

**BEZMİALEM VAKIF ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**VITEX AGNUS-CASTUS L. (HAYIT) BİTKİSİNİN ÇİÇEK, YAPRAK VE
MEYVELERİNDEN STANDARDİZE EKSTRELERİN HAZIRLANMASI VE
BİYOLOJİK ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

DOKTORA TEZİ

Ebrar İNAL

**Farmakognozi ve Doğal Ürünler Kimyası Anabilim Dalı
Farmakognozi ve Doğal Ürünler Kimyası Doktora Programı**

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Murat KARTAL

Şubat 2025

**BEZMİALEM VAKIF ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**VITEX AGNUS-CASTUS L. (HAYIT) BİTKİSİNİN ÇİÇEK, YAPRAK VE
MEYVELERİNDEN STANDARDİZE EKSTRELERİN HAZIRLANMASI VE
BİYOLOJİK ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

DOKTORA TEZİ

**Ebrar İNAL
215312002**

**Farmakognozi ve Doğal Ürünler Kimyası Anabilim Dalı
Farmakognozi ve Doğal Ürünler Kimyası Doktora Programı**

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Murat KARTAL

Şubat 2025

Bezmialem Vakıf Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü'nün 215312002 numaralı Doktora Öğrencisi Ebrar İNAL, ilgili yönetmeliklerin belirlediği gerekli tüm şartları yerine getirdikten sonra hazırladığı “*VITEX AGNUS-CASTUS L. (HAYIT) BİTKİSİNİN ÇİÇEK, YAPRAK VE MEYVELERİNDEN STANDARDİZE EKSTRELERİN HAZIRLANMASI VE BİYOLOJİK ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI*” başlıklı tezini aşağıda imzaları olan jüri önünde başarı ile sunmuştur.

Tez Danışmanı : **Prof. Dr. Murat KARTAL**
Bezmialem Vakıf Üniversitesi

Jüri Üyeleri : **Prof. Dr. Gülaçtı TOPÇU**
Bezmialem Vakıf Üniversitesi

Prof. Dr. Aydan DAĞ
Bezmialem Vakıf Üniversitesi

Prof. Dr. Evren ALĞIN YAPAR
Cumhuriyet Üniversitesi

Prof. Dr. Fatih DEMİRCİ
Anadolu Üniversitesi

Doç. Dr. Çağla KIZILARSLAN HANÇER
Bezmialem Vakıf Üniversitesi

Teslim Tarihi : ... Şubat 2025
Savunma Tarihi : 24 Şubat 2025



Her zaman yanımda olan canım aileme,

ÖNSÖZ

Eczacılık Fakültesi öğrencilik günlerimden başlayıp doktora sürecim boyunca daimî destekçim olan, beni bilim insanı olmaya teşvik edip yetiştiren değerli hocam, akademik hayatımdaki rehberim, tez danışmanım sayın Prof. Dr. Murat KARTAL'a saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Bana ve birçok akademisyene örnek olan, tez izleme jürimde yer alarak tecrübelerini esirgemeyen saygıdeğer hocam sayın Prof. Dr. Gülaçtı TOPÇU'ya teşekkür ederim.

Tez izleme jürimde yer alarak kıymetli bilgi ve tecrübeleriyle bana yol gösteren sayın Prof. Dr. Aydan DAĞ'a teşekkür ederim.

Akademik hayatım boyunca bana daima yol gösterici olan ve beni yetiştiren değerli hocam sayın Prof. Dr. Evren ALĞIN YAPAR'a saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

In vivo biyolojik aktivite çalışmalarım sürecinde bana destek olarak, rehberlik ettiği için sayın Prof. Dr. Esra AKKOL KÜPELİ'ye saygı ve teşekkürlerimi sunuyorum.

In vitro sitotoksosite çalışmalarım sürecinde bana yardımcı olan sayın Doç. Dr. Mahmut Fırat KENANOĞLU'na teşekkür ederim.

Doktora sürecimde beni Karl Franzens Universität Graz laboratuvarlarına kabul eden sayın Prof. Dr. Rudolf BAUER'e ve ekibine saygı ve teşekkürlerimi sunuyorum.

T.C. Tarım ve Orman Bakanlığı Ege Tarımsal Araştırma Enstitüsü'ne, sayın Doç. Dr. Ünal KARİK'a ve sayın Dr. İlknur KÖSOĞLU'na tez çalışmamda kullanmak üzere 95 farklı lokasyondan hayıt meyve örneği sağladıkları için teşekkür ederim.

Balıkesir Büyükşehir Belediyesi Çiftçi Eğitim Merkezi'ne ve merkezin şube müdürü sayın Nazım TANRIKULU'na ve başta sayın Mehmet Ali ALTIOKKA olmak üzere Zeytinburnu Tıbbi Bitkiler Bahçesi'ne bitki materyallerimi toplamamdaki yardımları için teşekkür ederim.

Manevi desteklerinden dolayı sevgili çalışma arkadaşlarım Hatice AKBAL İNAN, Büşra BAYRAK, Fulya ÖZBAYRAK LABERNAS, Mustafa SARAÇ, Rana TURGUT ve Şeyma ULUSOY'a teşekkür ederim.

Beni bugünlere getiren, varlıklarının bana her zaman güç verdiği canım annem ve babam Meliha ve Melih İNAL'a, canım ablam Yasemin İNAL AVCI'ya, biricik abim Mehmet Akif AVCI'ya ve Necip Affan KILIÇARSLAN'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım. İyi ki varsınız.

Bu tez, Bezmialem Vakıf Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından 20220211 numaralı proje ile desteklenmiştir.

Şubat 2025

Ecz. Ebrar İNAL

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

Ebrar İNAL

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖNSÖZ.....	iv
BEYAN.....	v
İÇİNDEKİLER	vi
KISALTMALAR	ix
SEMBOLLER	xi
TABLO LİSTESİ	xii
ŞEKİL LİSTESİ.....	xiii
ÖZET.....	xv
SUMMARY	xvi
1. GİRİŞ ve AMAÇ	1
2. <i>Vitex agnus-castus</i> L. TÜRÜNE AİT BOTANİK BİLGİLER.....	4
2.1 <i>Vitex agnus-castus</i> Türünün Sistematikteki Yeri	4
2.2 Lamiaceae Familyasının Özellikleri	4
2.3 <i>Vitex</i> L. Cinsi.....	5
2.4 <i>Vitex agnus-castus</i> Türünün Özellikleri ve Yayılışı	6
3. GENEL BİLGİLER.....	10
3.1 <i>Vitex agnus-castus</i> 'un Tarihçe ve Mitolojisi.....	10
3.2 <i>V. agnus-castus</i> Türünün Geleneksel Kullanım Alanları.....	13
3.3 <i>Vitex agnus-castus</i> Üzerine Yapılan Fitokimyasal Araştırmalar	14
3.3.1 Flavonoidler ve flavonoid heterozitleri.....	14
3.3.2 Fenolik asitler.....	17
3.3.3 İridoid heterozitleri.....	18
3.3.4 Bisiklik diterpenler.....	19
3.3.5 Uçucu yağ ve bileşenleri	21
3.3.6 Sabit yağ ve bileşenleri	25
3.3.7 <i>V. agnus-castus</i> standardizasyon ve kalite kontrol	28
3.3.7.1 Farklı firmaların hazırladığı standardize ekstreler ve dozları	28
3.3.7.2 Kalite kontrol	29
4. <i>Vitex agnus-castus</i> TÜRÜNÜN BİYOLOJİK AKTİVİTELERİ ve KLİNİK KULLANIM ALANLARI.....	31
4.1 Biyolojik Aktiviteleri	31
4.1.1 Antioksidan aktivite	31
4.1.2 Antibakteriyel aktivite.....	32
4.1.3 Antiinflamatuvar aktivite	32
4.1.4 Antidiyabetik/anti-obezite ile ilgili aktiviteler	33
4.1.5 <i>V. agnus-castus</i> 'un kadın hastalıklarında kullanımı ile ilgili biyolojik etkiler.....	35
4.2 Klinik Kullanım Alanları	37
4.2.1 <i>V. agnus-castus</i> bitkisel ilaç olarak kullanımı	37

4.2.2 <i>V. agnus-castus</i> endikasyon dışı kullanımı	40
5. GEREÇ ve YÖNTEM.....	43
5.1 Kimyasal Maddeler ve Çözücüler	43
5.2 <i>V. agnus-castus</i> Uçucu Yağı Üzerine Yapılan Çalışmalar.....	44
5.2.1 Bitkisel materyaller	44
5.2.2 Uçucu yağ eldesi ve verimleri.....	44
5.2.3 Uçucu yağların rölatif yoğunlukları	45
5.2.4 GC-FID/MS ile uçucu yağ analizi.....	45
5.2.5 <i>In-vitro</i> sitotoksite testi	46
5.3 <i>V. agnus-castus</i> Ekstresi Üzerine Yapılan Çalışmalar	47
5.3.1 Bitkisel materyal	47
5.3.2 <i>V. agnus-castus</i> çiçek, yaprak ve meyve ekstralarının hazırlanması	47
5.3.3 Ekstrelerin sıvı kromatografisi ve yüksek rezolüsyonlu kütle spektrometresi (LC-HRMS) ile fenolik bileşiklerinin tayin edilmesi.....	47
5.3.4 <i>In-vitro</i> sitotoksite testi	48
5.4 Ege Bölgesi Hayıt (<i>Vitex agnus-castus</i> L.) Popülasyonlarının Bazı Agromorfolojik ve Biyokimyasal Özelliklerinin Belirlenmesi TAGEM (Tarımsal Araştırmalar ve Politikalar Genel Müdürlüğü) Projesi Kapsamında Yapılan Çalışmalar	48
5.4.1 Bitkisel materyaller	48
5.4.2 <i>V. agnus-castus</i> meyve ekstralarında kastisin miktar tayini için kullanılan HPLC-PDA metodu	50
5.4.2.1 Standart kastisin çözeltilerinin hazırlanması.....	51
5.4.2.2 Kromatografik koşullar	51
5.4.2.3 Ekstrelerin nicel analizi.....	51
5.4.3 Total fenolik madde tayini	51
5.4.4 Total flavonoit madde tayini	52
5.5 <i>In-vivo</i> Biyolojik Aktivite Çalışması için Kullanılan Gereç ve Metodlar.....	52
5.5.1 Bitkisel materyal	52
5.5.2 <i>V. agnus-castus</i> çiçek, yaprak ve meyve ekstralarının hazırlanması	53
5.5.3 Total fenolik madde tayini	53
5.5.4 Total flavonoit madde tayini	53
5.5.5 LC-HRMS ile fenolik bileşen tayini	53
5.5.6 <i>In-vivo</i> anti-obezeite aktivite testleri.....	53
5.5.6.1 Deney protokolü.....	53
5.5.6.2 Biyokimyasal analizler.....	55
6. BULGULAR ve TARTIŞMA.....	58
6.1 <i>V. agnus-castus</i> Uçucu Yağı Üzerine Yapılan Çalışmalarla İlgili Bulgular	58
6.1.1 Uçucu yağ verimleri ve rölatif yoğunlukları	58
6.1.2 Uçucu yağların GC-FD/MS sonuçları.....	58
6.1.3 Uçucu yağların <i>in-vitro</i> sitotoksite testi sonuçları	64
6.2 <i>V. agnus-castus</i> Ekstresi Üzerine Yapılan Çalışmalarla İlgili Bulgular	69
6.2.1 Ekstrelerin verimleri.....	69
6.2.2 Ekstrelerin LC-HRMS sonuçları.....	69
6.2.3 Ekstrelerin <i>in-vitro</i> sitotoksite testi sonuçları.....	77
6.3 Ege Bölgesi Hayıt (<i>Vitex agnus-castus</i> L.) Popülasyonlarının Bazı Agromorfolojik ve Biyokimyasal Özelliklerinin Belirlenmesi TAGEM (Tarımsal Araştırmalar ve Politikalar Genel Müdürlüğü) Projesi Kapsamında Yapılan Çalışmalarla İlgili Bulgular	78
6.3.1 Örneklerin kastisin miktarlarının HPLC-PDA ile analizlerinin sonuçları	78

6.3.2	Örneklerin total fenolik madde miktarları.....	82
6.3.3	Örneklerin total flavonoit madde miktarları	83
6.4	<i>In-vivo</i> Anti-obezite Aktivite Çalışmasına Ait Bulgular.....	84
6.4.1	Ekstrelerin verimleri.....	84
6.4.2	Ekstrelerin total fenolik madde miktarları	85
6.4.3	Ekstrelerin total flavonoit madde miktarları	85
6.4.4	Ekstrelerin LC-HRMS sonuçları.....	86
6.4.5	<i>In-vivo</i> anti-obezite aktivite çalışma bulguları.....	98
7.	SONUÇ ve ÖNERİLER.....	106
	KAYNAKLAR	111
	EKLER.....	123
	ÖZGEÇMİŞ.....	125



KISALTMALAR

A549	: İnsan alveoler adenokarsinom hücresi
AAE	: Askorbik asit eşdeğeri
ADP	: Adenozin difosfat
AMH	: Anti-Müllerian Hormon
ATP	: Adenozin Trifosfat
BAÇEM	: Balıkesir Büyükşehir Belediyesi Çiftçi Eğitim Merkezi
BBCÇ	: Balıkesir'den elde edilen <i>V. agnus-castus</i> beyaz çiçek
BMCÇ	: Balıkesir'den elde edilen <i>V. agnus-castus</i> mor çiçek
BMM	: Balıkesir'den elde edilen <i>V. agnus-castus</i> meyve
BMY	: Balıkesir'den elde edilen <i>V. agnus-castus</i> yaprak
CMC	: Karboksimetil selüloz
DEO	: Drog Ekstre Oranı
DHA	: Dokosaheksaenoik asit
DLD-1	: İnsan kolon kanseri hücre hattı
DMSO	: Dimetil sülfoksit
DNA	: Deoksiribonükleik Asit
DPPH	: 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil
DSBmT	: N, N-bis (4-sulfobütil)-m-toluidin-disodyum
EMA	: Avrupa İlaç Ajansı
EP	: Avrupa Farmakopesi
EPA	: Eikosapentaenoik asit
ERK	: Ekstraselüler sinyal düzenlemeli kinazlar
ESCOF	: Avrupa Bilimsel Fitoterapi Kooperatifi
ESR	: Östrojen reseptörü
EtOH	: Etanol
FBS	: Fetal sığır serumu
FCR	: Folin-Ciocâlteu reaktifi
FID	: Alev İyonlaştırma Detektörü
FRAP	: Ferrik iyon indirgeyici antioksidan gücü
FSH	: Folikül Uyarıcı Hormon
g	: Gram
GC	: Gaz Kromatografisi
GnRH	: Gonadotropin salgılatıcı hormon
h	: Hacim
H69AR	: Çoklu ilaca dirençli küçük hücreli akciğer kanseri
HÇE	: Hayıt çiçek %70 etanol ekstresi
HÇS	: Hayıt çiçek su ekstresi
HDL	: Yüksek yoğunluklu lipoprotein
HEPG2	: İnsan karaciğer kanseri hücre hattı
HME	: Hayıt meyve %70 etanol ekstresi
HMS	: Hayıt meyve su ekstresi

