistein, 3.5 mg daidzein, 24.5 mg biokanin A ve 8 mg formononetin içermektedir. Menopoz şikayetleri için günlük 40-160 mg (1-4 tablet) önerilmektedir^{82,83,117}.

Yapılan bir çalışmada; menopoz sonrası kemik kaybını önlemek için hormon replasman tedavisine alternatif olarak önerilen izoflavonların, kullanımı ve güvenli doz aralığı incelenmiştir. Günlük 50 mg izoflavon dozunun uygun olacağı tespit edilmiştir. Bu doz sınırının vücut ağırlığına göre 2 mg/kg'a kadar çıkarılabileceği de belirtilmiştir⁷⁶.

2.3.8. Yan Etkileri

Trifolium türleriyle beslenen hayvanların doğurganlığının azalması bu türler üzerinde araştırmalar yapılmasına neden olmuştur. Yeni doğan sıçanlara 2 g kurutulmuş *T. pratense* (20-50 mg izoflavon) verilmesinin, uterus kalınlığında 2.5-3 kat artışa sebebiyet verdiği ve serum östrojen seviyesini üreme fonksiyonlarında önemli bozukluklara yol açacak düzeyde yükselttiği bulunmuştur. *T. pratense* ile uzun süre beslenen koyunlarda yonca hastalığı adı verilen kalıcı infertilite bulguları saptanmıştır. Östrojenik yanıtın artmasına bağlı olarak serviks ve uterus dokuları ile salgılarında değişimler olduğu, ovulasyon ve hormonal dengenin bozulduğu bildirilmiştir¹¹⁸.

Erkeklerde doğal östrojenlerin üreme sisteminin gelişimi ve işlevlerinin sürdürülmesinde önemli rol oynaması nedeni ile *T. pratense* bitkisinin östrojenik etkinliğinin, spermatogenezis ve sperma parametreleri

üzerindeki etkileri incelenmiştir. Yapılan çalışmada, 74 erkek fare 3 gruba ayrılarak, plasebo veya % 20 ya da % 40 oranında *T. pratense* içerikli diyet verilmiştir. *T. pratense* içerikli diyet verilen gruplarda spermatozoaların motilite bozukluğu ve morfolojik yönden değişimleri gözlenmiştir. Çalışma sonucunda *T. pratense*'nin sperma parametrelerinin olumsuz yönde etkilediği ve spermatogenezisin bozulmasına neden olduğu saptanmıştır¹¹⁸.

Genistein'in tek seferde 16 mg/kg dozda alınmasının, 6 vakanın ikisinde lökopeniye sebep olduğu bildirilmiştir. Kısa süreli alımında ise bileşiğin kan lipaz değerleri üzerinde değişikliklere ve hipofosfatemiye sebep olduğu gözlenmiştir⁷⁶.

Postmenopoz evresinde olan, rastgele seçilen, 252 kadın ile Promensil® (günde 82 mg), Rimostil® (günde 57 mg) veya plasebonun etkisinin 12 hafta boyunca izlendiği bir çalışma yapılmıştır. Bu çalışmanın sonucunda Promensil® ve Rimostil® alan gruplarda plaseboya göre, daha yüksek oranda soğuk algınlığı veya üst solunum yolu enfeksiyonu, baş ağrısı, miyalji, artralji ve mide bulantısı görüldüğü bildirilmiştir⁸⁵.

2.3.9. İlaç etkileşimleri

Antikoagülanlar, trombolitik ajanlar ve düşük molekül ağırlıklı heparinler ile beraber kullanıldığında kanama artabilir. Bu ilaçlarla beraber kullanımından kaçınılmalıdır⁶. Terapötik indeksi dar olan varfarin için muhtemel etkileşimler önemli olduğundan, pek çok bitkisel ilaçla etkileşimleri incelenmiştir. Red clover, birlikte kullanıldığında kanama riskini ve varfarinin etkisini arttıran bitkiler arasında yer almaktadır¹¹⁹.

Kontraseptifler: Kontraseptif etkide veya yan etkilerde artma gözlenebilir⁶.

Progesteron: Beraber kullanıldığında etkisi azalabilir⁶.

Tamoksifen: Hayvan verileri tamoksifen'in etkinliğinin azaldığını göstermiştir⁶.

2.3.10. Kontrendikasyonları

İzoflavonların fetüs üzerine etkileri ve güvenilirliği ile ilgili çalışma bugüne dek yapılmamıştır. Günlük diyetle yüksek miktarda (30-100 mg) izoflavon tüketiminin, fetüs anomalileri üzerine etkisi ile ilgili yapılan epidemiyolojik çalışma bulunmamaktadır. Sadece çok yüksek dozlarda genistein hamile farelere gebeliğin 16-20 günlerinde verilmiş ve çalışma sonucunda anogenital mesafenin azalması, doğumda düşük kilo, ergenliğin başlamasının gecikmesi gibi olumsuz etkiler tespit edilmiştir. Yapılan bu çalışmada doğuma, ölü doğum oranına ve yeni doğanda hipofizin gonadotropin serbestleştirici hormona (GnRH) yanıtına ait bir etki bulunmamakla beraber, bu konuda kesin bulgular olmadığından izoflavon preparatlarının hamilelikte ve laktasyonda kullanılmaması gerektiği belirtilmiştir¹²⁰.

3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Bitkisel Materyal

Deneysel çalışmalarımızda bitkisel materyal olarak kullanılan *Trifolium longidentatum* Nábëlek doğal olarak yetiştiği bölgeden çiçekli evresinde toplanmıştır. Toplanan bitki teşhis edildikten sonra, gölgede kurutulmuştur. Deneysel çalışmalarda toprak üstü kısımları çalışılacağı zaman toz edilerek kullanılmıştır.

Materyallerden hazırlanan herbaryum örnekleri, Gazi Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Herbaryumu'nda (GAZI) muhafaza edilmektedir.

Bitkisel materyalin toplandığı lokalite şöyledir:

Trifolium longidentatum Nábëlek

B9 Van: Çatak, Kıyıcak köyü, Kato dağı, Lisek tepesi kuzey yamaçları, step, 2200 m, 13.7.2003 (B.B. 2267).

* Tez çalışmalarında kullanılan bitkisel materyallerin toplanmasında ve teşhisindeki katkılarından dolayı Gazi Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü öğretim üyesi sayın Prof. Dr. Nezaket ADIGÜZEL ve Arş. Gör. Dr. Barış BANİ'ye teşekkürlerimizi sunarız.

3.1.2. HPLC Analizinde Kullanılan Standartlar

Deneysel çalışmalarımızda kullandığımız izoflavonoit standartları olan genistein, daidzein, formononetin ve biokanin A Sigma Chemical Co. (St. Louis, USA) firmasından satın alınmıştır.

3.1.3. HPLC cihazı

Gazi Üniversitesi Eczacılık Fakóltesi Analitik Kimya Anabilim Dalı Laboratuvarı'nda bulunan Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografi Cihazı (High Performance Liquid Chromatography, HPLC); Agilent Technologies 1200 model sıvı kromatografi cihazı kullanılmıştır ve piklerin alanları otomatik olarak hesaplanmıştır.

3.1.4. HPLC Analizinde Kullanılan Solvanlar

HPLC analizinde solvan olarak HPLC saflıkta metanol (Merck), analitik saflıkta asetik asit (Merck) ve HPLC saflıkta asetonitril (Sigma-Aldrich) ve kromatografik saflıkta bidistile su kullanılmıştır. Solvanlar 0.45 µm filtreden (Millipore, Milford, USA) geçirilip ultrasonik su banyosunda degaze edilmiştir.

* Tez konusunu teşkil eden *Trifolium longidentatum*'un izoflavonoit miktar tayini amacıyla Gazi Üniversitesi Eczacılık Fakóltesi Analitik Kimya Anabilim Dalı imkanlarından faydalanarak HPLC analizlerinin yapılmasına olanak sağlayan Anabilim Dalı Başkanı Sayın Prof. Dr. Nusret Ertaş ve Doç. Dr. Uğur Tamer'e teşekkürlerimizi sunarız.

3.2. Yöntemler

3.2.1. İzoflavonların HPLC ile Miktar Tayini

3.2.1.1. Ekstrelerin Hazırlanması

Trifolium longidentatum'a ait kurutulmuş ve toz edilmiş topraküstü kısımları (5.86 mg), 20 mL metanol ilave edilerek, 85 °C'ye ısıtılmış manyetik karıştırıcı üzerinde, geri çeviren soğutucu altında 30 dak refluks işlemine tabi tutulmuştur. Bu ekstre filtre kağıdından süzülerek tekrar 20 mL metanol ile 30 dak refluks işlemine tabi tutulmuştur. Elde edilen ekstre filtre kağıdından süzülerek alçak basınç altında 40°C'de kuruluğa kadar yoğunlaştırılmıştır. Hazırlanan bu ekstreden 5 mg tartılarak 100 µL DMSO da çözülmüştür ve metanol ile 2 mL' ye seyreltilmiştir. Elde edilen bu çözeltinin içerisine son konsantrasyonu 5 µg/mL olacak şekilde iç standart çözeltisi ilave edilmiştir. Hazırlanan numune 0.45 µm filtreden (Millipore, Milford, USA) süzölmüştür ve HPLC kolonuna enjekte edilmiştir. Hazırlanan ekstre bitkide bulunan serbest aglikonları ve heterozitleri taşımaktadır.