HYE	: Hayıt yaprak %70 etanol ekstresi
HYS	: Hayıt yaprak su ekstresi
IC₅₀	: Yarı maksimum inhibisyon konsantrasyonu
IL	: İnterlökin
İLMER	: Bezmialem Vakıf Üniversitesi İlaç Uygulama ve Araştırma Merkezi
İMÇ	: İstanbul'dan elde edilen <i>V. agnus-castus</i> mor çiçek
İMM	: İstanbul'dan elde edilen <i>V. agnus-castus</i> meyve
İMY	: İstanbul'dan elde edilen <i>V. agnus-castus</i> yaprak
KI	: Kovats İndeksi
L	: Litre
L-929	: Fare fibroblast hücre hattı
LC-HRMS	: Sıvı kromatografi - yüksek rezolüsyonlu kütle spektrometresi
LC-HRMS	: Sıvı Kromatografisi ve Yüksek Rezolüsyonlu Kütle Spektrometresi
LDL	: Düşük yoğunluklu lipoprotein
LH	: Luteinleştirici hormon
MCF-7	: İnsan meme adenokarsinomu hücresi
MeOH	: Metanol
mg	: Miligram
MIK	: Minimum inhibitör konsantrasyon
mL	: Mililitre
mM	: Amerikan Farmakopesi
mM	: Milimol
MMP-9	: Matris metalloproteinaz-9
mRNA	: Mesajcı ribonükleik asit
MS	: Kütle Spektrometresi
MTT	: 3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)-2,5-Difeniltetrazolyum Bromür
NAFDL	: Non-alkolik yağlı karaciğer hastalığı
NCI-H1299	: Küçük hücreli olmayan akciğer kanseri hücre dizisi
Nm	: Nanometre
NSCLC	: Küçük hücreli olmayan akciğer kanseri
PKOS	: Polikistik Over Sendromu
PMS	: Premenstrüel Sendrom
Pnpla2	: Patatin benzeri fosfolipaz alanı içeren protein 2
QE	: Kersetin eş değeri
RAİ	: Rölatif Alıkonma İndeksi
RSD	: Bağlı standart sapma
T₃	: Triiyodotironin
T₄	: Tiroksin
TAGEM	: Tarımsal Araştırmalar ve Politikalar Genel Müdürlüğü
TBG	: Tiroksin bağlayıcı globülin
TBPA	: Tiroksin bağlayıcı ön albümin
TEAC	: Trolox eşdeğer antioksidan kapasitesi
TNF-α	: Tümör nekroz faktör alfa
UCP	: Ayrışma proteini
UV-Vis	: Ultraviyole – Görünür ışık bölgesi
VLDL	: Çok düşük yoğunluklu lipoprotein
μg	: Mikrogram
μL	: Mikrolitre

SEMBOLLER

$\%U$: Rölatif belirsizlik
$^{\circ}C$: Santigrat derece
μ	: Mu
α	: Alfa
β	: Beta
γ	: Gama
μ	: Mikro
κ	: Kappa
δ	: Delta
τ	: Tau

TABLO LİSTESİ

Sayfa

Tablo 5.1 : “Ege Bölgesi Hayıt (<i>Vitex agnus-castus</i> L.) popülasyonlarının bazı agromorfolojik ve biyokimyasal özelliklerinin belirlenmesi” isimli TAGEM projesi kapsamında çalışılan <i>V. agnus-castus</i> örnekleri.....	48
Tablo 5.2 : <i>In-vivo</i> anti-obezite aktivite testlerinde yer alan deney grupları.....	54
Tablo 6.1 : <i>V. agnus-castus</i> uçucu yağı parametreleri.....	58
Tablo 6.2 : <i>V. agnus-castus</i> uçucu yağlarının kimyasal kompozisyonları (%).	59
Tablo 6.3 : <i>V. agnus-castus</i> uçucu yağlarının sitotoksosite (IC ₅₀) değerleri.....	67
Tablo 6.4 : <i>V. agnus-castus</i> çiçek, meyve ve yapraklarındaki fenolik bileşikler... ..	70
Tablo 6.5 : <i>V. agnus-castus</i> 'un farklı hücre hatları üzerindeki sitotoksik etkisi....	77
Tablo 6.6 : Ege Bölgesi Hayıt (<i>Vitex agnus-castus</i> L.) Popülasyonlarının Bazı Agromorfolojik ve Biyokimyasal Özelliklerinin Belirlenmesi TAGEM (Tarımsal Araştırmalar ve Politikalar Genel Müdürlüğü) Projesi Kapsamındaki hayıt örneklerinin kastingin miktarları.....	80
Tablo 6.7 : Kastingin miktarı en yüksek olan 10 örnek.....	82
Tablo 6.8 : <i>V. agnus-castus</i> ekstrelerinin total fenolik madde miktarları.	83
Tablo 6.9 : <i>V. agnus-castus</i> ekstrelerinin total flavonoit madde miktarları.	84
Tablo 6.10 : <i>In-vivo</i> anti-obezite aktivite çalışması ekstre verimleri.	85
Tablo 6.11 : Ekstrelerin total fenol madde miktarları.	85
Tablo 6.12 : Ekstrelerin total flavonoit madde miktarları.	86
Tablo 6.13 : Ekstrelerin LC-HRMS bulguları.....	87
Tablo 6.14 : Deney gruplarının çalışma sürecindeki ağırlıkları.....	99
Tablo 6.15 : HDL-C, LDL-C, trigliserit, adinopektin, leptin, T ₃ ve T ₄ düzeyleri... ..	102
Tablo 6.16 : Hayıt ekstrelerinin obezite modelinde serum sitokin düzeyleri.....	103
Tablo 6.17 : Kan glukoz ve serum insülin seviyeleri.....	104
Tablo 6.18 : Serum lipaz ve lipaz enzimi üzerine belirlenen IC ₅₀ seviyeleri.....	104

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa

Şekil 2.1	: <i>Vitex agnus-castus</i> L.'un yetiştiği yerlerin dünya haritası üzerindeki dağılımı	6
Şekil 2.2	: <i>Vitex agnus-castus</i> L.'un yetiştiği yerlerin Türkiye haritası üzerindeki dağılımı.	7
Şekil 2.3	: Mor ve beyaz renkli <i>Vitex agnus-castus</i> L. çiçekleri.	8
Şekil 2.4	: Mor çiçekli <i>Vitex agnus-castus</i> L. bitkisi.	8
Şekil 2.5	: <i>Vitex agnus-castus</i> L. meyveleri.	9
Şekil 3.1	: Buldan Doğanköy'de yumurta sepeti yapan Nasıf Usta	11
Şekil 3.2	: De Materia Medica içerisinde yer alan <i>Vitex</i> sp.	12
Şekil 3.3	: Kastisin	15
Şekil 3.4	: Penduletin	15
Şekil 3.5	: Orientin	15
Şekil 3.6	: Vitexsin	16
Şekil 3.7	: Kemferol	16
Şekil 3.8	: Luteolin	16
Şekil 3.9	: Luteolin-7-O-glukozit	17
Şekil 3.10	: Apigenin	17
Şekil 3.11	: Ferulik asit	17
Şekil 3.12	: p-Kumarik asit	18
Şekil 3.13	: Klorojenik asit	18
Şekil 3.14	: Agnusit	18
Şekil 3.15	: Okubin	19
Şekil 3.16	: Rotundifuran (Labdan iskeleti)	20
Şekil 3.17	: Viteksilakton (Labdan iskeleti)	20
Şekil 3.18	: Viteagnusin A (Haliman iskeleti)	20
Şekil 3.19	: Kleroda-7,14-dien-13-ol (Klerodan iskeleti)	21
Şekil 3.20	: α -pinen	22
Şekil 3.21	: 1,8-sineol	22
Şekil 3.22	: (Z)- β -farnesen	22
Şekil 3.23	: Bisiklogermakren	23
Şekil 3.24	: Sabinen	23
Şekil 3.25	: α -Terpinil asetat	23
Şekil 3.26	: β -Karyofilen	24
Şekil 3.27	: Limonen	24
Şekil 3.28	: β -Selinen	24
Şekil 3.29	: α -Terpineol	25
Şekil 3.30	: β -Felandren	25
Şekil 3.31	: Linoleik asit	26
Şekil 3.32	: Oleik asit	26
Şekil 3.33	: Palmitik asit	26
Şekil 3.34	: Stearik asit	26
Şekil 3.35	: β -sitosterol	27

Şekil 3.36 : Stigmasterol.....	27
Şekil 3.37 : Kampesterol.....	27
Şekil 4.1 : <i>V.agnus-castus</i> 'un hormonlar üzerindeki etki mekanizması.....	36
Şekil 5.1 : <i>V.agnus-castus</i> bitkisinden uçucu yağ eldesi.	45
Şekil 6.1 : BBÇ uçucu yağı kromatogramı.	60
Şekil 6.2 : BMÇ uçucu yağı kromatogramı.	61
Şekil 6.3 : İMÇ uçucu yağı kromatogramı.	61
Şekil 6.4 : BMY uçucu yağı kromatogramı.....	62
Şekil 6.5 : İMY uçucu yağı kromatogramı.	62
Şekil 6.6 : BMM uçucu yağı kromatogramı.	63
Şekil 6.7 : İMM uçucu yağı kromatogramı.	63
Şekil 6.8 : Balıkesir uçucu yağlarının A549 hücre hattındaki sitotoksitesisi.	65
Şekil 6.9 : Balıkesir uçucu yağlarının MCF-7 hücre hattındaki sitotoksitesisi.	65
Şekil 6.10 : İstanbul uçucu yağlarının A549 hücre hattındaki sitotoksitesisi.....	66
Şekil 6.11 : İstanbul uçucu yağlarının MCF-7 hücre hattındaki sitotoksitesisi.....	66
Şekil 6.12 : <i>V. agnus-castus</i> çiçek ekstresi kromatogramları.	70
Şekil 6.13 : <i>V. agnus-castus</i> meyve ekstresi kromatogramları.....	73
Şekil 6.14 : <i>V. agnus-castus</i> yaprak ekstresi kromatogramları.....	75
Şekil 6.15 : Kastisin bileşiğinin kalibrasyon eğrisi.	78
Şekil 6.16 : Boş çözücü kromatogramı.....	79
Şekil 6.17 : Kastisin standardı kromatogramı.....	79
Şekil 6.18 : 77 kodlu örneğin kastisin pikini gösteren kromatogram.	79
Şekil 6.19 : Gallik asit kalibrasyon eğrisi.....	83
Şekil 6.20 : Kersetin kalibrasyon eğrisi.....	84
Şekil 6.21 : Hayıt yaprak %70 etanol kuru ekstresi kromatogramları.....	88
Şekil 6.22 : Hayıt yaprak su kuru ekstresi kromatogramları.	89
Şekil 6.23 : Hayıt çiçek %70 etanol kuru ekstresi kromatogramları.	91
Şekil 6.24 : Hayıt çiçek su kuru ekstresi kromatogramları.....	93
Şekil 6.25 : Hayıt meyve %70 etanol kuru ekstresi kromatogramları.	95
Şekil 6.26 : Hayıt meyve su kuru ekstresi kromatogramları.	96

VITEX AGNUS-CASTUS L. (HAYIT) BİTKİSİNİN ÇİÇEK, YAPRAK VE MEYVELERİNDEN STANDARDİZE EKSTRELERİN HAZIRLANMASI VE BİYOLOJİK ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

ÖZET

Bu çalışmada, Balıkesir (Burhaniye)'den toplanmış beyaz ve mor çiçekli *Vitex agnus-castus* L. bitkisi ile İstanbul (Zeytinburnu Tıbbi Bitkiler Bahçesi)'den toplanan kültüre alınmış mor çiçekli *V. agnus-castus* bitkisinin çiçek, yaprak ve meyve kısımları ayrılarak uçucu yağları elde edilmiştir. Uçucu yağların kimyasal bileşenleri GC-FD/MS ile tespit edilmiş, ardından da kemotipleri belirlenmiştir. Bitkinin geçmişteki kullanımları doğrultusunda, A549 ve MCF-7 hücre hatları seçilerek uçucu yağların sitotoksiteleri değerlendirilmiştir. Elde edilen sonuçlarla *V. agnus-castus* uçucu yağlarının yüksek sitotoksiteye sahip oldukları anlaşılmıştır. Balıkesir bölgesinden elde edilen uçucu yağların (özellikle de mor çiçek uçucu yağının) daha sitotoksik olduğu görülmüş ve bu sonuçlar uçucu yağların yüksek miktarda içerdikleri α -pinen, karyofilen ve limonen bileşikleriyle ilişkilendirilmiştir.

Balıkesir'den toplanmış mor çiçekli *V. agnus-castus* bitkisinden; meyve, çiçek ve yaprak %70 etanol ekstraları hazırlanmış ve bu ekstraların A549 ve MCF-7 hücre hatlarındaki sitotoksitesi değerlendirilmiştir. *V. agnus-castus* meyve ekstresinin her iki hücre hattı için de yaprak ve çiçek ekstralarından daha sitotoksik olduğu görülmüştür.

Balıkesir'den toplanmış *V. agnus-castus* çiçek, meyve ve yapraklarından %70 etanol ekstraları ve %100 su ekstraları hazırlanmış ve her birinin total fenolik, total flavonoid miktarları ile LC-HRMS cihazıyla fenolik içerikleri tayin edilmiştir. Bu ekstraların her biri, yüksek yağlı diyetle indüklenmiş obeziteye sahip erkek Wistar albino sıçan gruplarının diyetlerine dahil edilerek 7 hafta boyunca test edilmiştir. Çalışmanın sonucunda; hayıt yaprak %70 etanol, hayıt yaprak su ve hayıt çiçek %70 etanol ekstralarının obezite oluşturulmuş sıçanların vücut ağırlığında azalmaya neden olduğu ve negatif kontrol grubu ile kıyaslandığında serum LDL, trigliserit, leptin, lipaz, TNF- α ve IL-1 β seviyelerinde düşüşe; HDL ve adinopektin düzeylerinde ise artışa neden olduğu görülmüştür. *V. agnus-castus* yaprak ve çiçeklerinin luteolin-7-glukozid ve kemferol bileşiklerince zengin olmalarının obezite üzerinde yararlı etki göstermelerinde etkili olduğu düşünülmektedir.

Tez kapsamında, T.C. Tarım ve Orman Bakanlığı Ege Tarımsal Araştırma Enstitüsü ile çalışılarak, 95 farklı bölgeden toplanmış *V. agnus-castus* meyve droglarının PDA dedektörlü HPLC cihazı ile Türk Farmakopesi "Hayıt, Meyve" monografındaki yöntem kullanılarak kistin içerikleri değerlendirilmiştir. Elde edilen sonuçlar doğrultusunda, yerli ve başlıca kistin bileşiği olmak üzere fenolik ve flavonoid bileşiklerince zengin bir *V. agnus-castus* kültür çeşidi geliştirilecektir.

Anahtar Kelimeler: Hayıt, *Vitex agnus-castus*, obezite, uçucu yağ kemotipleri, sitotoksite, kalite kontrol

PREPARATION OF STANDARDIZED EXTRACTS FROM FLOWERS, LEAVES AND FRUITS OF *VITEX AGNUS-CASTUS* L. (CHASTEBERRY) AND INVESTIGATION OF BIOLOGICAL EFFECTS

SUMMARY

In this study, the flowers, leaves and fruits of *Vitex agnus-castus* L. with white and purple flowers collected from Balıkesir (Burhaniye) and *V. agnus-castus* with purple flowers collected from İstanbul (Zeytinburnu Medicinal Plants Garden) were separated and their essential oils were obtained. The chemical components of the essential oils were determined by GC-FD/MS, and then their chemotypes were determined. In line with the past uses of the plant, A549 and MCF-7 cell lines were selected and the cytotoxicity of the essential oils was evaluated. The results obtained showed that *V. agnus-castus* essential oils have high cytotoxicity. It was observed that the essential oils obtained from Balıkesir region (especially the purple flower essential oil) were more cytotoxic and these results were associated with the high amounts of α -pinene, caryophyllene and limonene compounds in the essential oils.

Fruit, flower and leaf 70% ethanol extracts were prepared from purple flowered *V. agnus-castus* collected from Balıkesir and cytotoxicity of these extracts on A549 and MCF-7 cell lines were evaluated. *V. agnus-castus* fruit extract was analyzed to be more cytotoxic than leaf and flower extracts for both cell lines.

70% ethanol extracts and 100% water extracts were prepared from flowers, fruits and leaves of *V. agnus-castus* collected from Balıkesir and total phenolic, total flavonoid amounts and phenolic contents of each were determined by LC-HRMS analysis. Each of the extracts was tested for 7 weeks by including them in the diets of male Wistar albino rat groups with high fat diet induced obesity. As a result of the study; it was observed that 70% ethanol extract of chasteberry leaf, water extract of chasteberry leaf and 70% ethanol extract of chasteberry flower caused a decrease in body weight of obese rats and decreased serum LDL, triglyceride, leptin, lipase, TNF- α and IL-1 β levels and increased HDL and adiponectin levels when compared to the negative control group. It is thought that the richness of *V. agnus-castus* leaves and flowers in luteolin-7-glucoside and kaempferol compounds is effective in their beneficial effects on obesity.

Within the scope of the thesis, in collaboration with the Republic of Türkiye Ministry of Agriculture and Forestry Aegean Agricultural Research Institute, the casticin contents of *V. agnus-castus* fruits collected from 95 different regions were evaluated using the HPLC device with PDA detector and the method in the Turkish Pharmacopoeia "Chasteberry, Fruit" monograph. In line with the results obtained, a native *V. agnus-castus* cultivar rich in phenolic and flavonoid compounds, primarily casticin compound, will be developed.

Keywords: Chasteberry, *Vitex agnus-castus*, obesity, essential oil chemotypes, cytotoxicity, quality control

1. GİRİŞ ve AMAÇ

“Hayıt”, “keşiş biberi”, “namus ağacı” ve “beş parmak otu” isimleri ile bilinen *Vitex agnus-castus* L. bitkisi, Lamiaceae familyasında yer almaktadır. Ağaç veya çalı formlarında bulunabilen bitkinin ana vatanı Akdeniz ülkeleri olmasına karşın Batı Asya’da ve Doğu Afrika’da da yetişmektedir [1, 2]. Ülkemizde de doğal olarak yetişmekte olan *V. agnus-castus* çiçek, yaprak ve meyveleri uçucu yağ ve fenolik bileşikler açısından oldukça zengindir. *V. agnus-castus* başlıca apigenin, kastingin, luteolin, orientin ve viteksin gibi flavonoid ve flavonoid heteroziti bileşikleri bakımından oldukça zengindir. Bu bileşikler arasında yer alan kastingin, hayıt meyvesinin standardizasyonunda kullanıldığından oldukça önem taşımaktadır. Avrupa Farmakopesi’nde (EP) “Agnii casti fructus” ismiyle kayıtlı olan kurutulmuş meyvesinin içeriğinde %0,08’den az olmayacak şekilde kastingin bulunması gerekirken, “Agni casti fructus extractum siccum” ismiyle kayıtlı hayıt meyvesi kuru ekstresinin içeriğinde de en az %0,10 kastingin bulunmalıdır [2, 3]. İçerdiği diğer sekonder metabolitler arasında okubin ve agnusit iridoid glikozitleri ile labdan, klerodan ve haliman iskeleti taşıyan diterpen bileşikler de bulunmaktadır. Ferulik asit, klorojenik asit ve kafeik asit gibi fenolik asitlerce de zengin olan *V. agnus-castus* bitkisinin farklı kısımlarından elde edilen uçucu yağlar ise, 1,8-sineol, α -pinen, β -karyofilen, sabinen, α -terpinil asetat, (Z)- β -farnesen, limonen, α -terpineol ve bisiklogermakren bileşiklerini majör olarak içermektedir [4-6]. Hayıt çiçek, meyve ve yaprakları tarih boyunca farklı yöntemlerle hazırlanmış olup (çay, tentür ve sıvı ekstre) geleneksel olarak özellikle kadın hastalıkları ile astım, öksürük, nezle ve soğuk algınlığı gibi solunum yolu rahatsızlıklarında kullanılmıştır. Hayıt meyvesinin kadınlarda; menstrual siklus düzensizliklerinde, PMS (premenstrüel sendrom) ve mastalji tedavisinde kullanılması Avrupa İlaç Ajansı (EMA) ve Alman Komisyonu E tarafından onaylanmıştır. Bunun dışında menopoz semptomlarında ve fertilitiyi

arttırmak için de kullanılmaktadır. EMA kadınlar için, günlük 180 mg kuru meyve droguna karşılık gelecek 20 mg'lık meyve ekstresini veya 40 damlalık sıvı ekstre kullanımını önermektedir [2, 3].

Bu tezde, Türkiye'de doğal olarak yetişmekte olan *V. agnus-castus* bitkisinin, T.C. Tarım ve Orman Bakanlığı Ege Tarımsal Araştırma Enstitüsü ile işbirliği içerisinde 95 farklı bölgeden alınan meyve örnekleri kastisin içeriği açısından değerlendirilip ülkemizde farmakope kalite kriterine uygun bir çeşit geliştirilmesi hedeflenmiştir ve elde edilen sonuçlara göre yerli ve başlıca kastisin bileşiği olmak üzere fenolik ve flavonoit bileşiklerince zengin bir *V. agnus-castus* kültür çeşidi geliştirilecektir.

Balıkesir (Burhaniye)'de doğal olarak yetişmekte olan mor ve beyaz çiçekli *V. agnus-castus* ile İstanbul (Zeytinburnu Tıbbi Bitkiler Bahçesi)'da kültüre alınmış mor renkli *V. agnus-castus* bitkilerinin çiçek, yaprak ve meyve kısımları ayrılarak uçucu yağların elde edilmesi, elde edilen uçucu yağların Gaz Kromatografi-Alev İyonlaştırma Detektörü-Kütle Spektrometresi (GC-FID-MS) cihazı ile kimyasal yapılarının analiz edilmesiyle kemotiplerinin belirlenmesi ve ardından da *in-vitro* olarak insan alveoler adenokarsinom hücresi (A549), insan meme adenokarsinomu hücresi (MCF-7) hatlarında sitotoksitelerinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Bu amaç doğrultusunda beyaz ve mor renkli hayıt çiçekleri uçucu yağlarının biyolojik aktiviteleri de ilk kez kıyaslanmıştır.

Balıkesir (Burhaniye)'den toplanmış *V. agnus-castus* bitkisinin yaprak, çiçek ve meyve kısımları ayrılarak elde edilen ekstraların *in-vitro* olarak insan alveoler adenokarsinom hücresi (A549) ve insan meme adenokarsinomu hücresi (MCF-7) hatlarında sitotoksitelerinin belirlenmesi hedeflenmiştir. Toplanan materyallerden elde edilen ekstraların kimyasal bileşenlerinin ve miktarlarının aydınlatılabilmesi için Sıvı Kromatografisi ve Yüksek Rezolüsyonlu Kütle Spektrometresi (LC-HRMS) cihazı ile analizlerinin yanı sıra total fenolik madde ve toplam flavonoit madde miktar tayinleri yapılması amaçlanmıştır. *V. agnus-castus* yaprak, çiçek ve meyve kısımlarından elde edilen bu standardize ekstraların anti-obezite aktivitelerinin *in-vivo* olarak yüksek yağlı diyetle indüklenmiş obeziteye sahip Wistar albino sıçanlar üzerinde incelenmesi hedeflenmiştir.

Literatürde *V. agnus-castus* bitkisinin genellikle meyve ekstresi ile çalışılmış olup kadın hastalıkları üzerindeki etkisine yoğunlaşmıştır. Bu tez ile *V. agnus castus*

bitkisinin çiçek, yaprak ve meyvelerinden hazırlanan ekstrelerin ve uçucu yağların sahip oldukları sekonder metabolitler sayesinde meydana getireceği biyolojik aktiviteler araştırılarak, yeni kullanım olanakları ve yeni ürün potansiyellerinin ortaya konulması amaçlanmıştır. Gerçekleştirilecek biyolojik aktivite çalışmaları, *V. agnus-castus*'un etnobotanik çalışmalarda söz edildiği kullanımlarına göre seçilmiştir. Ülkemizde doğal olarak çok yaygın yetişmekte olan bu bitkinin çiçeklerinin, yapraklarının ve meyvelerinin değerlendirilmesi, Türkiye'deki en verimli çeşitlerinden bazılarının bulunup bunların ıslahına yardımcı olunması, bitkinin ülke ekonomisine kazandırılması, çiçek, yaprak ve meyvelerinden ekstreler hazırlanarak ürüne dönüştürülmesinin ülkemiz için değerli olacağı düşünülmektedir.



2. *Vitex agnus-castus* L. TÜRÜNE AİT BOTANİK BİLGİLER

2.1 *Vitex agnus-castus* Türünün Sistematikteki Yeri

Vitex agnus-castus L., Lamiales takımına ait olup Lamiaceae familyasında yer almaktadır. Geniş bir üye sayısına sahip *Vitex* L. cinsine ait olan *V. agnus-castus*, bu cinsin kültürel ve tıbbi amaçlarla kullanılan en ünlü türü olma özelliğine sahiptir. Pakistan, Hindistan ve Sri Lanka gibi ülkelerde yaygın olarak yetişmekte olan *Vitex negundo* L. ve Çin, Hindistan gibi ülkelerde yetişmekte olan *Vitex trifolia* L. 'da bu cinse ait dikkat çekmekte olan diğer türlerdir. *Vitex agnus-castus*'un içerisinde bulunduğu *Vitex* cinsi, eskiden Verbenaceae familyasına mensup olarak kabul ediliyordu ancak günümüzde yapılan moleküler filogenetik çalışmalar ile birlikte bu cinsin Lamiaceae familyasında yer alması gerektiği kabul edilmiştir [2, 7, 8].

2.2 Lamiaceae Familyasının Özellikleri

Tüm dünyada ve ülkemizde oldukça yaygın görülmekte olan Lamiaceae; Türkiye'de takson sayısına göre üçüncü, tür sayısına göre ise dördüncü büyük familyadır. Tıbbi ve ekonomik değeri çok yüksek olan Lamiaceae familyası bitkileri arasında; *Salvia*, *Origanum*, *Thymus*, *Lavandula*, *Mentha*, *Vitex* ve *Melissa* gibi cinsler bulunmaktadır [9].

Otsu bitki veya çalı formunda bulunan Lamiaceae familyası bitkileri genellikle aromatik, hoş kokulu ve salgıdır. Lamiaceae familyasının üyelerinin gövdeleri genellikle dört köşeli olup, yaprakları karşılıklı çapraz veya halka şeklinde dizili haldedir. Yalancı vertisillat şekilli çiçek durumu ve korolla tüpüne yerleştirilmiş 4 veya 2 adet stamen bulunmaktadır. Ovaryumları üst durumlu olup, 2 derin karpelli, 4 gözlü şekildedir. Stilus, ovaryumun iç tabanından çıkmakta olduğundan ginobazik şekilde olarak tanımlanmaktadır. Kaliks 5 birleşik parçadan oluşmakta, korolla genellikle 2 dudaklı olup 5 lobdan oluşmaktadır. Sıklıkla üstte 2, altta 3 lob

bulunmaktadır. Meyveleri nadiren etli, genellikle kuru veya sert şekilde olup 4 adet nukta ayrılmaktadır [10].

Literatürde bulunan bazı çalışmalarda Lamiaceae familyasının, Verbenaceae familyasından evrimleşerek oluştuğuna dair görüşler bulunmaktadır. Lamiaceae ve Verbenaceae familyaları morfolojik olarak birbirlerine çok benzemekte olsalar da aralarında bazı farklılıklar bulunmaktadır. Bu farklılıklar özellikle sahip oldukları meyve ve ovaryum yapıları ile dikkat çekmektedir. *Vitex*'in Lamiaceae familyasındaki çoğu bitki cinsinden farklı olarak etli meyveye sahip olmasından dolayı başlangıçta, Verbenaceae familyasına yerleştirilmiş olabileceği düşünülmektedir. Ancak ilerleyen zamanlarda özellikle moleküler filogenetik alanında yapılan çalışmalarla birlikte iki familya arasındaki farklılıklar daha da belirgin olarak ortaya konulduğundan *Vitex* cinsinin Lamiaceae familyasında yer alması gerektiğine karar verilmiştir [11, 12].