3.2.1.2. Standart Çözeltilerin Hazırlanması

Standart olarak kullanılan daidzein, genistein, formononetin ve biokanin A 2 mg tam olarak tartılmış ve 0.5 mL DMSO (Merck) ilave edilerek vortekste tamamen çözülmüştür, 9.5 mL metanol ile derişimi 200 µg/mL (Merck) olacak şekilde seyreltilmiştir. Daha sonra bu stok çözelti 20 mg/L olacak şekilde seyreltilmiştir. Stok solüsyonlar günlük olarak hazırlanıp çalışma süresince 4°C'de karanlıkta saklanmıştır. Stok çözelti 0.25, 0.5, 1.0, 2.5 ve 5.0 µg/mL olacak şekilde 5 farklı standart karışımı hazırlanarak analiz edilmiş ve ayrı ayrı kalibrasyon grafikleri elde edilmiştir. Çalışılan standart çözelti, stok çözelti 0.25, 0.5, 1.0, 2.5 ve 5.0 µg/mL olacak şekilde 5 farklı standart karışımı hazırlanarak analiz edilmiş ve ayrı ayrı kalibrasyon grafikleri elde edilmiştir. Çalışılan standart çözelti, stok çözelti 0.25, 0.5, 1.0, 2.5 ve 5.0 µg/mL olacak şekilde 5 farklı standart karışımı hazırlanarak analiz edilmiş ve ayrı ayrı kalibrasyon grafikleri elde edilmiştir. Çalışılan standart çözelti, stok çözelti 0.25, 0.5, 1.0, 2.5 ve 5.0 µg/mL olacak şekilde 5 farklı standart karışımı hazırlanarak analiz edilmiş ve ayrı ayrı kalibrasyon grafikleri elde edilmiştir.

İç standart olarak 6-metoksiflavanon kullanılmıştır. İç standartın stok çözeltisini hazırlamak için 2 mg 6-metoksiflavanon tartılmış ve 5 mL metanolde çözülmüştür. Böylece 400 µg/mL stok çözelti hazırlanmıştır. Bu stok çözeltiden son konsantrasyonu 5 µg/mL olacak şekilde farklı konsantrasyonlardaki standart çözeltilere ilave edilmiştir. Bütün dilüsyonlar 0.45 µm filtreden geçirilerek HPLC analizine hazır hale getirilmiştir. Tüm dilüsyonlar 3'er kez enjekte edilerek pik alanları saptanmış, buradan hareketle kalibrasyon grafikleri oluşturulmuş ve bitki ekstraktlarındaki miktarları hesaplanmıştır.

3.2.1.3. HPLC Yöntemi

Trifolium longidentatum örneklerinden belirli konsantrasyonlarda hazırlanan ekstraktlar HPLC ile aşağıda belirtilen koşullarda "tarafımızdan geliştirilen yeni metotla" kantitatif olarak incelenmiştir.

HPLC Analizinde Kullanılan Kromatografik şartlar:

HPLC Cihazı: Agilent Technologies 1200 model Sıvı Kromatografi sistemi

Kolon: Agilent Eclipse XDB-18 (15 cm x 4.6 mm I.D.)

Partikül büyüklüğü: 5 µm

Kolon Sıcaklığı: 25 °C

Mobil Faz: A: Metanol, B: pH:4.75, 0.1 M, asetat tamponu, C:Asetonitril, Gradient elüsyon (Tablo 1)

Detektör: UV-270 nm

Enjeksiyon Hacmi: 10µL

Analiz süresi: 30 dakika

Tablo 1: HPLC analizinde uygulanan gradient elüsyon

Zaman (dk)	Mobil Faz (%)			Akış Hızı (mL/dk)
	A(Metanol)	B(Tampon)	C(Asetonitril)	
0:00	21	58	21	1.0
13:00	21	58	21	1.0
15:00	41	38	21	1.5
30:00	41	38	21	1.5

4. BULGULAR

4.1. İzoflavonların HPLC ile Miktar Tayinine Ait Bulgular

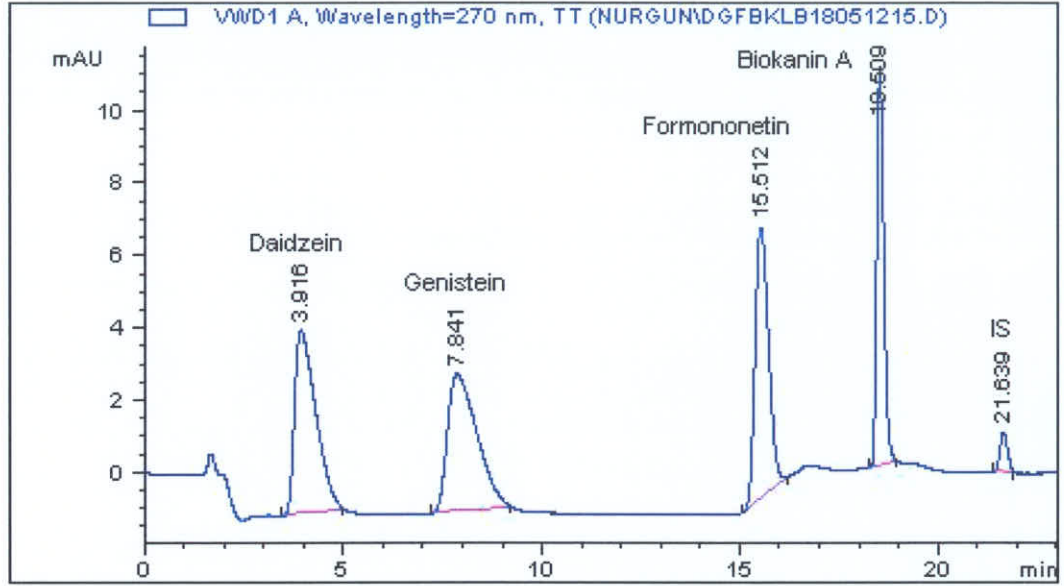
4.1.1. Kalibrasyon Eğrileri

Daidzein, genistein, formononetin ve biokanin A için 0.25 µg/mL-5 µg/mL konsantrasyonlarda, optimal dalga boyunda kromatografik alanlar okunmuş ve internal standartın alanına oranlanarak konsantrasyona karşı grafiğe geçirilerek kalibrasyon grafikleri elde edilmiştir. Standartların HPLC kromatogramı Şekil 11'de verilmiştir.

Kalibrasyon eğrilerinin hazırlanmasında standartlar için bulunan pik alanları Tablo 2-5'de ve her bir standart için elde edilen kalibrasyon grafikleri ile doğru denklemleri Şekil 12-15'de verilmiştir.

Optimal dalga boyunda daidzein, genistein, formononetin ve biokanin A kalibrasyon için iyi korelasyon katsayıları elde edilmiştir (Şekil 12-15).

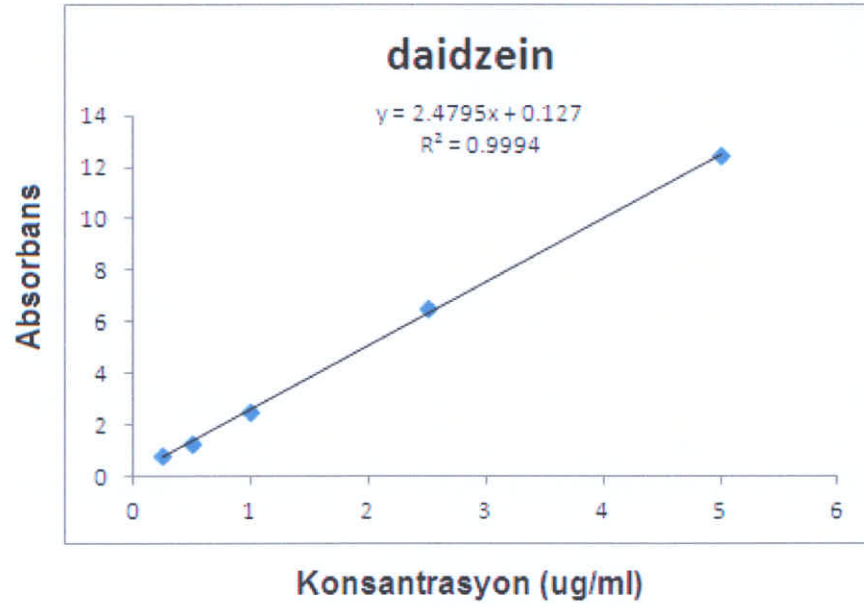
Daidzein, genistein, formononetin ve biokanin A için LOD (Limit of detection) "yakalama sınırı" ve LOQ (Limit of quantification) "tayin sınırı" değerleri hesaplanmıştır. Daidzein, genistein, formononetin ve biokanin A için LOD değerleri sırasıyla 0.11, 0.16, 0.08 ve 0.08 µg/mL olarak bulunmuştur. Daidzein, genistein, formononetin ve biokanin A için LOQ değerleri sırasıyla 0.33, 0.48, 0.24 ve 0.24 µg/mL olarak hesaplanmıştır.