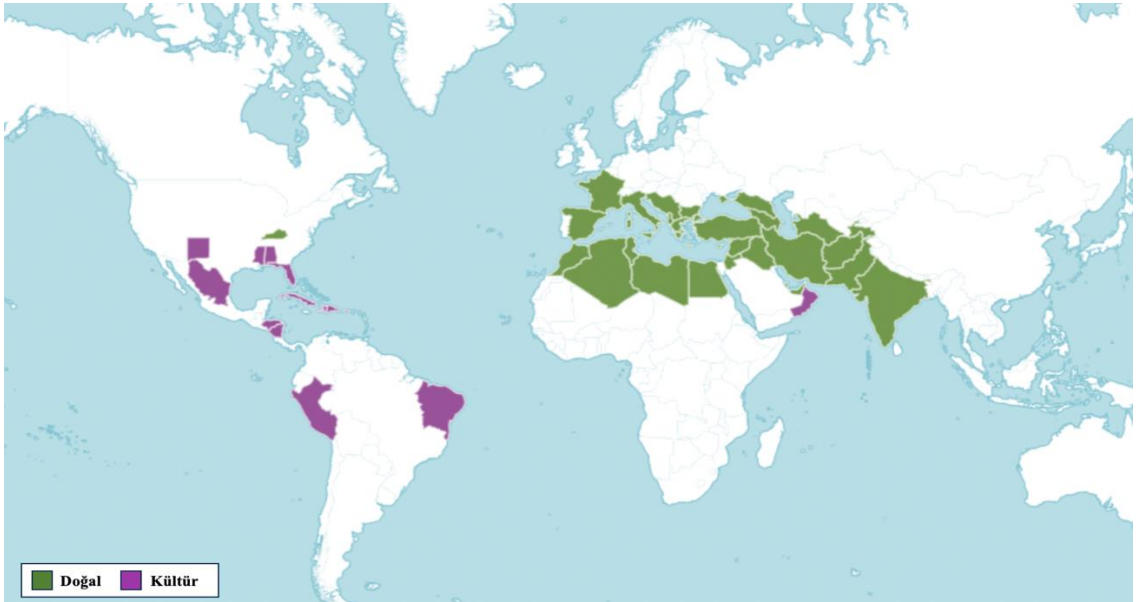
2.3 *Vitex* L. Cinsi

Vitex L. cinsi boyu 3-6 m yüksekliğe ulaşabilen, dünyanın tropikal ve subtropikal bölgelerine özgü çalı veya ağaç formunda bulunan geniş bir topluluktur. Çeşitli türleri; Avrupa, Akdeniz ve Orta Asya'ya yayılmıştır. *Vitex* L. cinsi dünya çapında 214 türe sahiptir ve yalnızca bir tür, *Vitex agnus-castus*, Türkiye'de doğal olarak yetişmektedir. *Vitex* L.'in en iyi tanınan ve araştırılan türlerinden bazıları *V. negundo* L., *V. agnus-castus* L., *V. trifolia* L., *V. rotundifolia* L. f., *V. cymosa* Bertero ex Spreng ve *V. peduncularis* Wall. Ex Schauer'dir. Bu türler arasında *V. agnus-castus*, esas olarak mastalji, adet kanaması sorunları, amenore, menoraji, luteal yetmezlik ve PMS tedavisi için cinsin kullanımına ilişkin klinik denemelere tabi tutulduğu bildirilen tek türdür. *Vitex* L. cinsinin yaprakları karşılıklı çapraz şekilde karakterize olup 3-7 foliolü digitat parçalanmıştır. Korolla çoğunlukla zigomorftur ve huni şekilli olup beyaz ve/veya mavi, mor, leylak tonlarına sahiptir. Korolla tüpü kısa 5 parçalı; üst iki, alt üç parçalı olacak şekilde iki dudaklıdır. Stamenler, 4 adet olup didinam şeklindedir. Ovaryumları dört gözlü, meyveleri drupa tipinde, etlidir. Endokarp genellikle çok sert yapıda olup 4 gözlüdür [13-15].

2.4 *Vitex agnus-castus* Türünün Özellikleri ve Yayılışı

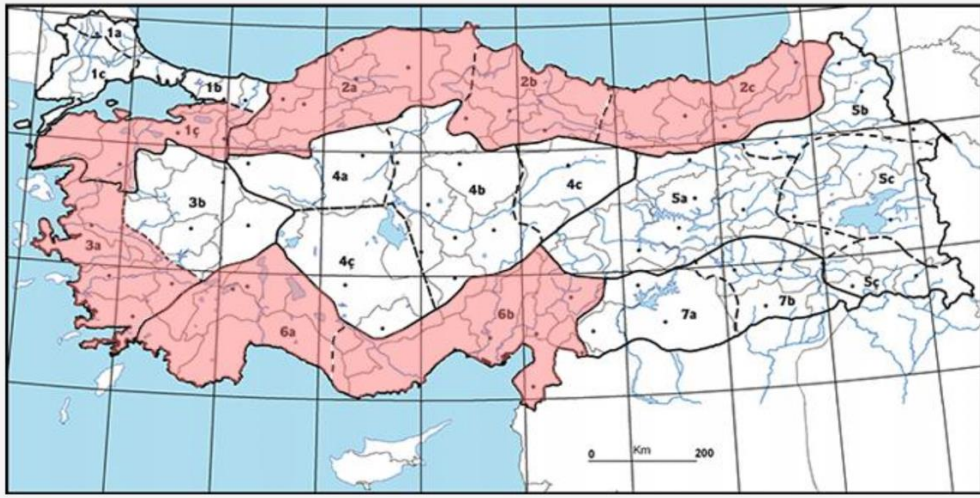
Vitex agnus-castus bitkisi başlıca Akdeniz bölgesi coğrafyasında (Güney Avrupa, Kuzey Afrika ve Batı Asya'da) ve Kafkasya'da özellikle nehir ve deniz kıyılarında doğal olarak yetişmektedir. Hayıt bitkisi, Akdeniz bölgesi bitkisi olmasına rağmen; İran, kuzeydoğu Hindistan, Afganistan ve Pakistan'da da doğal olarak yetişmektedir. Günümüzde, özellikle Amerika Birleşik Devletleri'nin Doğu, Güney ve Batı kıyılarında ise kültüre alınmış olarak yetiştirilmektedir (Şekil 2.1) [16, 17].

V. agnus-castus Amerika Birleşik Devletleri'nde "Abbeville Blue (mavi çiçekli, bitki boyu 3-6 m)", "Alba (beyaz çiçekli)", "Blue Diddley (bitki boyu 185 cm'ye kadar uzayan, mavi çiçekli)", "Blue Puffball (bitki boyu 1 m kadar, mavi çiçekli)", "Blushing Spires (pembe çiçekli)", "Delta Blues (bitki boyu 3 m kadar)", "Latifolia (mavi-lavanta çiçekli, yeşil-mavimsi yapraklı, bitki boyu 4,5 m kadar)", "Montrose Purple (uzun boylu yaklaşık 7,5 m kadar, mavi çiçekli)", "Pink Sensation (pembe çiçekli, bitki boyu 4,5 m kadar)", "Rosea (bitki boyu 3 m kadar, pembe çiçekli, pembe hayıt ağacı olarak da bilinmektedir)", "Salinas Pink (gerçek pembe çiçekli)" ve "Shoal Creek (iri mavi mor çiçekli)" isimleri ile çiçek rengine veya bitki boyuna göre farklı isimlerle kültüre alınmaktadır [18].



Şekil 2.1: *Vitex agnus-castus* 'un yetiştiği yerlerin dünya haritası üzerindeki dağılımı [17].

Vitex agnus-castus Anadolu'da "hayıt", "beş parmak otu", "ayıt" ve "ayıd" isimleri ile bilinmekte olup oldukça yaygın olarak görülmektedir. Hatta Anadolu'da "Karacahayıt", "Karahayıt" ve "Hayıtlı" isimli yerleşim yerleri bulunmaktadır. Hayıt bitkisi bu yerleşim yerlerinde yüksek oranda bulunduğundan yerel halk tarafından bu bitkiye önem verilmekte ve sıklıkla kullanılmaktadır. *V. agnus-castus* Türkiye'de Akdeniz, Ege, Marmara, Doğu Karadeniz ve kısmen de Güney Doğu Anadolu bölgesinde yayılış göstermektedir. Özellikle Trabzon, Giresun, Bursa, İzmir, Manisa, Aydın, Muğla, Antalya, Adana, Mersin ve İskenderun illerimizde yaygın olarak yetişmektedir (Şekil 2.2) [1, 15, 19].



Şekil 2.2: *Vitex agnus-castus* 'un yetiştiği yerlerin Türkiye haritası üzerindeki dağılımı [15].

V. agnus-castus aromatik bir kokuya sahip, büyük bir çalı veya küçük bir ağaç şeklinde bulunmaktadır. Boyu 3-6 m'yi bulmaktadır. Üst yüzü yeşil-gri, alt yüzü beyaz tomentoz tüylü yaprakları 5-7 parçalı, palmat şeklindedir. Korolla iki dudaklı olup yaklaşık 8 mm çapındadır ve petallerin rengi soluk pembe, pembe, koyu pembe ve leylak renginden mora ve ara sıra beyaza kadar değişiklik gösterebilmektedir (Şekil 2.3, Şekil 2.4). Çiçeklenme dönemi haziran ayından sonbahar başlarına kadar devam etmektedir. Meyve, 3-4 mm çapında, siyah-kırmızımsı etli, drupa tipi meyvedir ve kendine özgü bir kokusu ve hafif acı bir tadı vardır (Şekil 2.5) [16, 20].



Şekil 2.3: Mor ve beyaz renkli *Vitex agnus-castus* çiçekleri.



Şekil 2.4: Mor çiçekli *Vitex agnus-castus* bitkisi.



Şekil 2.5: *Vitex agnus-castus* meyveleri.

3. GENEL BİLGİLER

3.1 *Vitex agnus-castus*'un Tarihçe ve Mitolojisi

Vitex agnus-castus bitkisinin dalları, çiçekleri, yaprakları ve meyveleri antik dönemde bile; dini törenlerde, günlük yaşantıda ve sağlık alanında kullanılmıştır. Hayıt bitkisinin günümüzde sağlık alanında olan kullanımlarının, antik dönemde olan kullanımları ile benzerlik göstermesi geçmişte yaşamış uygarlıkların sahip oldukları bilgi birikimlerini vurgulamaktadır. *V. agnus-castus* geleneksel olarak İtalya, İran, Yunan ve Mısır tıbbında 2500 seneden fazladır jinekolojik rahatsızlıklarda kullanılmaktadır. Bitki dünyanın çeşitli yerlerinde; "Fruit de gattilier" (Fransa), "Sauzgatillo" (İspanya), "Mönchspfefferfrüchte" (Almanya), "Panj-angosht" (Pers İmparatorluğu), "Frutto di Agnocasto" (İtalya) ve "Chaste tree" (İngilizce) isimleri ile bilinmektedir [2, 21].

Romalı tarihçi Plinius, tarafından hayıt dallarının antik dönemde sepet yapımında kullanıldığı bildirilmiştir. Bu nedenle bitkinin cins ismi "*Vitex*" 'in, dallarının örülebilmesinden dolayı Latince "vitis"-örülerek yapılmış- kelimesinden geldiği düşünülmektedir. Hayıt ağacının dalları günümüzde de bu kullanıma paralel olarak Anadolu'da; Balıkesir Havran ve Burhaniye'de, Muğla ve Mersin'de sepet ve sele yapımında kullanılmaktadır."agnus-castus" epitet isminin ise, eski Yunancada kutsal, saf veya iffetli anlamına gelen "ágnos" kelimesinden türetilmiş olup daha sonradan "agnus" şeklinde söylendiği düşünülmektedir. Epitet adının ikinci kısmı olan *castus* ise, iffet anlamına gelen Latince "castitas" kelimesinden türetilmiştir [2, 21].



Şekil 3.1: Buldan Doğanköy’de yumurta sepeti yapan Nasif Usta (Fotoğraf: Füsun Ertuğ) [22].

Eski Yunan Uygarlığı’nda hayıt; tarım, evlilik ve verimlilik tanrıçası Ceres (Demeter) için gerçekleştirilen törenler için oldukça önemliydi. Thesmophoria bayramı adı verilen bu özel günlerde, kutlamalara yalnızca kadınlar katılmaktaydı. Bu bayram evlenme ve anneliğe hazırlık kutlamasıydı. Bu festival süresince kadınlar, kendilerini hayıt çiçekleri ile süslerdi. Hayıt çiçeğinin saflık ve namus ile ilişkili olmasının yanı sıra evli kadınların çocuk doğurmalarına yardımcı olması için tanrıçalarla iletişim kurmanın bir yolu da olduğu düşünülüyordu. Yunan mitolojisinde özellikle evliliklerin ve doğum yapan kadınların koruyucusu olarak görülen tanrıça Hera’nın Samos Adası’nda hayıt ağacının altında doğduğu düşünülmekte olduğundan, bu ağaç kutsal sayılmış ve altına yapılan heykel ile her yıl Hera onuruna törenler düzenlenmiştir. Sparta’da ise kadınların, Yunan Mitolojisi’nde tıbbın ve sağlığın tanrısı Asklepios’dan

kadın hastalıklarının tedavisi için yardım istemelerinin ardından hayıt bitkisi ile kadın hastalıklarının tedavi edildiğine inanılmaktadır [21, 23].

Hipokrat, M.Ö. IV. yüzyılda hayıt bitkisinin çiğ halde veya suda kaynatılmasıyla yara ve iltihaplarda; kırmızı şarap içerisinde dinlendirilmesiyle ise kadın hastalıklarında kullanılabileceğinden bahsetmiştir. Dioskorides, “Materia Medica” isimli kitabında, hayıt bitkisinin jinekolojik rahatsızlıklarda ve bebek emziren kadınlarda süt salgısını arttıracığından bahsetmiştir (Şekil 3.2) [8, 21].



Şekil 3.2: De Materia Medica içerisinde yer alan *Vitex* sp. [24].

Dioskorides'in yanı sıra, Plinius'da hayıt bitkisinin jinekolojik rahatsızlıklarda kullanılabileceğinden bahsetmiştir. Her ikisi de hayıt meyvesinin dalak rahatsızlıklarında, baş ağrısında ve bazı zehirli hayvanların ısıklarının tedavisinde kullanılabileceğinden hatta bu zehirli hayvanların yaşam alanlarından uzaklaştırılması için de kullanılabileceğinden bahsetmiştir [8, 21]

Hayıt bitkisi Ortaçağ'da Avrupa'da da saflık ve namus simgesi olarak bilinmekteydi. Katolik kilisesi tarafından benimsenmiş olan hayıt bitkisinin erkeklerde cinsel isteği azalttığına inanıldığından, manastırlarda yemek salonlarında sıklıkla öğütülerek

kullanıldığı bilinmektedir. Hayıt bitkisi bu sebeple “keşiş biberi (monk’s pepper)” adıyla da anılmaktadır [2, 21]. Günümüzde, *V. agnus-castus*’un erkeklerde testosteron hormonu seviyelerinde azalmaya yol açtığı kanıtlanmıştır [25]. 9. ve 12. yüzyıllarda bazı İslam alimleri tarafından akıl hastalığı ve epilepsi rahatsızlığı olan kişilerde hayıt bitkisini kullandıkları belirtilmiştir [21]. Saberi ve arkadaşları tarafından 2008 yılında gerçekleştirilen *in-vivo* hayvan deneyi çalışması ile *V. agnus-castus*’un sahip olduğu κ -opioid ve D2 dopaminerjik aktiviteleri sayesinde, doza bağımlı olarak epileptik aktiviteyi önleyebileceği ve/veya azaltabileceği ortaya konulmuştur. Bu alanda yapılacak daha çok çalışmaya ihtiyaç duyulsa da, bitkinin geçmişteki kullanımına paralel bir kullanım alanının günümüzde de mümkün olabileceği ihtimali olduğu görülmektedir [26].

3.2 *V. agnus-castus* Türünün Geleneksel Kullanım Alanları

Anadolu’da *V. agnus-castus* meyve ve yapraklarının, yünlü kumaşları güvelere karşı koruduğu söylenmektedir. Bitkinin dalları sepet örmekte ve kumaş boyamada kullanılmaktadır. *V. agnus-castus* meyveleri infüzyon şeklinde hazırlanarak diüretik, karminatif ve yatıştırıcı olarak kullanılmaktadır [27].

Türkiye’nin farklı yerleşim yerlerinde yapılan etnobotanik çalışmalar incelendiğinde, *V. agnus-castus*’un özellikle kadın hastalıkları ve akciğer sağlığı için kullanıldığı belirlenmiştir. Alaşehir-Manisa’da yerel halk tarafından, *V. agnus-castus* meyvesi ve çiçekli dalları dekoksasyon yöntemiyle hazırlanarak adet sancısı, vajinal kaşıntı ve solunum yolu hastalıklarının giderilmesi için günde 2-3 kez olacak şekilde iki hafta boyunca kullanılmaktadır [28]. Bozyazı-Mersin’de astım, bronşit, soğuk algınlığı, grip ve hormonal bozukluklar için hayıt meyvelerinin; bal ile karıştırılarak 2 hafta boyunca günde 1-2 kez tüketildiği veya infüzyon şeklinde çay olarak içildiği görülmektedir [29]. Datça-Muğla’da *V. agnus-castus* meyvelerinin dekoksasyon şeklinde hazırlanarak kadınlarda kısırlık için ve/veya fertilitiyi arttırmak için kullanıldığı bilinmektedir [30]. İzmir’de geleneksel olarak, kadınlarda adet döngüsünü düzenlemek için *V. agnus-castus* meyveleri infüzyon şeklinde hazırlanarak 15-30 gün boyunca günde 2-3 kez çay şeklinde tüketilmektedir [31]. Muğla-Marmaris’de ise *V. agnus-castus*’un toprak üstü kısımları dekoksasyon şeklinde hazırlanarak öksürük ve bronşitin giderilmesi için kullanılmaktadır [32]. Karahayıt-Denizli’de hayıt bitkisinin meyvelerinin ve yapraklarının; kadınlarda adet düzensizliği ve ağrılarını gidermek, yumurtalıklarda

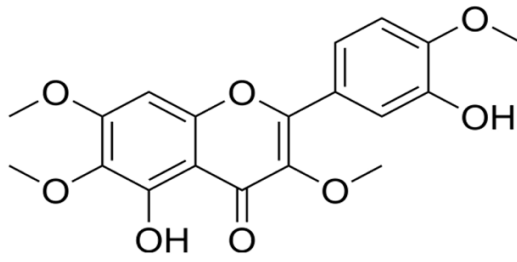
oluşan iltihabı ve kistleri tedavi etmek ve fertilitiyi arttırmak için tüketildiği görülmektedir. *V. agnus-castus* meyve ve yapraklarının, yerel halk tarafından bu kullanımların yanı sıra diyabet, kalp ve damar hastalıkları, romatizma ve karın ağrıları için de yemeklere baharat şeklinde ilave ettikleri veya çay şeklinde tüketerek kullandıkları da görülmektedir. Karahayıt yöresinin bu ad ile anılmasının, bölgede çok sayıda yetişmekte olan koyu renkli meyvelere sahip hayıt ağaçlarından ilerigeldiğine veya bölgede hayıt ağaçlarının yandığını gören bir çobanın hayıtların karardığını söylemesi ardından bu şekilde söylenegeldiğine inanılmaktadır [1].

3.3 *Vitex agnus-castus* Üzerine Yapılan Fitokimyasal Araştırmalar

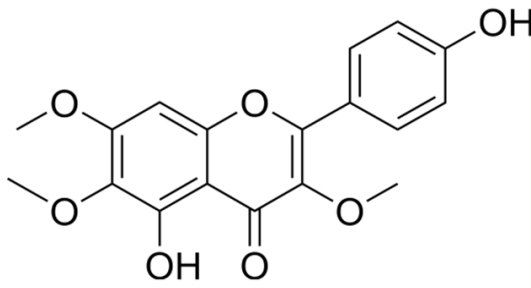
V. agnus-castus bitkisi başlıca; flavonoid ve flavonoid heterozitleri, iridoid glikozitleri, fenolik asitler ve bisiklik diterpen bileşiklerini içermektedir [7]. Bitkinin çiçek, yaprak ve meyvelerinden uçucu yağ elde edilmektedir. Meyvelerinden elde edilen sabit yağ, yağ asitleri bakımından oldukça zengindir [33]. Bu bölümün devamında *V. agnus-castus* bitkisinde yer almakta olan fitokimyasal bileşikler detaylı olarak incelenecektir.

3.3.1 Flavonoitler ve flavonoit heterozitleri

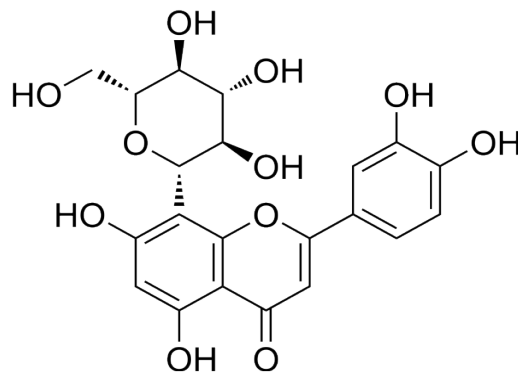
V. agnus-castus bitkisi flavonoit ve flavonoit heterozitleri bileşikleri açısından oldukça zengindir. Berrani ve arkadaşları tarafından gerçekleştirilen çalışmada, *V. agnus-castus* total flavonoit içeriğinin yapraklarında 1,39 mg QE/g; köklerinde 0,67 mg QE/g; toprak üstü kısımlarında 0,41 mg QE/g; çiçeklerinde 1,84 mg QE/g ve meyvelerinde ise 1,13 mg QE/g olduğu hesaplanmıştır. Bitkinin çiçek, yaprak ve meyveleri; kastisin, penduletin, orientin, viteksin, kemferol, luteolin, luteolin-7-O-glukozit ve apigenin bileşiklerini içermektedir. Bu bileşikler arasından kastisin bileşiği, bitkinin standardizasyonunda kullanıldığından önem taşımaktadır (Şekil 3.3-3.10) [2, 3, 34, 35] .



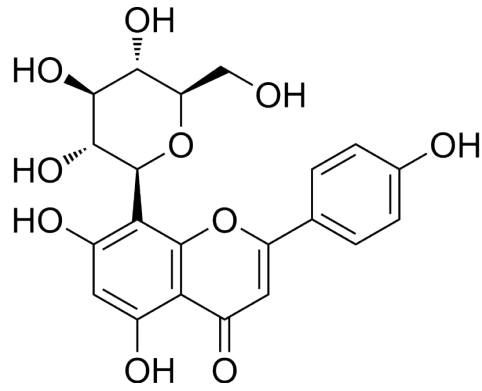
Şekil 3.3: Kastisin [36].



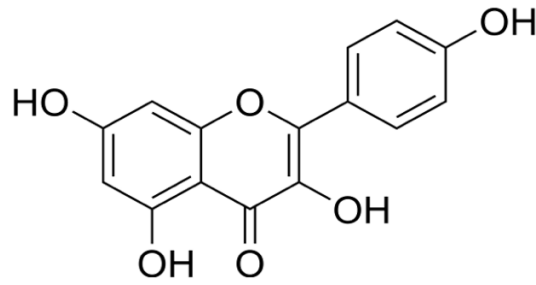
Şekil 3.4: Penduletin [37].



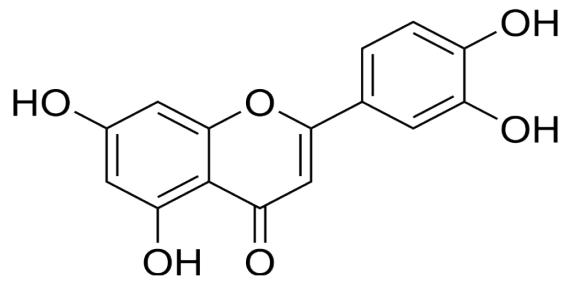
Şekil 3.5: Orientin [38].



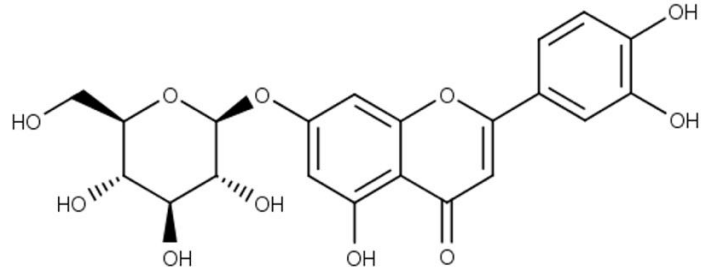
Şekil 3.6: Viteksin [39].



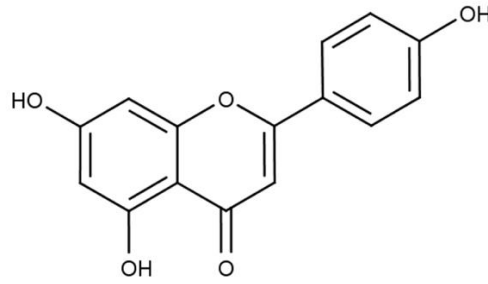
Şekil 3.7: Kemferol [40].



Şekil 3.8: Luteolin [41].



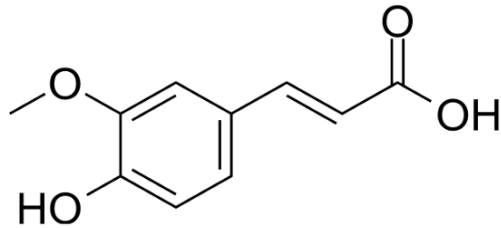
Şekil 3.9: Luteolin-7-O-glukozit [42].



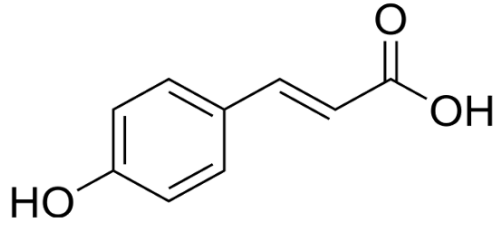
Şekil 3.10: Apigenin [43].

3.3.2 Fenolik asitler

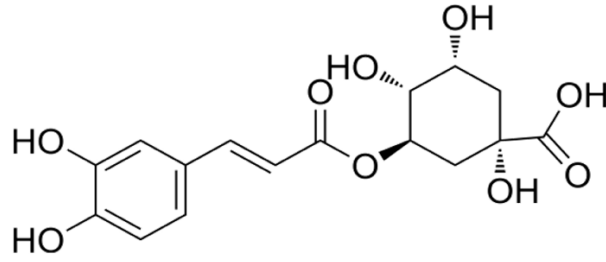
V. agnus-castus çiçek, yaprak ve meyveleri fenolik asit bileşiklerinden başlıca; ferulik asit, p-kumarik asit ve klorojenik asit bileşiklerini barındırmaktadır (Şekil 3.11-3.13) [34, 35].



Şekil 3.11: Ferulik asit [44].



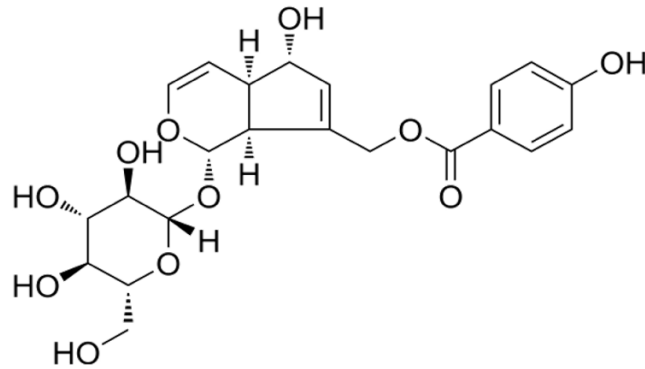
Şekil 3.12: p-Kumarik asit [45].



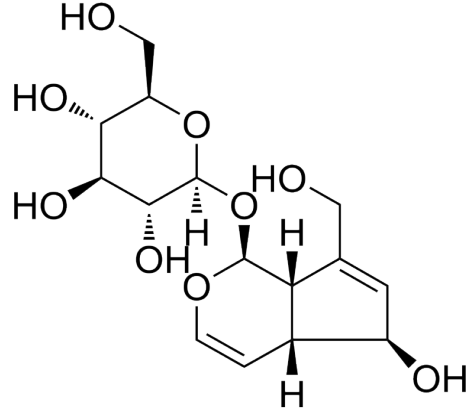
Şekil 3.13: Klorojenik asit [46].

3.3.3 İridoid heterozitleri

V.agnus castus bitkisi başlıca agnusit ve okubin iridoid heteroziti bileşiklerinden oluşmaktadır (Şekil 3.14 ve Şekil 3.15) [2].



Şekil 3.14: Agnusit [47].

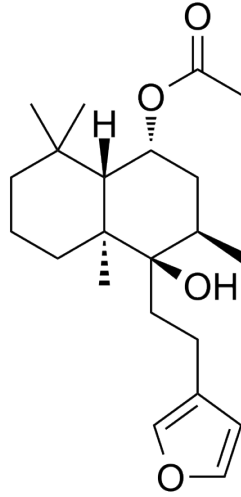


Şekil 3.15: Okubin [48].

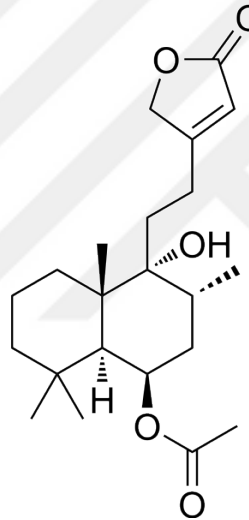
Kuruüzüm-Uz ve arkadaşları tarafından 2003 yılında yürütülmüş bir çalışmada, *V.agnus-castus* bitkisinin çiçekli dallarından hazırlanmış metanollü ekstreden; agnukastozid A (6'-O-foliomentolmussenozidik asit), agnukastozid B (6'-O-(6,7-dihidrofoliomentolmussenozidik asit) ve agnukastozid C (7-O-trans-p-kumaroil-6'-O-trans-kafeoil-8-epiloganik asit) isimli üç adet iridoit heterozit bileşiği elde edilmiştir [49].