Şekil 11: Standart daidzein, genistein, formononetin, biokanin A ve 6-metoksiflavonon (IS)'un HPLC kromatogramı

Tablo 2: Kalibrasyon eğrisinin hazırlanmasında daidzein için kullanılan pik alanları

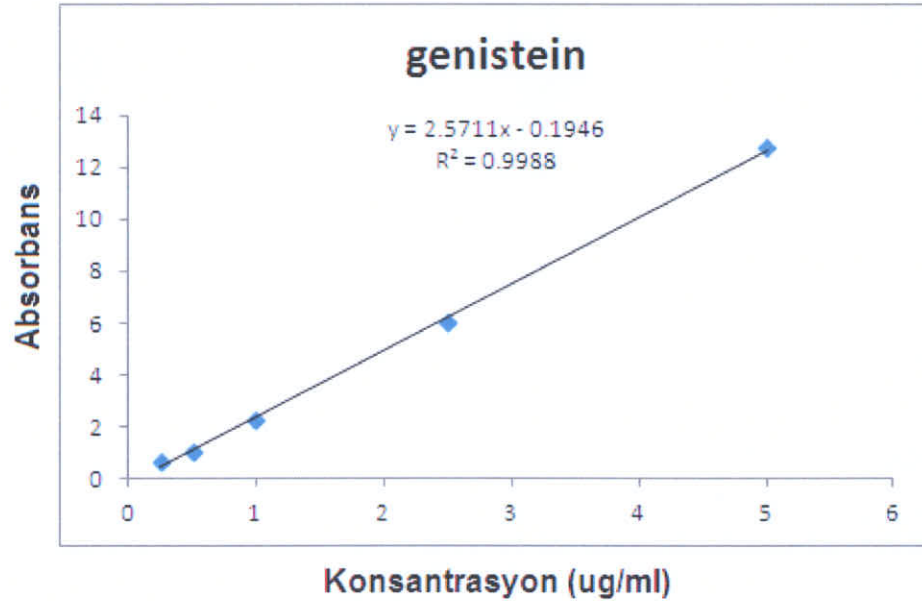
Konsantrasyon (µg/mL)	Daidzein Pik Alanı / 6-metoksi flavonon Pik Alanı (n=3)
0.25	0.81
0.5	1.28
1.0	2.52
2.5	6.5
5.0	12.46



Şekil 12: Standart daidzein kalibrasyon grafiği ve doğru denklemi

Tablo 3: Kalibrasyon eğrisinin hazırlanmasında genistein için kullanılan pik alanları

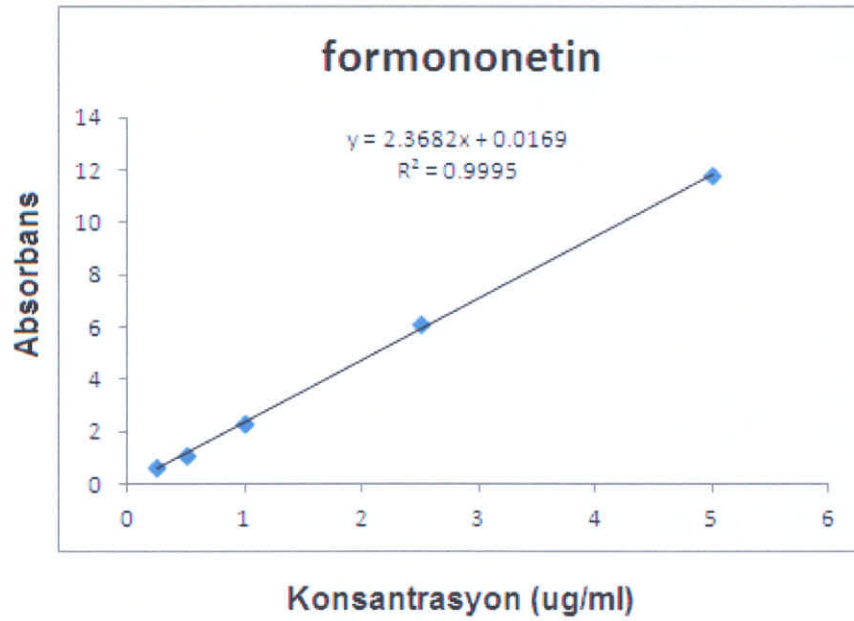
Konsantrasyon (µg/mL)	Genistein Pik Alanı / 6-metoksi flavonon Pik Alanı (n=3)
0.25	0.69
0.5	1.02
1.0	2.29
2.5	6.04
5.0	12.77



Şekil 13: Standart genistein kalibrasyon grafiği ve doğru denklemi

Tablo 4: Kalibrasyon eğrisinin hazırlanmasında formononetin için kullanılan pik alanları

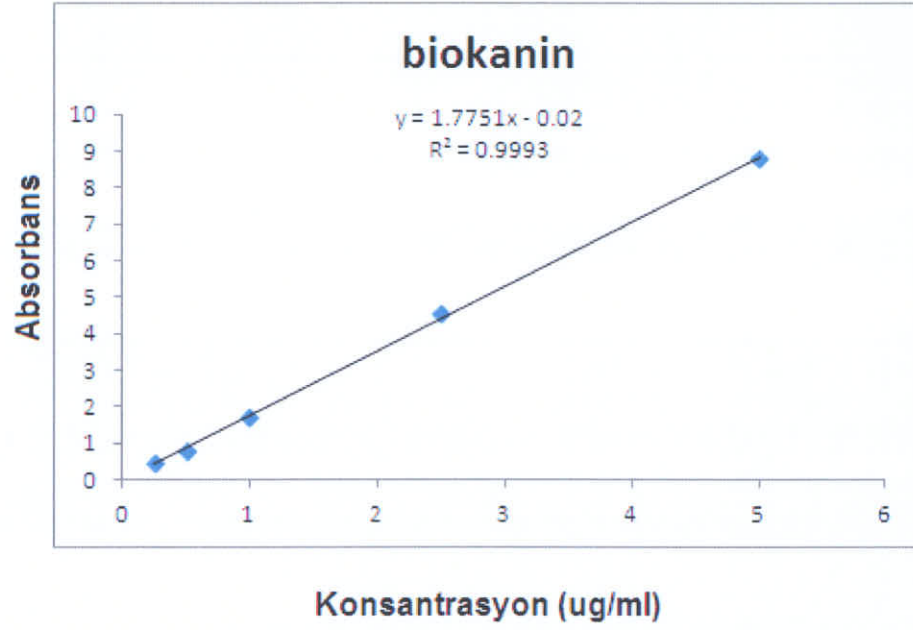
Konsantrasyon (µg/mL)	Formononetin Pik Alanı /6-metoksi flavonon Pik Alanı (n=3)
0.25	0.64
0.5	1.13
1.0	2.32
2.5	6.11
5.0	11.79



Şekil 14: Standart formononetin kalibrasyon grafiği ve doğru denklemi

Tablo 5: Kalibrasyon eğrisinin hazırlanmasında biokanin A için kullanılan pik alanları

Konsantrasyon (µg/mL)	Biokanin A Pik Alanı /6-metoksi flavonon Pik Alanı (n=3)
0.25	0.47
0.5	0.78
1.0	1.71
2.5	4.56
5.0	8.8