3.3.4 Bisiklik diterpenler

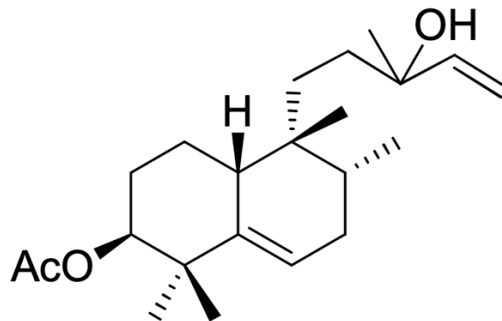
V. agnus-castus meyvesinin içerdiği bisiklik diterpenler başlıca; Labdan (rotundifuran, viteksilakton, viteksilaktam, viteagnusit A, 6 β ,7 β -diasetoksi-13-hidroksi-labda-8,14-dien, viteagnusin C, viteagnusin D, viteagnusin E, viteagnusin F, viteagnusin G, viteagnusin H, viteagnusin I, viteagnusin J), Haliman (viteagnusin A, viteagnusin B) ve Klerodan (Kleroda-7,14-dien-13-ol, Kleroda-1,3,14-trien-13-ol) iskeleti taşıyan bileşiklerdir (Şekil 3.16-3.19) [2, 50, 51]. *V.agnus-castus*'un meyvesinin içerdiği bu bileşiklerin sahip olduğu dopaminerjik aktiveye yol açtığı anlaşılmıştır [4, 52].



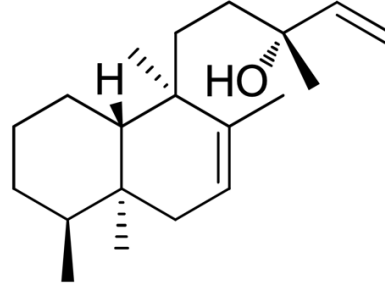
Şekil 3.16: Rotundifuran (Labdan iskeleti) [53].



Şekil 3.17: Viteksilakton (Labdan iskeleti) [54].



Şekil 3.18: Viteagnusin A (Haliman iskeleti) [51].

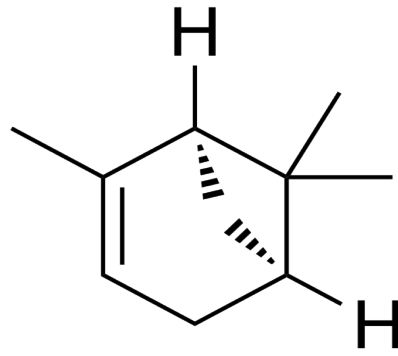


Şekil 3.19: Kleroda-7,14-dien-13-ol (Klerodan iskeleti) [51].

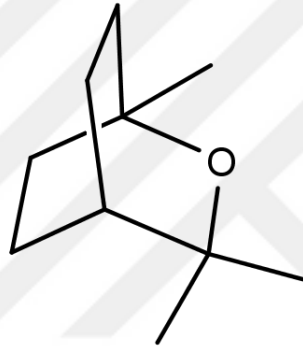
3.3.5 Uçucu yağ ve bileşenleri

Literatürde bulunan çalışmalarda *V.agnus-castus* bitkisinin meyvelerinden elde edilen uçucu yağın %0,21-1,34 verime sahipken, yapraklarından elde edilen uçucu yağın ise %0,21-0,80 verime sahip olduğu belirtilmektedir. *V. agnus-castus* çiçeklerinden elde edilen uçucu yağ ile ilgili yer almakta olan çalışma sayısı oldukça azdır. Roberta ve Camara tarafından 2016 yılında gerçekleştirilen bir çalışmada, *V. agnus-castus* çiçeklerinden elde edilen uçucu yağın verimi %0,07 olarak tespit edilmiştir. [33, 55-57]. Uçucu yağların verimleri ve kimyasal kompozisyonları; bitkinin bulunduğu habitata, yağış vb. ortam koşullarına göre de değişiklik gösterebilmektedir [33, 58].

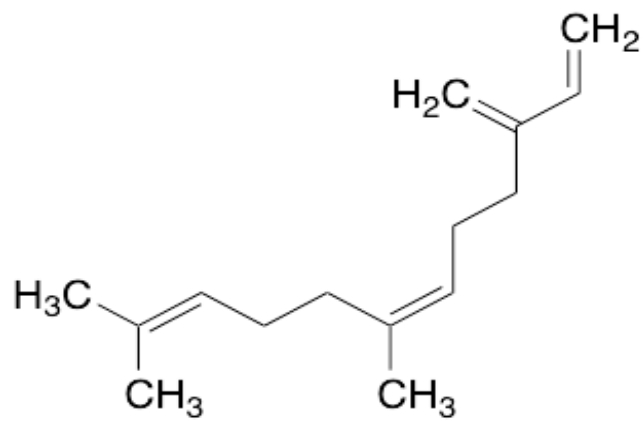
V. agnus-castus bitkisinin çiçek, yaprak ve meyvelerinden elde edilen uçucu yağda major olarak 1,8-sineol, α -pinen, β -karyofilen, sabinen, α -terpinil asetat, β -felandren, (Z)- β -farnesen, limonen, bisiklogermakren, β -selinen ve α -terpineol bileşikleri bulunmaktadır. *V. agnus castus* meyve ve yaprak uçucu yağlarının kemotiplerini belirlemek için yapılan ilk çalışmada iki baskın kemotip, α -pinen ve α -terpinil asetat bahsedilmiştir. Ancak daha sonradan yürütülmüş çalışmalarda bitkinin kemotip adlandırmasının genellikle “ α -pinen-1,8-sineol”, “(Z)- β -farnesen-bisiklogermakren” ve “sabinen-1,8-sineol” gibi ikili bileşikler üzerinden yapıldığı görülmektedir (Şekil 3.20-3.30) [6, 33, 55-59].



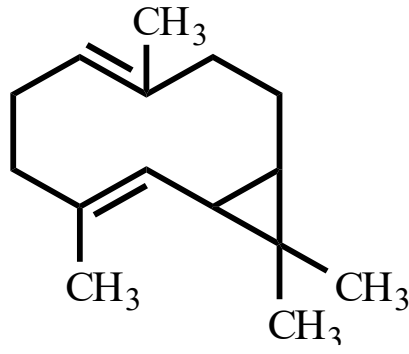
Şekil 3.20: α -pinen [60].



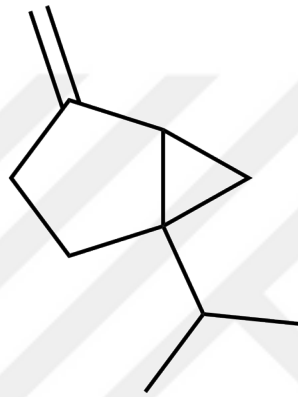
Şekil 3.21: 1,8-sineol [61].



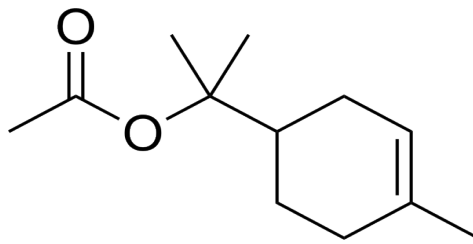
Şekil 3.22: (Z)- β -farnesen [62].



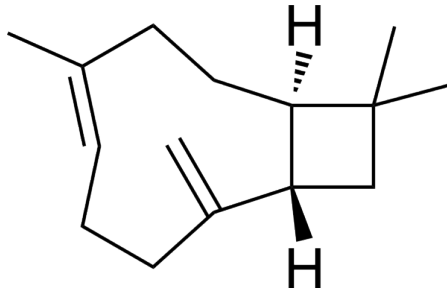
Şekil 3.23: Bisiklogermakren [63].



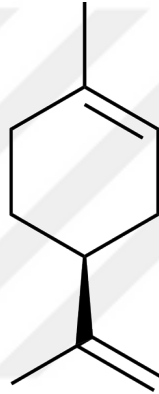
Şekil 3.24: Sabinen [64].



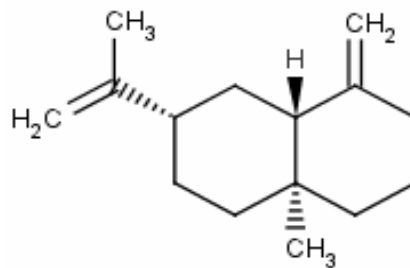
Şekil 3.25: α -Terpinil asetat [65].



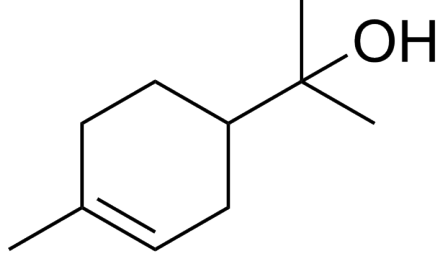
Şekil 3.26: β -Karyofilen [66].



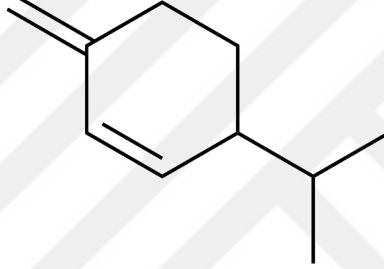
Şekil 3.27: Limonen [67].



Şekil 3.28: β -Selinen [68].



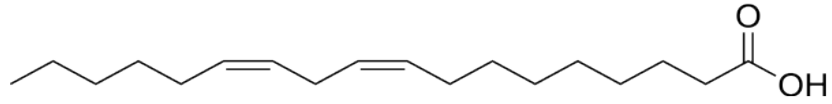
Şekil 3.29: α -Terpineol [69].



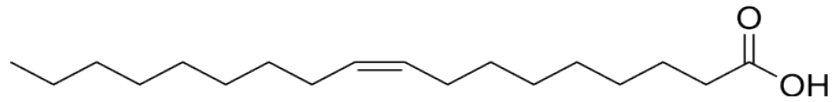
Şekil 3.30: β -Felandren [70].

3.3.6 Sabit yağ ve bileşenleri

V. agnus-castus meyvesi %3,8-7,9 oranında sabit yağ içermektedir. Sabit yağın içerdiği yağ asitleri incelendiğinde; ana bileşen olarak linoleik asit (%24,76-71,50) ve oleik asit (%16,85-26,11) doymamış yağ asitlerini içerdiği görülmektedir. Onları palmitik asit (%6,18-9,00) ve stearik asit (%3,4-4,23) doymuş yağ asitleri izlemektedir. *V. agnus-castus* meyvesinden elde edilen sabit yağı, %1,4-1,5 oranında sterol içermektedir. Bu sterollerin başlıca β -sitosterol (%43,3-59,28), stigmasterol (%7,1-10,37) ve kampesterol (%6,56- 13,3) olduğu görülmektedir (Şekil 3.31-3.37) [33, 71, 72].



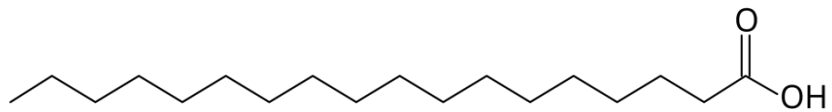
Şekil 3.31: Linoleik asit [72].



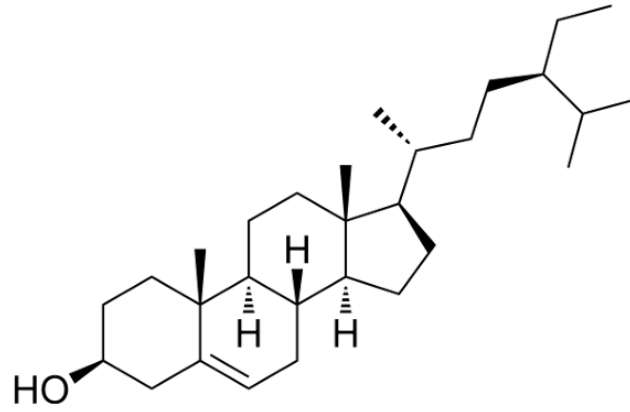
Şekil 3.32: Oleik asit [73].



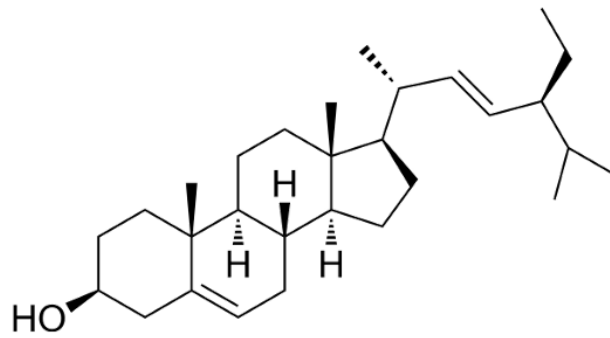
Şekil 3.33: Palmitik asit [74].



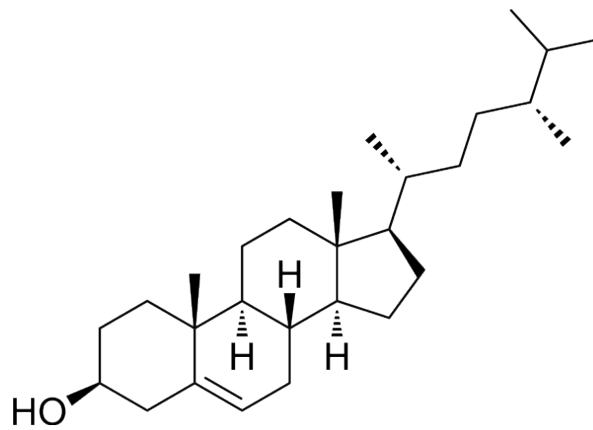
Şekil 3.34: Stearik asit [75].



Şekil 3.35: β -sitosterol [76].



Şekil 3.36: Stigmasterol [77].



Şekil 3.37: Kampesterol [78].

3.3.7 *V. agnus-castus* standardizasyon ve kalite kontrol

Gerhard Madaus isimli Alman bilim insanı, 1930 yılından itibaren hayıt bitkisi ve bitkinin jinekolojik hastalıklardaki kullanım potansiyeli üzerine çalışmalar yürütmeye başlamıştır. Bitkinin meyve ekstresinin kadın hastalıklarında daha etkili olduğunu ortaya koymuş ardından da “Agnolyt®” adıyla bu ilacın patentini almıştır. Bu ilaç daha sonradan yürütülecek bilimsel çalışmalarda ve hayıt ekstresinin standardizasyonun belirlenmesinde kullanılmıştır. Agnolyt®’in ardından hayıt ekstresinin sıvı ve katı dozaj formları halinde farklı ekstreleri piyasaya sürülmüştür [79].

3.3.7.1 Farklı firmaların hazırladığı standardize ekstreler ve dozları

EMA (Avrupa İlaç Ajansı) kadınlar için, günlük 180 mg kuru *V. agnus-castus* meyve droguna karşılık gelecek 20 mg’lık meyve ekstresini veya 40 damlalık sıvı ekstre kullanımını önermektedir. *V. agnus-castus* bitkisinden hazırlanan preparatlar; likit formda EtOH tentürü şeklinde, katı formda ise kuru ekstre şeklindedir. %50-70 (h/h) EtOH’dan farklı DEO (Drog Ekstre Oranı) ile hazırlanmaktadır [3]. Bazı firmalar, farklı DEO oranları ile farklı dozda kullanılacak *V. agnus-castus* ekstrelerini hazırlamaktadırlar.

Katı dozaj formları

Agnolyt®’in hem katı hem de sıvı dozaj formu bulunmaktadır. Katı dozaj formunda kapsül şeklindedir. Her bir kapsül *V. agnus-castus* meyvelerinden %50-70 (h/h) EtOH ile hazırlanmış 3,5-4,2 mg kurutulmuş ekstreyi içermektedir [3, 79, 80].

Ülkemizde Sağlık Bakanlığı tarafından onaylı Agnucaston® aynı zamanda BNO 1095 adıyla bilinmekte olup dünyanın pek çok yerinde de kullanılmaktadır. Katı dozaj formunda olup; her bir film kaplı tableti %70 (h/h) EtOH’dan hazırlanmış 4 mg (7-11:1) *V. agnus-castus* meyve ekstresini içermektedir. Her bir kapsül 40 mg kuru droga eş değerdir. Almanya’da, Castufemin® isimli ürün aynı şekilde hazırlanmaktadır [3, 80-82].

Prefemin® (Ze 440) Avrupa’da özellikle, Almanya’da yaygın olarak kullanılmakta olup katı dozaj formunda bulunmaktadır. *V. agnus-castus*’un etkinliğinin araştırıldığı klinik araştırmalarda sıklıkla tercih edilmekte olan Prefemin®’in her bir tableti %60 (h/h) EtOH kullanılarak hazırlanmış 20 mg kuru ekstreyi (6-12:1) içermektedir. Her bir kapsül 180 mg kuru droga eş değerdir. Yine Almanya’da üretilmekte olan Strotan®

ve İsviçre’de hazırlanan Oprane® isimli ürün de aynı şekilde hazırlanmaktadır [3, 80, 83, 84].

Almanya’da Agno Sabana®, Cefanorm®, Femicur N®, Feminon A®, İspanya’da Dismegyn®, Femiplante® isimli ürünlerin her bir tableti *V. agnus-castus* meyvesinden %60 EtOH kullanılarak hazırlanmış 4 mg (7-13:1) kuru ekstreyi içermektedir [85-90].

Sıvı dozaj formları

Agnolyt® sıvı dozaj formu şeklinde ise, *V.agnus-castus* meyvelerinden %50-70 (h/h) EtOH kullanılarak 1:5 DEO ile hazırlanmış tentürdür. Günlük, 40 damlası bir bardak suya ilave edilerek kullanılmaktadır [3, 79, 80]. Avusturya’da üretilmekte olan Agnofem® ve Agnumens® ürünleri, Agnolyt® ile aynı şekilde hazırlanıp kullanılmaktadır [91, 92].

Almanya’da Gynocastus® isimli ürün tentür şeklinde, %60 EtOH kullanılarak (h/h) *V.agnus-castus* meyvesinden (7,9-8,8:1) hazırlanmaktadır [93].

Avrupa ve dünyada kullanılan katı ve sıvı dozaj formları standardizasyonunda her bir dozajın belirlenmesi total ekstreya göre belirlenmiştir. Örneğin Agnucaston®’da her bir tablet 4 mg kuru ekstre içermektedir. Burada, etkili majör bileşik kastingin olduğu ve ekstrelerin kastingine göre standardize edildiği düşünüldüğüne göre her bir dozaj formunda ne kadar kastingin ve total flavonoit miktarını içermesi gerektiği belirlenmelidir. Yine, farklı yerlerden toplanan meyve örneklerinden miktarsal çok büyük değişiklikler saptanmıştır. Bundan sonraki projemizde piyasadaki farklı *Vitex agnus-castus* ürünlerinin toplanarak kastingin ile total fenol-flavonoit bileşikleri açısından karşılaştırılması ve her bir dozaj formunda ne kadar kastingin ve total fenol-flavonoit miktarı olması gerektiği konusunda standardizasyon getirilmesi amaçlanmaktadır.

3.3.7.2 Kalite kontrol

Meyvenin kalite kontrolü

V. agnus-castus meyvesi toplamda; %9,6-10,7 nem, %5,3-7,4 protein, %73,9-78,8 karbonhidrat ve %2,5-3,0 kül içermektedir. Toplam karbonhidrat içeriğinin (%73,9-78,8), %14,1-23,8’i nişasta, %0,7-1,0’i şeker ve %47,2-49,9’u lif yapılarından oluşmaktadır [33]. *V. agnus-castus* meyvesi, Avrupa Farmakopesi’ne “Agnii casti

fructus” adıyla kayıtlı olarak bulunmaktadır. Avrupa Farmakopesi’ne göre kurutulmuş *V. agnus castus* meyve drogunun içerisinde %0,08’den az olmayacak şekilde kistin bileşimi bulunmalıdır [3].

Ürünlerin kalite kontrolü

V. agnus-castus meyve ekstresi ise Avrupa Farmakopesi’ne “Agni casti fructus extractum siccum” adıyla kayıtlıdır. Avrupa Farmakopesi’ne göre *V. agnus castus* meyve ekstresi %0,10’dan az olmayacak şekilde kistin bileşimi içermelidir [3].



4. *Vitex agnus-castus* TÜRÜNÜN BİYOLOJİK AKTİVİTELERİ ve KLİNİK KULLANIM ALANLARI

4.1 Biyolojik Aktiviteleri

4.1.1 Antioksidan aktivite

Sağlam ve arkadaşları gerçekleştirmiş oldukları çalışmada, *V.agnus-castus* meyve ve yapraklarından hazırlanmış EtOH, su ve hekzan ekstrelerinin antioksidan aktivitelerini TEAC (Trolox eşdeğer antioksidan kapasitesi) analizi ile değerlendirmişlerdir. Çalışmanın sonucunda *V. agnus-castus* yaprağından elde edilmiş su ($2,50 \pm 0,04$ mM) ve EtOH ($1,57 \pm 0,03$ mM) ekstreleri ile *V. agnus-castus* meyvesinden elde edilmiş su ($2,27 \pm 0,08$ mM) ve EtOH ($1,35 \pm 0,03$ mM) ekstrelerinin yüksek antioksidan aktiviteye sahip olduğu tespit edilmiştir. Bu aktivitenin *V. agnus-castus*'un içerdiği çeşitli fenolik ve flavonoit bileşiklerden ileri geldiği düşünülmektedir [94].

Sahib ve arkadaşları gerçekleştirmiş oldukları çalışma ile *V. agnus-castus* yapraklarından elde edilmiş MeOH ekstresinin DPPH'a karşı antiradikal etki gösterdiğini (IC_{50} değeri 126,79 mg/mL) ortaya koymuşlardır [95]. Bir başka çalışmada; *V. agnus-castus* bitkisi çiçek, yaprak, meyve, kök ve toprak üstü kısımları olacak şekilde gruplandırılmış ardından bu kısımlardan MeOH ekstreleri hazırlanarak DPPH radikale karşı antioksidan etkileri değerlendirilmiştir. Çalışmanın sonucunda antioksidan etkiler sırasıyla çiçek (IC_{50} değeri 0,199 mg/mL), kök (IC_{50} değeri 0,283 mg/mL), toprak üstü kısmı (IC_{50} değeri 0,410 mg/mL), yaprak kısmı (IC_{50} değeri 0,420 mg/mL) ve meyve (IC_{50} değeri 0,612 mg/mL) olacak şekilde tespit edilmiştir. En düşük antioksidan etki meyvede görülmüştür. Yine aynı çalışmada aynı ekstrelerin antioksidan etkileri FRAP (Ferrik iyon indirgeyici antioksidan gücü) yöntemi ile değerlendirilmiştir. Çalışmada kontrol grubu olarak askorbik asit kullanılmıştır. Çiçek, kök ve toprak üstü kısımlarının (sırasıyla $1,347 \pm 0,08$, $1,293 \pm 0,06$, ve $0,926 \pm 0,17$ mg AAE/g) yüksek indirgeme özelliğine sahip olduğu anlaşılmıştır.

Yaprak ($0,488 \pm 0,14$ mg AAE/g) ve meyve kısımlarının ($0,615 \pm 0,09$ mg AAE/g); bitkinin çiçek, kök ve toprak üstü kısımlarına göre daha az indirgeme özelliğine sahip olduğu görülmüştür [35].

V.agnus-castus yapraklarından elde edilen uçucu yağın, *in-vitro* olarak kültüre edilmiş H69AR (Çoklu ilaca dirençli küçük hücreli akciğer kanseri) hücre hattı üzerinde güçlü antioksidan ve sitotoksik etki gösterdiği tespit edilmiştir [96]. Sarıkürkçü ve arkadaşları tarafından yürütülmüş çalışma ile, *V.agnus-castus* meyvesinden elde edilen uçucu yağın β -karoten/linoleik asit sisteminde yüksek antioksidan aktivite gösterdiği ($2,0$ mg/ml konsantrasyonda $\%86,17 \pm 1,82$) anlaşılmıştır [97].

4.1.2 Antibakteriyel aktivite

V. agnus-castus bitkisinin çiçek, yaprak, meyve, kök ve toprak üstü kısımlarından hazırlanmış MeOH ekstralarının; *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* ve *Salmonella enterica* suşları üzerinde inhibitör aktivite gösterdiği tespit edilmiştir. Bu aktivitenin, *V. agnus-castus* bitkisinin içerdiği klorojenik asit ve luteolin gibi fenolik bileşikler sayesinde görüldüğü düşünülmektedir [35]. *V. agnus-castus* yapraklarından hazırlanmış etil asetat ekstresinin, metisiline dirençli *Staphylococcus aureus* üzerinde antibakteriyel etki (MİK= $0,312$ mg/mL) gösterdiği tespit edilmiştir [98].

V. agnus-castus meyvesinden elde edilen uçucu yağın; *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Kocuria rhizophila*, *Enterococcus faecalis*, gibi gram-pozitif bakteri suşları ile *Salmonella abony*, *Pseudomonas aeruginosa* ve *Escherichia coli* gram-negatif bakteri suşları üzerinde antibakteriyel etki gösterdiği anlaşılmıştır [33, 99]. *V.agnus-castus* yaprak uçucu yağının ise *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus casseliflavus*, *Enterobacter cloacae*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* ve *Klebsiella pneumoniae* suşları olmak üzere geniş bir antibakteriyel etki alanına sahip olduğu kanıtlanmıştır [100]. *V.agnus-castus* yaprak uçucu yağının antibakteriyel etkinliğinin disk difüzyon yöntemi kullanılarak incelendiği bir başka çalışmada, *Bacillus subtilis* suşuna karşı antibakteriyel etkinliğin 100 kat seyreltmeye rağmen etkili olduğu görülmektedir [56].

4.1.3 Antienflamatuvar aktivite

V. agnus-castus bitkisinin sahip olduğu antienflamatuvar aktiviteyi konu alan *in-vitro* ve *in-vivo* çalışmalar bulunmaktadır.

Bir çalışmada; *V. agnus-castus* bitkisinden elde edilmiş kastisin bileşiminin %69,51 etkinlik ve 302,1 µg/mL'lik IC₅₀ değeri ile anti-enflamatuar aktivite gösterdiği tespit edilmiştir [101]. Bir başka çalışmada ise *in-vivo* olarak, Sprague Dawley dişi sıçanlarda oluşturulan dismenore (sancılı adet ağrısı) modeli üzerinde *V. agnus-castus* meyve ekstresi içeren Agnucaston® (BNO 1095) preparatının etkisi incelenmiştir. *V. agnus-castus* meyve ekstresi, Sprague Dawley dişi sıçanlarda oksitosin ile indüklenmiş kasılmaları azaltmış, lipoksijenaz aktivitesini ve lökotrien üretimini güçlü bir şekilde inhibe etmiş ve reaktif oksijen türleri ile enflamatuar sitokinlerin üretimini azaltarak antienflamatuar aktivitesini göstermiştir [102].

V. agnus-castus yapraklarından elde edilen petrol eteri, etil asetat, su ve MeOH, ekstrelerinin enflamasyon üzerindeki etkilerini belirlemek için Wistar sıçanların ve Albino farelerin yer aldığı bir çalışma tasarlanmıştır; ekstrelerin oluşturulan standart akut, subakut ve kronik enflamasyon modelleri üzerindeki etkileri incelenmiştir. *V. agnus-castus* yaprak-MeOH ekstresinin 400 mg/kg dozunun akut modelinde %43, subakut modelinde %75 ve kronik enflamasyon modelinde %59,28'lik inhibisyona neden olduğu görülmüştür. *V. agnus-castus* yaprak-MeOH ekstresinin 400 mg/kg dozu aynı zamanda enflamatuar sitokinlerden IL-6 ve TNF- α seviyelerinde sırasıyla %77,87 ve %63,34 düşüşe yol açmıştır. Ekstrenin göstermiş olduğu antienflamatuar aktivitenin bitkinin içerisinde bulunmakta olan kemferol ve luteolin gibi flavonoid bileşiklerden kaynaklandığı düşünülmektedir [103].

V. agnus-castus meyve ekstresi, kalıcı orta serebral arter tıkanıklığı oluşturulmuş dişi fare modeline 30 gün boyunca (günlük 80 mg/kg dozda) uygulanmıştır. Çalışmanın sonucunda ekstrenin sahip olduğu anti-enflamatuar ve östrojenik aktivitelerin inme yaralanmalarını azalttığı gözlemlenmiştir. Dahası, bu çalışma ile *V. agnus-castus* meyve ekstresinin matris metalloproteinaz-9 (MMP-9) miktarını azalttığı ve IL-10 miktarını artırarak nöroprotektif aktivite gösterdiğini ortaya koymaktadır [104].

4.1.4 Antidiyabetik/anti-obezite ile ilgili aktiviteler

Bir çalışmada *V. agnus-castus* meyvelerinden hazırlanmış MeOH, kloroform ve su ekstreleri, hiperlipidemi modeli oluşturulmuş Albino erkek farelere 28 boyunca günlük 500 mg/kg dozda verilmiştir. Çalışmanın sonucunda deneklerin; total kolesterol, trigliserit, LDL ve VLDL değerlerinin azaldığı görülmüştür. En etkili ekstre *V. agnus-castus* meyve-MeOH ekstresi olmuştur [105].