Şekil 15: Standart biokanin A kalibrasyon grafiği ve doğru denklemi

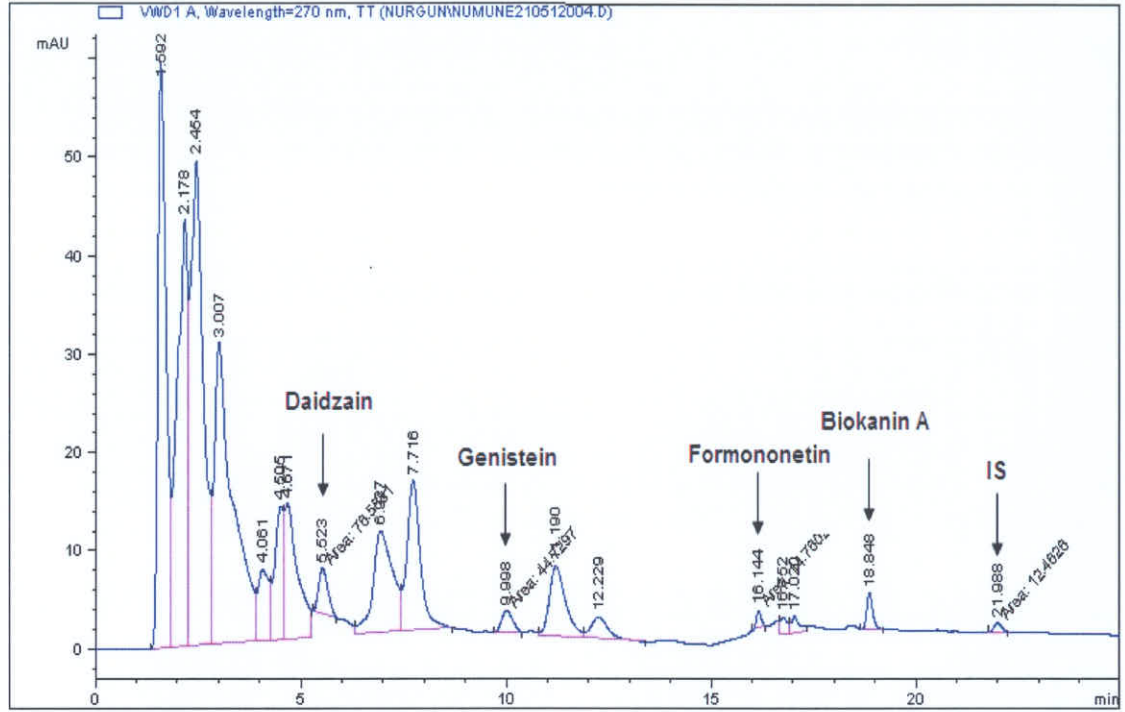
4.1.2. *Trifolium longidentatum*'daki izoflavonların HPLC ile Miktar Tayini

Trifolium longidentatum'un topraküstü kısımlarından, yöntemler kısmında belirtildiği üzere hazırlanan ekstrelerde daidzein, genistein, formononetin ve biokanin A miktarları HPLC ile belirlenmiştir. Elde edilen kromatogramdaki (Şekil 16) pik alanlarının konsantrasyonla olan ilişkisinden hareketle, standartlar ile hazırlanan kalibrasyon denklemlerinden yararlanılarak, kuru bitki örneklerindeki yukarıda bahsi geçen dört izoflavonun miktarları belirlenmiş ve Tablo 6'da verilmiştir.

Tablo 6: *Trifolium longidentatum* ekstrelerinde % daidzein, genistein formononetin ve biokanin A miktarları

Ekstre	Daidzein (Ortalama±SS)	Genistein (Ortalama±SS)	Formononetin (Ortalama±SS)	Biokanin A (Ortalama±SS)
<i>T. longidentatum</i>	0.0095±0.30	0.0056±0.24	0.0021±0.8	0.0073±0.13

* SS: Standart sapma



Şekil 16: *Trifolium longidentatum* metanol ekstresinin HPLC kromatogramı

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Trifolium pratense L. (red clover) son zamanlarda insan sağlığına faydaları bakımından ilgi gören, önemli izoflavon kaynağı bitkiler arasındadır. Taşıdığı izoflavonları nedeniyle fitoöstrojen olarak bilinen ve bu bileşikleri taşıyan standart bitki ekstralarını ihtiva eden preparatları, özellikle hormon replasman tedavisinde menopoz şikayetlerini gidermek üzere tüm dünyada yaygın olarak kullanılan *T. pratense* kanser, kalp hastalıkları ve osteoporoz'un önlenmesinde de etkileri klinik çalışmalarla kanıtlanmış olan bir bitkidir. Bitkinin taşıdığı başlıca izoflavonlar, formononetin ve biokanin A, daidzein ve genistein'dir^{7, 10,11,121}.

Bugüne kadar *Trifolium* türlerinde bulunan izoflavonların analizleri için etkili birçok kromatografik çalışma yapılmıştır^{19,28,30,122-125}. Bu çalışmada, ülkemiz florasında doğal olarak yetişen ve şimdiye kadar taşıdığı izoflavonları bakımından incelenmemiş olan *Trifolium longidentatum* Nábělek (Leguminosae) bitkisinin daidzein, genistein, formononetin ve biokanin A içeriği Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC) yöntemi ile tayin edilmiştir. Çalışmada, *T. longidentatum*'un topraküstü kısımlarından hazırlanan metanollü ekstratlerde, dört izoflavonun (daidzein, genistein, formononetin ve biokanin A) miktarları tarafımızdan geliştirilen bir yöntemin uygulandığı HPLC ile belirlenmiştir. Kromatografik ayırım metanol, asetat tamponu (pH=4.75) ve asetronitril'in mobil faz olarak gradient elüsyonla uygulandığı (Tablo 1), Agilent Eclipse XDB-18 (15 cm x 4.6 mm i.d.) ters faz kolon üzerinde gerçekleştirilmiştir. Her bir izoflavonoit için kalibrasyon eğrileri 0.25-5 µg/mL konsantrasyonlarda oluşturulmuştur. Daidzein, genistein, formononetin ve biokanin A için LOD değerleri sırasıyla 0.11, 0.16, 0.08 ve 0.08 µg/mL olarak, LOQ değerleri ise sırasıyla 0.33, 0.48, 0.24 ve 0.24 µg/mL olarak bulunmuştur. Elde ettiğimiz sonuçlara göre (Tablo 6, Şekil 16), *T. longidentatum* ekstratleri içindeki daidzein, genistein, formononetin

ve biokanin A miktarları sırasıyla % 0.0095, % 0.0056, % 0.0021 ve % 0.0073 olarak bulunmuştur.

Trifolium türleri üzerinde yapılan miktar tayini çalışmalarının genellikle bitkiden hazırlanan metanollü ve asit hidroliz yapılmış ekstratlar üzerinde yapıldığı görülmektedir. Yapılan çalışmalarda, *T. pratense* bitkisinin taşıdığı başlıca izoflavonların formononetin ve biokanin A olduğu, bunun yanında az miktarda daidzein ve genistein bulunduğu görülmektedir. Rijke ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada, *T. pratense* yapraklarının daidzein ve genistein içermediği, % 0.06 oranında formononetin ve % 0.033 oranında biokanin A taşıdığı tespit edilmiştir²⁸. Delmonte ve arkadaşlarının *Trifolium pratense* örneklerinde yaptığı bir çalışmada, bitkinin % 0.011 daidzein, % 0.010 genistein, % 0.289 formononetin ve % 0.204 oranında biokanin A taşıdığı tespit edilmiştir¹²². *T. pratense* popülasyonlarının izoflavonları bakımından incelendiği bir çalışmada, yaprakların % 0.00078-0.009131 oranında daidzein, % 0.0051-0.0171 genistein, % 0.656-2.346 oranında formononetin ve % 0.249-1.033 oranında biokanin A taşıdığı bildirilmiştir¹²³. Wu ve arkadaşlarının *T. pratense*, *T. repens*, *T. hybridum* ve *T. campestre* türlerinin yaprak, gövde, kök ve çiçek kısımlarında izoflavonları tayin ettiği bir çalışmada, formononetin ve biokanin A'nın *T. pratense* haricinde diğer türlerin hiç birisinde bulunmadığı, genistein'in çalışılan bu dört türün tüm kısımlarında tespit edildiği, daidzein'in ise *T. pratense*'nin tüm kısımları ve *T. repens*'in yapraklarında bulunduğu bildirilmiştir. Wu ve arkadaşları yaptıkları çalışmanın sonucunda, izoflavon miktarları üzerinde bitkinin toplama zamanı, çiçek rengi, bitkinin kısmı ve kültür koşullarının oldukça etkili olduğunu bildirmiştir³⁰.

İzoflavonların insan sağlığına faydalı etkilerinin belirlenmesi ile son yıllarda izoflavonlar üzerine ilgi artmıştır. Ülkemizde 130 kadar takson ile temsil edilen Leguminosae'nin büyük cinslerinden birisi olan

Trifolium türlerinin izoflavonları üzerine çalışmalar yapılmıştır. Ülkemizde yetişen *Trifolium* türlerini taşıdıkları izoflavonları bakımından incelediğimiz önceki çalışmamızda, Türkiye'nin farklı yerlerinden toplanan 2 farklı *Trifolium pratense* varyetesi olan *T. pratense* var. *pratense* ve *T. pratense* var. *sativum*'un topraküstü kısımlarından hareketle hazırlanan metanollü ve asit hidroliz yapılmış metanollü ekstrelerde, daidzein, genistein, formononetin ve biokanin A'nın HPLC ile miktar tayinleri yapılmıştır. Sonuç olarak, *T. pratense* var. *pratense* ve *T. pratense* var. *sativum*'daki daidzein, genistein, formononetin ve biokanin A miktarları, her iki varyete için de asit hidroliz ile hazırlanan örneklerde daha yüksek miktarlarda bulunmuştur. Total daidzein ve genistein miktarları sırasıyla en yüksek oranda % 0.0447 ve % 0.0115 ile *T. pratense* var. *pratense*'de tespit edilmiştir. Benzer şekilde yine aynı bitkide total formononetin ve biokanin A sırasıyla % 0.0251 ve % 0.0039 ile en yüksek miktarda belirlenmiştir¹⁹. Diğer bir çalışmamızda, Van-Çatak bölgesinden toplanan *Trifolium lucanicum* örneklerinden belirli konsantrasyonlarda hazırlanan asit hidroliz yapılmış metanollü ekstreler, izoflavonları bakımından tarafımızdan geliştirilen yeni bir metot kullanılarak HPLC ile kantitatif olarak incelenmiştir. Daidzein, genistein, formononetin ve biokanin A'nın *Trifolium* türleri içerisindeki miktarlarının tayin edildiği kromatografik analizlerde spirolakton internal standart olarak kullanılmıştır. *T. lucanicum* topraküstü kısımlarından hazırlanan ekstrelerde daidzein 2.4476, genistein 0.1421, formononetin 0.0911 ve biokanin A 0.2600 µg/mL olarak bulunmuştur¹²⁴.

Ülkemizde yetişen *Trifolium* türlerinin izoflavonları bakımından incelendiği diğer bir çalışmada, Türkiye'nin değişik bölgelerinden toplanan *Trifolium ambiguum*, *T. arvense* var. *arvense*, *T. campestre*, *T. canescens*, *T. hybridum* var. *anatolicum*, *T. hybridum* var. *hybridum*, *T. pannonicum*, *T. pratense* var. *pratense*, *T. purpureum* var. *purpureum*, *T. repens* var. *repens*, *T. resupinatum* var. *microcephalum*, *T. spadiceum*, *T. trichocephalum* türleri daidzein, genistein, formononetin ve

biokanin A miktarları bakımından HPLC ile analiz edilmiştir. Daidzein en yüksek oranda *T. trichocephalum*'da (% 0.01974) , genistein en fazla oranda *T. canescens*'de (% 0.12532), formononetin en fazla oranda *T. pratense* var. *pratense*'de (% 0.06088) ve biokanin A en fazla oranda *T. canescens*'de (% 0.04603) bulunmuştur. Toplam izoflavonoit miktarı açısından *T. canescens* en zengin tür olarak değerlendirilmiş ve fitoterapötik olarak yaygın olarak kullanılan *T. pratense*'ye alternatif olabilecek tür olarak bildirilmiştir¹²⁵.

Tez kapsamında izoflavonları bakımından HPLC ile incelediğimiz *T. longidentatum*'un dört izoflavonuda içerdiği, ancak metanollü ekstre olması bakımından bu izoflavonların asit hidroliz neticesinde miktarlarında olabilecek artışın değerlendirilmesinin uygun olacağı görüşündeyiz. Tez çalışmamız Türkiye'de yetişen *T. longidentatum*'un izoflavonları yönünden incelenmesine yönelik yapılmakla beraber, ülkemiz florasında henüz araştırılmamış birçok *Trifolium* türünün de toplanıp izoflavon miktarlarının belirlenmesi, son yıllarda önemi giderek artan fitoöstrojenlerin yeni kaynaklarının belirlenmesi bakımından faydalı olacaktır.

6. ÖZET

Trifolium türleri çeşitli rahatsızlıkların tedavisinde halk ilacı olarak kullanılmaktadır. Bu türler arasında *Trifolium pratense* izoflavonoitlerin önemli doğal bir kaynağıdır. Son yıllarda yapılan araştırmalar göstermiştir ki *T. pratense* (kırmızı yonca) ekstreleri dört major östrojenik izoflavon genistein, daidzein ve bu bileşiklerin metil eter türevleri olan biokanin A ve formononetin'i yüksek miktarlarda içermektedir. Bundan dolayı, *T. pratense* ekstreleri selektif östrojen reseptör modülatörleri olarak alternatif hormon replasman tedavisinde ve menapoz şikayetlerinin giderilmesi için *T. pratense* preparatlarında etkin şekilde kullanılırlar.

Trifolium cinsi, Türkiye florasında 130 takson ile temsil edilmekte olup, *Trifolium longidentatum*'un izoflavonoitleri üzerinde bugüne kadar herhangi bir analitik çalışma yapılmamıştır. Bu çalışmada, *T. longidentatum*'un topraküstü kısımlarından hazırlanan metanollü ekstrelerde, daidzein, genistein, formononetin ve biokanin A adlı dört izoflavonun HPLC ile miktar tayinleri yapılmıştır. Kromatografik ayırım metanol, asetat tamponu (pH=4.75) ve asetonitril'in mobil faz olarak gradient elüsyonla uygulandığı, Agilent Eclipse XDB-18 (15 cm x 4.6 mm i.d.) ters faz kolon üzerinde gerçekleştirilmiştir. *T. longidentatum* ekstreleri içindeki daidzein, genistein, formononetin ve biokanin A miktarları sırasıyla % 0.0095, % 0.0056, % 0.0021 ve % 0.0073 olarak bulunmuştur.

Anahtar Kelimeler: Leguminosae, *Trifolium*, *Trifolium longidentatum*, izoflavonoitler, kantitatif analiz, HPLC.

7. SUMMARY

Trifolium species are used in traditional medicine to treat several disorders. Among them, *Trifolium pratense* are a potent natural source of isoflavonoids. Recent researches have shown that *Trifolium pratense* (red clover) extracts contain significant high amounts of all the four major estrogenic isoflavones genistein, daidzein, and their methyl ether derivatives biochanin A and formononetin. Therefore, red clover extracts indicate the potential application of red clover preparations for alternative hormone replacement therapy as selective estrogen receptor modulators and in the management of menopause.

Genus *Trifolium* is represented by 130 taxons in the flora of Turkey and, up to date, no any analytical study has been performed on isoflavonoids of *Trifolium longidentatum*. In this study, the methanolic extracts prepared from the aerial parts of *T. longidentatum* have been analyzed to determine the concentrations of four isoflavones, daidzein, genistein, formononetin and biochanin A, by HPLC. Chromatographic separation was carried out by using a mobile phase containing methanol, acetate buffer (pH=4.75) and acetonitrile (gradient elution) on the reversed phase column, Agilent Eclipse XDB-18 (15 cm x 4.6 mm i.d.). The content of daidzein, genistein, formononetin, and biochanin A in the extracts of *T. longidentatum* were found as 0.0095 %, 0.0056 %, 0.0021 ve 0.0073 %, respectively.

Keywords: Leguminosae, *Trifolium*, *Trifolium longidentatum*, isoflavonoids, quantitative analysis, HPLC.

8. KAYNAKLAR

1. Evans WC. Trease and Evans Pharmacognosy. 15.edition. Edinburgh: Saunders; 2002.
2. Bisby FA, Buckingham J, Harborne JB. Phytochemical Dictionary of the Leguminosae. London: Chapman and Hall; 1994.
3. Baytop T, Türkiye'de Bitkiler ile Tedavi. İstanbul: Nobel Tıp Kitapevleri; 1999.
4. Açıkgoz E. Yem Bitkileri (Fodder Plants). 182. Baskı. Bursa: Uludağ Univ.; 2001.
5. Stuart, M. *Herbs and Herbalism*. London: Orbis Ltd.;1984.
6. Gruenwald J, Brendler T, Jaenicke C. PDR for Herbal Medicines. Second edition. New Jersey: Thompson-Physicians' Desk Reference; 2000.
7. Heinrich M, Barnes J, Gibbons S, Williamson EM. Fundamentals of Pharmacognosy and Phytotherapy. Edinburgh: Churchill Livingstone; 2004.
8. Cos P, Bruyne TD, Apers S, Berghe DV, Pieters L, Vlietinck AJ. Phytoestrogens: Recent Developments. *Planta Med.* 2003; 69: 589-599.
9. Beck V, Rohr U, Jungbauer A. Phytoestrogens derived from red clover: An alternative to estrogen replacement therapy? *J. Steroid Biochem. & Mol. Bio.* 2005; 94: 499-518.
10. Adlercreutz H. Phytoestrogens: epidemiology and a possible role in cancer protection *Environ. Health Perspect.* 1995; 103(7): 103-112.
11. Adlercreutz H, Hamalainen E, Gorbach S, Goldin B. Dietary phytoestrogens and the menopause in Japan. *Lancet.* 1992; 339(8803): 1233-1233.
12. Klejdus B, Sterbova DV, Kuban V. Identification of isoflavone conjugates in red clover (*Trifolium pratense*) by liquid chromatography-mass spectrometry after two-dimensional solid-phase extraction. *Anal. Chim. Acta* 2001; 450: 81-97.

13. Klejdus B, Vacek J, Benesova L, Kopecky J, Lapcik O, Kuban V. Rapid-resolution HPLC with spectrometric detection for the determination of isoflavones in soy preparations and plant extracts. Anal. Bioanal. Chem. 2007; 389: 2277-2285.
14. Zohary M. *Trifolium* L. in: Flora of Turkey and the East Aegean Islands. (Davis PH, eds), Vol. 3, p. 384-482. Edinburgh: Edinburgh University Press 1970.
15. Davis PH, Mill RR, Tan K. *Trifolium* L. in: Flora of Turkey and the East Aegean Islands. (Davis PH, eds), Vol. 10, p. 126. Edinburgh: Edinburgh University Press; 1988.
16. Byfield AJ. *Trifolium* L. in: Flora of Turkey and the East Aegean Islands. (Güner A, Özhatay N, Ekim T, Başer KHC, eds), Vol. 11, p. 95. Edinburgh: Edinburgh University Press; 2000.
17. Özhatay N, Kültür Ş. Check-List of Additional Taxa to the Supplement Flora of Turkey III. Turk J Bot. 2006; 30: 281-316.
18. Özhatay N, Kültür Ş, Aslan S. Check-list of Additional Taxa to the Supplement Flora of Turkey IV. Turk J Bot. 2009; 33: 191-226.
19. Kadioğlu O. *Trifolium Pratense* L.'nin Fitoterapideki Önemi. Yüksek Lisans. Ankara: Gazi Üniversitesi; 2008.
20. Tanker N, Koyuncu M, Coşkun M. Farmasötik Botanik. 3. Baskı. Ankara: Ankara Üniv. Eczacılık Fak. Yayınları; 2007.
21. Baytop A. Farmasötik Botanik Ders Kitabı. 5.Baskı. İstanbul: İstanbul Üniv. Eczacılık Fak. Yayınları; 1996.
22. Davis PH. Leguminosae in: Flora of Turkey and the East Aegean Islands. (Davis PH, Mill RR, Tan K, eds), Vol. 3, p. 1-10. Edinburgh: Edinburgh University Press; 1970.
23. Tamura, Chang CF, Suzuki A, Kumai S. Chemical studies on clover sickness. I. Isolation and structural elucidation of two new isoflavonoids in red clover. Agric. Biol. Chem. 1969; 33(3): 391-397.
24. Fraishtat PD, Popravko SA, Vul'fson NS. Secondary metabolites of clover. II. Isolation of 5,4'-dihydroxy-6,7-methylenedioxyisoflavone and its 4'-O-β-D-glucoside from the roots of red clover (*Trifolium pratense*). Bioorganic. Khim. 1979; 5(2): 228-233.

25. Fraishtat PD, Popravko SA, Vul'fson NS. Clover secondary metabolites. VII. Isoflavones from the roots of red clover (*Trifolium pratense*). Bioorganic. Khim. 1980; 6(11): 1722-1732.
26. Saxena VK, Jain AK. Genistein 7-(2''-p-coumaroylglucoside) from *Trifolium repens*. Phytochemistry 1986; 25(11): 2687-2688.
27. Miletic S, Milosavljevic S, Vidakovic M. The isolation and identification of flavonoids from the leaves of *Trifolium pannonicum* L. J. Serbian Chem. Soc. 1991; 56(6): 307-310.
28. Rijke E, Zappey H, Ariese F, Gooijer C, Brinkman UAT. Flavonoids in Leguminosae: Analysis of extracts of *T. pratense* L., *T. dubium* L., *T. repens* L., and *L. corniculatus* L. leaves using liquid chromatography with UV, mass spectrometric and fluorescence detection. Anal. Bioanal. Chem. 2003; 10: 216-303.
29. Rijke E, Zafra-Gomez A, Ariese F, Brinkman UAT, Gooijer C. Determination of isoflavone glucoside malonates in *Trifolium pratense* L. (red clover) extracts: quantification and stability studies. J. Chromatog. A 2001; 932: 55-64.
30. Wu Q, Wang M, Simon JE. Determination of isoflavones in red clover and related species by high-performance liquid chromatography combined with ultraviolet and mass spectrometric detection. J. Chromatogr. A 2003; 1016(2): 195-209.
31. Fraishtat PD, Popravko SA, Vul'fson NS. Secondary metabolites of clover. VIII. Isolation and identification of pterocarpanes from the roots of cultured clover species. Bioorganic. Khim. 1981; 7(6): 927-936.
32. Işık E, Sabudak T, Öksüz S. Flavonoids from *Trifolium resupinatum* var. *microcephalum*. Chem. Nat. Comp. 2007; 43(5): 614-615.
33. Drenin AA, Botirov EK, Petrulyak EV. Two new isoflavonoid monogalactosides from *Trifolium pratense* roots. Chem. Nat. Comp. 2008; 44(1): 24-27.
34. Drenin AA, Botirov EK, Turov YP. A Novel isoflavone monoglycoside from *Trifolium pratense* L. [internet]. 2010 [15.04.2012okundu]. http://www.nioch.nsc.ru/mirrors/press/chemwood/volume14/2010_02/1002_053.en.html.

- 35 Bruneton, J. Pharmacognosy, Phytochemistry, Medicinal Plants. Paris: Technique & Documentation-Lavoisier; 1995.
- 36 Andersen OM, Markham KR. Flavonoids, Chemistry, Biochemistry and Applications. Florida: CRC Press; 2006.
- 37 Beck V, Unterrieder E, Krenn L, Kubelka W, Jungbauer A. Comparison of hormonal activity (estrogen, androgen and progestin) of standardized plant extracts for large scale use in hormone replacement therapy. J. Steroid Biochem. & Mol. Bio. 2003; 84: 259-268.
38. Kuiper GGJM, Lemmen JG, Carlsson BO, Corton JC, Safe SH, Van Der Saag PT, Van Der Burg B, Gustafssons J-A. Interaction of estrogenic chemicals and phytoestrogens with estrogen receptor α . Endocrinology 1998; 139(10): 4252-4263.
39. So FV, Guthrie N, AF, Carroll KK. Inhibition of proliferation of estrogen receptor-positive MCF-7 human breast cancer cells by flavonoids in the presence and absence of excess estrogen. Cancer Let. 1997; 112: 127-133.
40. Birt DF, Hendrich S, Wang W. Dietary agents in cancer prevention: flavonoids and isoflavonoids. Pharmacol. Ther. 2001; 90: 157-177.
41. Dornstauder E, Jisa E, Unterrieder I, Krenn L, Kubelka W, Jungbauer A. Estrogenic activity of two standardized red clover extracts (Menoflavon[®]) intended for large scale use in hormone replacement therapy. J. Steroid Biochem. & Mol. Bio. 2001; 78: 67-75.
42. Zava DT, Dollbaum CM, Blen M. Estrogen and progestin bioactivity of foods, herbs, and spices. Proceed. Soc. Exp. Biol. Med. 1998; 217: 369-378.
43. Cassady JM, Zennie TM, Chae YH, Ferin MA, Portuondo NE, Baird WM. Use of a mammalian cell culture benzo[a]pyrene metabolism assay for the detection of potential anticarcinogens from natural products: inhibition of metabolism by biochanin A, an isoflavone from *Trifolium pratense* L. Cancer Res. 1988; 48: 6257-6261.
44. Mousavi Y, Adlercreutz H. Genistein is an effective stimulator of sex hormone-binding globulin production in hepatocarcinoma human liver cancer cells and suppresses proliferation of these cells in culture. Steroids. 1993; 58(7): 301-304.

45. Peterson G, Barnes S. Genistein inhibition of the growth of human breast cancer cells: Independence from estrogen receptors and the multi-drug resistance gene. *Biochem and Biophys. Res. Com.* 1991; 179(1): 661-667.
46. Wende K, Krenn L, Unterrieder I, Lindequist U. Red Clover Extracts Stimulate Differentiation of Human Osteoblastic Osteosarcoma HOS58 Cells. *Planta Med.* 2004; 70: 1003-1005.
47. Pagliacci MC, Smacchia M, Migliorati G, Grignani F, Riccardi C, Nicoletti I. Growth- inhibitory effects of the natural phyto-oestrogen genistein in MCF-7 human breast cancer cells. *Eur. J. Cancer* 1994; 30(11): 1675-1682.
48. Takahashi M, Ikeda U, Masuyama JI, Kitagawa SI, Kasahara T, Shimpō M, Kano S, Shimada K. Monocyte-endothelial cell interaction induces expression of adhesion molecules on human umbilical cord endothelial cells. *Cardiovasc. Res.* 1996; 32: 422-429.
49. Sabudak T, Dökmeci D, Özyiğit F, Işık E, Aydoğdu N. Antiinflammatory and antioxidant activities of *Trifolium resupinatum* var. *microcephalum* extracts. *Asian J. Chem.* 2008; 20(2): 1491-1496.
50. Ramos GP, Apel MA, Morais CB. *In vivo* and *in vitro* anti-inflammatory activity of red clover *Trifolium pratense* dry extract. *Rev. Bras. Farmacogn. Braz. J. Pharmacogn.* 2012; 22(1): 176-180.
51. Albulescu M, Puscau D. Antioxidant activity of natural extracts containing isoflavones. *Annals West Univ. Timisoara Series Chem.* 2008; 17(1): 131-138.
52. Sarı A, Belge FY. Flavonoids and antioxidant activity of *Trifolium pannonicum* subsp. *Elongatum*. *J. Acta. Pharm. Sci.* 2009; 51(1): 77-82.
53. Zhang Y, Chen X, Sun Y. Study on antioxidant activity of four isoflavones. *Food Sci.* 2008; 29(2): 383-386.
54. Kroyer GT. Red clover extract as antioxidant active and functional food ingredient. *Innovat. Food Sci. & Emerg. Tech.* 2004; 5(1): 101-105.

55. Ruefer CE, Kulling SE. Antioxidant activity of Isoflavones and Their major Metabolites Using Different *in Vitro* Assays. *J. Agric. Food Chem.* 2006; 54 (8): 2926-2931.
56. Georgetti SR, Casagrande R, Verris WAJ, Borin MF, Rafael JA, Jabor JR, Fonseca MJV. Assessment of the antioxidant activity of two plant extracts containing isoflavonoids by different *in vitro* methods. *Lat. Am. J. Pharm.* 2007; 26(2): 253-258.
57. Sabudak T, Ozturk M, Goren AC, Kolak U, Topcu G. Fatty acids and other lipid composition of five *Trifolium* species with antioxidant activity. *Pharm. Biol.* 2009; 47(2): 137-141.
58. Magee JP, Rowland R. Phytoestrogens, their mechanism of action; current evidence for a role in breast and prostate cancer. *Br. J. Nutr.* 2004; 91: 513-531.
59. Occhiuto F, Palumbo DR, Samperi S, Zangla G, Pino A, De Pasquale R, Circosta C. The isoflavones mixture from *Trifolium pratense* L. Protects HCN 1-A neurons from oxidative stress. *Phytother. Res.* 2009; 23(2): 192-196.
60. Occhiuto F, Zangla G, Samperi S, Palumbo DR, Pino A, Pasquale R, Circosta. The phytoestrogenic isoflavones from *Trifolium pratense* L. (Red clover) protects human cortical neurons from glutamate toxicity. *Phytomed.* 2008; 15(9): 676-682.
61. Chen H, Wang X, Jin Z, Xu X, Zhao J, Xie Z. Protective effect of isoflavones from *Trifolium pratense* on dopaminergic neurons. *Neurosci. Res.* 2008; 62(2): 123-130.
62. Kurzer MS, Xu X. Dietary phytoestrogens. *Annu. Rev. Nutr.* 1997; 17: 353-381.
63. Peterson G. Anticancer Effects of Genistein Evaluation of the biochemical targets of genistein in tumor cells. *J. Nutr.* 1995; 125: 784-789.
64. Collins BM, McLachlan JA, Arnold SF. The estrogenic and antiestrogenic activities of phytochemicals with the human estrogen receptor expressed in yeast. *Steroids.* 1997; 62(4): 365-372.
65. Lam ANC, Demasi M, James MJ, Husband AJ, Walker C. Effect of red clover isoflavones on Cox-2 activity in murine and human monocyte/macrophage cells. *Nutr. Cancer* 2004; 49(1): 89-93.

66. Nwannenna AI, Lundh TJ-O, Madej A, Fredriksson G, Bjoernhag G. Clinical changes in ovariectomized ewes exposed to phytoestrogens and 17 β -estradiol implants. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 1995; 208(1): 92-97.
67. Adams NR. Organizational and activational effects of phytoestrogens on the reproductive tract of the ewe. Proceed. Soc. Exp. Biol. Med. 1995; 208: 81-87.
68. Zeng L, Zeng J, Xue C, Li Y, Heralt Med. 2007; 26(11): 1258-1260.
69. Mu H, Bai YH, Wang ST, Zhu ZM, Zhang YW. Research on antioxidant effects and estrogenic effect of formononetin from *Trifolium pratense* (red clover). Phytomed. 2009; 16(4): 314-319.
70. Alves DL, Lima SMRR, Silva CR, Galvao MAL, Shanaider A, Prado RAA, Aoki T. Effects of *Trifolium pratense* and *Cimicifuga racemosa* on the endometrium of wistar rats. Maturitas 2008; 61: 364-370.
71. Kirk EA, Sutherland P, Wang SA, Chait A, LeBoeuf RC. Dietary isoflavones reduce plasma cholesterol and atherosclerosis in C57BL/6 mice but not LDL receptor-deficient mice. J. Nutr. 1998; 128: 954-959.
72. Honoré EK, Williams JK, Anthony MS, Clarkson TB. Soy isoflavones enhance coronary vascular reactivity in atherosclerotic female macaques. Fertil. Steril. 1997; 67(1):148-154.
73. Zhu Y, Tian S, Zhang Y, Ren H, Li B. Effect of red clover isoflavones on immune function and antioxidant activity in broilers. J. Shen. Agric. Univ. 2008; 39(6): 699-703.
74. Üstündağ B, Bahçecioğlu İH, Şahin K, Gülcü F, Düzgün S, Özeran İH, Gürsu MF. Soy izoflavonların karbon tetraklorüre (CCl₄) bağlı karaciğer hasarı ve plazma paraoksonaz ile arilesteraz aktivite düzeylerine olan etkileri. Fırat Üniv. Sağlık Bil. Derg. 2005; 19: 263-271.
75. Bingham SA, Atkinson C, Liggins J, Bluck L, Coward A. Phyto-oestrogens: where are we now? Br. J. Nutr. 1998; 79: 393-406.
76. Barnes S. Phyto-oestrogens and osteoporosis: what is a safe dose. Br. J. Nutr. 2003; 89 Suppl.(1): 101-108.

77. Onozawa M, Kawamori T, Baba M, Fukuda K, Toda T, Sato H, Ohtani M, Akaza H, Sugimura T, Wakabayashi K. Effects of a soybean isoflavone mixture on carcinogenesis in prostate and seminal vesicles of F344 rats. *Jpn. J. Cancer Res.* 1999; 90: 393-398.
78. Pollard M, Wolter W. Prevention of spontaneous prostate-related cancer in Lobund-Wistar rats by a soy protein isolate/isoflavone diet. *Prostate.* 2000; 45: 101-105.
79. Mohamed KM, Ahmed AS, Ali AA. Chemical constituents and antidiabetic activity of *Trifolium alexandrinum* L. [internet] 2003 [15.03.2012okundu].
http://www.pharma.cu.edu.eg/Files/BFOPCU/Volums/TOC_2003_V41_Issue_2/021.htm
80. Türsen Ü. Deri yaşlanmasının topikal ajanlarla önlenmesi. *Dermatose* 2006; 5(4): 267-283.
81. Wei H, Saladi R, Lu Y, Wang Y, Palep SR, Moore J, Phelps R, Shyong E, Lebwohl MG. Isoflavone genistein: photoprotection and clinical implications in dermatology^{1,2}. *J. Nutr.* 2003; 133: 3811-3819.
82. Knight DC, Howes JB, Eden JA. The effect of Promensil, an isoflavone extract, on menopausal symptoms. *Climacteric.* 1999; 2: 79-84.
83. Baber RJ, Templeman C, Morton T, Kelly GE, West L. Randomized placebo-controlled trial of an isoflavone supplement and menopausal symptoms in women. *Climacteric.* 1999; 2: 85-92.
84. Van de Weijer PHM, Barentsen R. Isoflavones from red clover (Promensil®) significantly reduce menopausal hot flush symptoms compared with placebo. *Maturitas* 2002; 42: 187-193.
85. Tice JA, Ettinger B, Ensrud K, Wallace R, Blackwell T, Cummings SR. Phytoestrogen Supplements for the Treatment of Hot Flashes: The Isoflavone Clover Extract (ICE) Study. *JAMA* 2003; 290: 207-214.
86. Jeri AR. The use of an isoflavone supplement to relieve hot flashes. *Female Patient.* 2002; 27: 35-37.
87. Hidalgo LA, Chedraui PA, Morocho N, Ross S, San Miguel G. The effect of red clover isoflavones on menopausal symptoms, lipids

and vaginal cytology in menopausal women: a randomized, doubleblind, placebo-controlled study. *Gynecol. Endoc.* 2005; 21(5): 257-264.

88. Ingram DM, Hickling C, West L, Mahe LJ, Dunbar PM. A double blind randomised controlled trial of isoflavones in the treatment of cyclical mastalgia. *Breast.* 2002; 11: 170-174.
89. Ingram D, Sanders K, Kolybaba M, Lopez D. Case-control study of phyto-oestrogens and breast cancer. *Lancet.* 1997; 350: 990-994.
90. Wilson T, Temple NJ, editors. *Nutritional Health Strategies for Disease Prevention.* Totowa, NJ: Humana Press Inc; 2001.
91. Cassidy A, Bingham S, Setchell DR. Biological effects of a diet of soy protein rich in isoflavones on the menstrual cycle of premenopausal women1-3. *Am. J. Clin. Nutr.* 1994; 60: 333-340.
92. Adlercreutz H, Honjo H, Higashi A, Fotsis T, Hamalainen E, Hasegawa T, Okada H. Urinary excretion of lignans and isoflavonoid phytoestrogens in Japanese men and women consuming a traditional Japanese diet. *Am. J. Clin. Nutr.* 1991; 54: 1093-1100.
93. Nestel PJ, Pomeroy S, Kay S, Komesaroff P, Behrsing J, Cameron JD, West L. Isoflavones from Red Clover Improve Systemic Arterial Compliance But Not Plasma Lipids in Menopausal Women. *The J. Clin. Endocrinology & Metabolism Printed in U.S.A.* 1999; 84(3): 895-898.
94. Samman S, Lyons Wall PM, Chan GSM, Smith SJ, Petocz P. The effect of supplementation with isoflavones on plasma lipids and oxidisability of low density lipoprotein in premenopausal women. *Atherosclerosis.* 1999; 147(2): 277-283.
95. Clifton-Bligh PB, Baber RJ, Fulcher GR, Nery ML, Moreton T. The effect of isoflavones extracted from red clover (Rimostil®) on lipid and bone metabolism. *Menopause: The J. North Am. Menopause Soc.* 2001; 8(4): 259-265.
96. Howes JB, Tran D, Brillante D, Howes LG. Effects of dietary supplementation with isoflavones from red clover on ambulatory blood pressure and endothelial function in postmenopausal type 2 diabetes. *Diabetes, Obesity and Metabolism.* 2003; 5: 325-332.

97. Chedraui P, San Miguel G, Hidalgo L, Morocho N, Ross S. Effect of *Trifolium pratense* derived isoflavones on the lipid profile of postmenopausal women with increased body mass index. *Gynecol. Endoc.* 2008; 24(11): 620-624.
98. Gruenwald J, Brendler T, Jaenicke C. *PDR for Herbal Medicines*. Fourth edition. New Jersey: Thomson Healthcare Inc; 2007.
99. Atkinson C, Compston JE, Day NE, Dowsett M, Bingham SA. The effects of phytoestrogen isoflavones on bone density in women: A double-blind, randomized, placebo-controlled trial. *Am. J. Clin. Nutr.* 2004; 79(2): 326-333.
100. Marini H, Minutoli L, Polito F, Bitto A, Altavilla D, Atteritano M, et al. Effects of the phytoestrogen genistein on bone metabolism in osteopenic postmenopausal women: a randomized trial. *Ann. Intern. Med.* 2007; 146(12): 839-847.
101. Morabito N, Crisafulli A, Vergara C, Gaudio A, Lasco A, Frisina N, D'Anna R, Corrado F, Pizzoleo MA, Cincotta M, Altavilla D, Lentile R, Squadrito F. Effects of genistein and hormone-replacement therapy on bone loss in early post-menopausal women: a randomized double-blind placebo-controlled study. *J. Bone Miner. Res.* 2002; 17: 1904-1912.
102. Morton MS, Chan PSF, Cheng C, Blacklock N, Matos-Ferreira A, Abranches-Monteiro L, Correia R, Lloyd S, Griffiths K. Lignans and Isoflavonoids in Plasma and Prostatic Fluid in Men: Samples From Portugal, Hong Kong, and the United Kingdom. *The Prostate* 1997; 32: 122-128.
103. Katz AE. Flavonoid and Botanical Approaches to Prostate Health. *The J. Alter. Complem. Med.* 2002; 8(6): 813-821.
104. Madersbacher S, Ponholzer A, Schatzl G, Gsur A, Haidinger G, Vries C, Nijhuis L, Adlereretz H. Phyto-oestrogens in BPH and Prostate Cancer Patients. *Eur. Uro. Supp.* 2003; 1: 36.
105. Engelhardt PF, Riedl CR. Effects of One-Year Treatment with Isoflavone Extract from Red Clover on Prostate, Liver Function, Sexual Function, and Quality of Life in Men with Elevated PSA Levels and Negative Prostate Biopsy Findings. *Urology* 2008; 71: 185-190.
106. Schmid D, Zulli F. Topically Applied Soy Isoflavones Increase Skin Thickness. *Cosm. & Toilet.* 2002; 117(6): 45-50.

- 107 Lazarus MC, Baumann LS. The Use of Cosmeceutical Moisturizers. J. Dermatol. Treat. 2001; 14(3): 200-207.
- 108 Tsunoda N, Pomeroy S, Nestel P. Absorption in humans of izoflavones from soy and red clover is similar. J. Nutr. 2002; 132(8): 2199-2201.
- 109 Pfitscher A, Reiter E, Jungbauer A. Receptor binding and transactivation activities of red clover isoflavones and their metabolites. J. Steroid Biochem. & Mol. Bio. 2008; 112(1-3): 87-94.
110. RX Mediafarma. Ver. 12. İzmir: Gemaş Genel Mühendislik; 2012.
111. Phytodelf [internette]. 2012 [12.04.2012 okundu]. <http://www.phytodelf.com/>
112. Solgar [internette]. 2012 [25.05.2012 okundu]. <http://www.solgar.com/>
113. DermoBakım [internette]. 2012 [17.02.2012 okundu]. <http://www.dermobakim.com/Flavoxan-40-Kapsul2863.html#0>
114. İlaçpedia [internette]. 2012 [06.05.2012 okundu]. <http://www.ilacpedia.com/prospektus/isoflavin-tablet>
115. Sweetman SC Martindale: *The Complete Drug Reference* 35. Ed. London: Pharmaceutical Press; 2007.
116. Piersen CE, Booth NL, Sun Y, Liang W, Burdette JE, van Breemen RB, Geller SE, Gu C, Banuvar S, Shulman LP, Bolton JL, Farnsworth NR. Chemical and biological characterization and clinical evaluation of botanical dietary supplements: A phase I red clover extract as a model. Curr. Med. Chem. 2004; 11(11): 1361-1374.
- 117 Barrett M, editors. *The Handbook of Clinically Tested Herbal Remedies*. Vol.1 New York: The Howorth Herbal Press; 2004.
- 118 Bakırel T, Keleş O, Bozkurt HH, Ak K. Farelerde *Trifolium pratense*'nin spermatogenezis üzerine etkisi ve akut toksisitesi. Turk. J. Vet. Anim. Sci. 2002; 26: 555-559.
- 119 Heck AM, Dewitt BA, Lukes AL. Potential interactions between alternative therapies and warfarin. Am. J. Health-Syst. Pharm. 2000; 57: 1221-1227.

120. Levy JR, Faber KA, Ayyash L, Hughes CL. The effect of prenatal exposure to the phytoestrogen genistein on sexual differentiation in rats. *Proceed. Soc. Exp. Biol. Med.* 1995; 208: 60-66.
- 121 Büyüktuncer Z, Başaran A. Fitoöstrojenler ve Sağlıklı Yaşamdaki Önemleri. *Hacettepe Üniv. Eczacılık Fak. Derg.* 2005; 25(2): 79-94.
- 122 Delmonte P, Perry J, Rader JI. Determination of isoflavones in dietary supplements containing soy, Red Clover and Kudzu: Extraction followed by basic or acid hydrolysis. *J. Chromatogr. A* 2006; 1107: 59-69.
- 123 Polasek J, Queiroz EF, Hostettmann K. On-line identification of Phenolic Compounds of *Trifolium* Species using HPLC-UV-MS and Post-column UV-derivatisation. *Phytochem. Anal.* 2007; 18(1): 13-23.
- 124 Küçükboyacı N, Güvenç A, Dinç E, Adıgüzel N, Bani B. New HPLC- Chemometric Approaches to the Analysis of Isoflavones in *Trifolium lucanicum* Gasp. *J. Separ. Sci.* 2010; 33(17): 2558-2567.
- 125 Renda G. Bazı *Trifolium* L. Türleri Üzerinde Farmakognozik Araştırmalar. Doktora. Ankara: Hacettepe Üniversitesi; 2010.

9. ÖZGEÇMİŞ

Adı : ÖZLEM
Soyadı : ILGINER
Doğum Yeri ve Tarihi : Kayseri/1974
Eğitimi :Lisans, Hacettepe Üniversitesi Eczacılık
Fakültesi, 1996
Ortaokul, Lise Kayseri Behice Yazgan Kız
Lisesi,1991
İlkokul, Feridun Cıngıllı İlkokulu,1985

Yabancı Dili : İngilizce

TEŞEKKÜR

Çalışmamın her aşamasında yol gösterici olan, değerli bilgilerini benimle paylaşan danışman hocam Prof. Dr. Nurgün Küçükboyacı'ya,

Çalışmama verdiği destek ve ilgiden dolayı Prof. Dr. Turhan Baykal'a,

Çalışmama verdiği destek ve yardım için Arş. Gör. Hilal Torul'a

Gazi Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Analitik Kimya Anabilim Dalı imkanlarından faydalanarak HPLC analizlerinin yapılmasına olanak sağlayan Anabilim Dalı Başkanı Sayın Prof. Dr. Nusret Ertaş ve Doç. Dr. Uğur Tamer'e,

Bitkisel materyallerin toplanmasında ve teşhisindeki katkılarından dolayı Gazi Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü öğretim üyesi Sayın Prof. Dr. Nezaket ADIGÜZEL ve Arş. Gör. Barış BANI'ye,

Çalışmama gösterdiği yardım ve destek ile her koşulda yanımda olduğu için sevgili arkadaşım Ecz. Elif AYDIN'a

Eğitim ve öğrenim hayatımın her aşamasında gösterdikleri fedakarlık, hoşgörü, güven ve destek için sevgili annem Fatma ILGINER ve abim Mehmet ILGINER'e

TEŞEKKÜR EDERİM.