Bir başka çalışmada ise *V. agnus-castus*'un toprak üstü kısımlarından elde edilmiş EtOH ekstresinin ve Agnucaston® (*V. agnus castus* meyve ekstresi, BNO 1095) preparatının letrozol ile indüklenmiş PKOS (Polikistik Over Sendromu) oluşturulan dişi Wistar Albino sıçanlar üzerindeki etkisi araştırılmıştır. Deney protokolüne göre her bir ekstre 15 gün boyunca günlük 8 mg/kg dozda uygulanmıştır. Çalışmanın sonucunda her iki *V. agnus-castus* ekstresinin de PKOS'a bağlı oluşan parametreler üzerinde olumlu etki gösterdiği saptanmıştır. Total kolesterol, LDL, serum glukoz ve serum insülin değerlerinin azaldığı, HDL değerinin ise arttığı anlaşılmıştır. Çalışmada, *V. agnus-castus* toprak üstü kısımlarından hazırlanmış ekstrenin, Agnucaston® preparatına göre daha etkili olduğu gözlemlenmiştir [106].

Non-alkolik yağlı karaciğer hastalığı (NAFLD) indüklenmiş dişi Wistar sıçanlarda *V. agnus-castus* hidroalkolik meyve ekstresi uygulamasının karaciğer lipit metabolizması fonksiyonlarını düzenlediği ve dolayısıyla da NAFLD ve oksidatif stresi önlemek için potansiyele sahip olduğu sonucuna ulaşılmıştır [107].

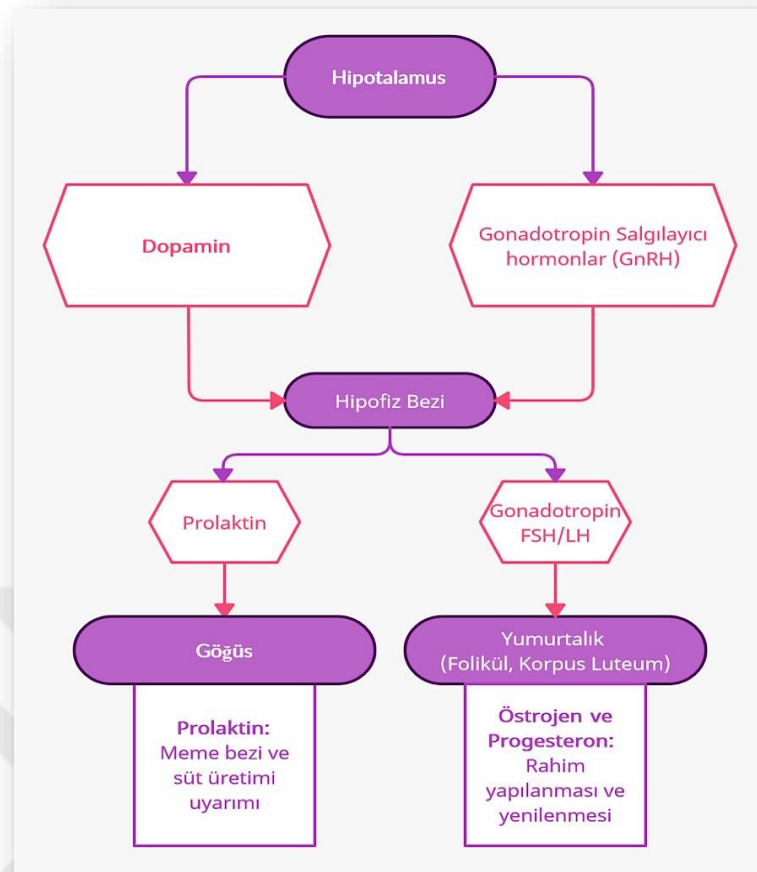
V. agnus-castus bitkisinin çiçek, yaprak, meyve, kök ve toprak üstü kısımlarından hazırlanmış MeOH ekstralarının *in-vitro* antidiyabetik etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada; çiçek (IC₅₀ değeri 2921.84 µg/mL) ve meyve (IC₅₀ değeri 2992.75 µg/mL) ekstralarında α-glukozidaza karşı, yaprak (IC₅₀ değeri 2156.80 µg/mL) ve kök (IC₅₀ değeri 2357.30 µg/mL) ekstralarında ise α-amilaza karşı daha yüksek inhibisyon görülmüştür. *V. agnus-castus* çiçek ekstresinin α-glukozidazı, yaprak ekstresinin ise α-amilazı güçlü olarak inhibe ettikleri için, anti-diyabetik etki potansiyeline sahip oldukları gözlemlenmiştir [35].

Bu çalışmaların yanı sıra; Brezilya'da yerel halk tarafından kardiyosvasküler sistemi korumak ve ateroskleroz riskini azaltmak için kullanılan bir başka hayıt türü olan *Vitex megapotamica* (Spreng.) Moldenke üzerinde yapılmış bir çalışma da bulunmaktadır. Bitkinin yapraklarından hazırlanan hidroalkolik ekstre (günlük 500 mg/kg ve 1000 mg/kg dozlarda) 30 gün boyunca dislipidemi modeli oluşturulmuş erkek farelerde uygulanmıştır. Çalışmanın sonucunda bitki ekstresinin her iki dozda da total kolesterol, LDL ve aterojenik indeks değerlerini azaltarak gerçekten de bu endikasyonlarda etkili olabileceği ortaya konulmuştur [108].

Tüm bu sonuçlar, obezitenin önlenmesi ve tedavisinde *V. agnus-castus* ekstralarının bir potansiyel vaat ettiğini ortaya koymaktadır. *V. agnus-castus* çiçek, meyve ve yaprak ekstralarının obezitenin önlenmesi ve/veya tedavisinde rolünün daha önce saptanmadığı görülmektedir. Bu bağlamda yapılacak *in vivo* çalışmalara ihtiyaç vardır.

4.1.5 *V. agnus-castus*'un kadın hastalıklarında kullanımı ile ilgili biyolojik etkiler

Kadınlarda adet döngüsünün kontrol merkezi hipotalamustur. Hipotalamus, tarafından gonadotropin salgılatıcı hormonlar (GnRH) üretilmektedir. Gonadotropin salgılatıcı hormonlar, hipofiz bezini uyarak LH (Luteinleştirici Hormon) ve FSH (Folikül Uyarıcı Hormon) üretilmesini sağlamaktadır. FSH, foliküllerin fertil yumurtalar haline gelmesini sağlayıp yumurtalıklar tarafından östrojen üretilmesini sağlayan birincil hormondur. LH ise, yumurtanın salınmasını, folikülün korpus luteuma dönüşmesini ve ardından da progesteron hormonunun üretilmesini sağlamaktadır. Adet döngüsünün ortasında östrojen en yüksek seviyeye ulaşır ve progesteron seviyeleri de yükselmeye başlar. Bu noktada FSH seviyeleri düşer ve LH seviyeleri yumurtlamaya neden olacak şekilde artar. Yumurtalıkta, korpus luteum progesteron üretir. Bu hormon, döllenmiş yumurtanın rahimde yerleşebilmesi için endometriuma yeterli kan teminini sağlar. Döllenme gerçekleşmezse korpus luteum yok olmaya başlar, hormon üretimi azalır, endometriuma yeterli kan sağlanmaz ve adet kanaması görülür. FSH ve LH seviyeleri, adet dönemine ve yeni bir adet döngüsünün başlangıcına kadar düşer. Hipotiroidizm, hipofiz adenomları, PKOS, hiperprolaktinemi, kullanılan bazı ilaçlar (antipsikotikler, antidepresanlar vb. gibi dopamin antagonistleri) gibi çeşitli nedenlerden dolayı adet döngüsü düzensizlikleri oluşabilmektedir. Kadınlarda özellikle de hiperprolaktinemi, yaygın olarak görülmektedir. Prolaktin, ön hipofiz bezi tarafından üretilen ve esas olarak kadınlarda süt üretimini sağlayan bir peptid hormonudur. Prolaktin, GnRH salgılanmasını engeller. Gonadotropin seviyeleri baskılanır. Bu sebeple hiperprolaktinemi, olduğunda kadınlarda adet döngüsü düzensizlikleri ve fertilité sorunları görülebilmektedir. *V. agnus-castus* prolaktin hormonu üretimini baskılayarak korpus luteum gelişimini artırır ve progesteron ile östrojen seviyelerini yükseltir. Folikül uyarıcı hormonu inhibe ederken, ön hipofizin LH üretimini düzenler. Hiperprolaktinemi sonucu aşırı prolaktin üretimini dopaminerjik aktivite yoluyla düzenlemektedir. Prolaktin seviyesinin azalması mastodini ve PMS semptomlarının azalmasını sağlamaktadır (Şekil 4.1) [109, 110].



Şekil 4.1: *V. agnus-castus*'un hormonlar üzerindeki etki mekanizması [109].

V. agnus-castus'un hormonlar üzerinde göstermiş olduğu bu etki temel olarak, dopamin reseptörlerine bağlanarak prolaktin hormonu üretimini baskılamasından ileri gelmektedir. Prolaktin hormonunu düşürücü etkiden sorumlu olduğu düşünülen bileşikler, hipofiz bezindeki dopamin reseptörleri ile etkileşime giren bisiklik diterpen bileşikleridir. Prolaktin inhibisyonu, hipofizdeki D2 reseptörlerine bağlanmalarıyla meydana gelir. Dopaminerjik etkiyi özellikle de bitkinin bileşiminde bulunan labdan ve klerodan iskeletine sahip bileşikler sağlamaktadır [4, 52]. *V. agnus-castus*'un gösterdiği etkiye östrojen reseptörlerine bağlanabilmesi de katkı sağlamaktadır. Östrojen reseptörünün alfa ($ESR\alpha$) ve beta ($ESR\beta$) olmak üzere iki tipi bulunmaktadır. İki reseptör proteininin de DNA bağlanma bölgesi oldukça benzer olmasına rağmen, molekülün genelindeki amino asitleri birbirinden farklıdır. Östrojen reseptörüne bağlanmanın başlıca *V. agnus-castus*'un bileşiminde yer almakta olan flavonoit bileşiklerinden ileri geldiği görülmektedir. Bir çalışmada, %70 EtOH (h/h) kullanılarak hazırlanmış *V. agnus castus* ekstresinden izole edilmiş flavonoit

bileşiklerinden apigenin, penduletin ve viteksinin ESR β 'ya bağlanarak fitoöstrojenik aktivite gösterdikleri kanıtlanmıştır. Üç bileşikten en aktif olanın apigenin olduğu tespit edilmiştir [111]. Bir başka çalışmada ise, dişi sıçanlardan alınan hipofiz bezi hücrelerinde %70 EtOH (h/h) kullanılarak hazırlanmış *V. agnus castus* meyve ekstresinden izole edilmiş apigenin ve penduletin bileşiklerinin ESR β 'ya bağlanarak fitoöstrojenik aktivite gösterdikleri kanıtlanmıştır [112]. *V. agnus castus* ekstrelerinin standardizasyonunda kullanılan kastisin bileşiğinin de ESR β 'ya bağlandığı Ye ve arkadaşları tarafından *in-vivo* ve *in-vitro* olarak yürütülmüş çalışmayla kanıtlanmıştır. Aynı çalışmada kastisinin prolaktin inhibisyonuna da yol açarak serum prolaktin hormonu miktarını düşürdüğü gözlemlenmiştir. Bu etkinin mekanizması tam olarak aydınlatılamasa da ESR β 'ya bağlanarak burada mRNA üretimini tetikleyerek gerçekleştiği düşünülmektedir [113]. Hu ve arkadaşları tarafından gerçekleştirilen *in-vivo* klinik çalışmada da kastisinin anti-hiperprolaktinematik ve analjezik aktiviteleri kanıtlanmıştır [114]. *V. agnus castus*'un son yıllarda öne sürülen diğer bir mekanizması ise opioid reseptörleri üzerindeki etkisidir. Literatürde bulunan çalışmalarla *V. agnus castus* ekstrelerinin mu (μ), kappa (κ) ve delta (δ) opioid reseptörlerine bağlanarak onları aktive ettiği ortaya konulmuştur. *V. agnus castus*'un opioid reseptörlerini aktive ederek; analjezik etki gösterdiği ve ruh halini iyileştirdiği düşünülmektedir [115, 116].

4.2 Klinik Kullanım Alanları

4.2.1 *V. agnus-castus* bitkisel ilaç olarak kullanımı

Alman Komisyon E monografına göre Agni casti fructus'dan %50-70 EtOH (h/h) kullanılarak hazırlanan sıvı veya kuru ekstre; kadınlarda PMS (Premenstrüel Sendrom), düzensiz kanama, adet görememe, adet kanamasında azalma gibi adet döngüsü düzensizlikleri ve mastodini endikasyonlarında kullanılmaktadır [3, 117].

EMA tarafından *V. agnus-castus* meyvelerinden %60 EtOH (h/h) ile hazırlanmış kuru ekstrakt (DEO 6-12:1), günlük 20 mg dozajı ile veya %50-70 EtOH (h/h) kullanılarak hazırlanmış 40 damla (0,03-0,04 ml/gün dozda) sıvı ekstrenin kullanılması önerilmektedir Bunun dışında Komisyon E ve ESCOP monograflarında tavsiye edildiği gibi 40 mg meyve droguna karşılık gelen, 4 mg etanolik ekstreler de kullanılabilir [3]. Klinik çalışmalarla *V. agnus-castus* meyve ekstrelerinin etkinliği ve güvenliği kanıtlanmıştır. Bu kapsamda, önceki "3.2.7.1 Farklı Firmaların

Hazırladığı Standardize Ekstreler ve Dozları” isimli bölümde incelenmiş olan katı ve sıvı dozaj formları kullanılmaktadır.

PMS, adet döngüsünün luteal fazı sırasında, ortaya çıkmakta olup klinik olarak önemli somatik ve psikolojik belirtileri kapsamaktadır. Dünya çapında PMS’den etkilenen üreme çağındaki kadınların yaygınlığı %47,8 dir. Bunlar arasında kadınların %20’si günlük aktivitelerini aksatacak kadar şiddetli semptomlar yaşarken, geri kalanı hafif ile orta şiddette semptomlar yaşamaktadır. PMS semptomları arasında iştahta değişiklikler, kilo alımı, karın ağrısı, sırt ağrısı, bel ağrısı, baş ağrısı, göğüslerde şişlik ve hassasiyet, mide bulantısı, kabızlık, anksiyete, sinirlilik, öfke, yorgunluk, huzursuzluk, ruh hali değişimleri ve ağlama semptomları bulunmaktadır [118]. Japonya’da 18-44 yaşlarında 83 kadının katıldığı klinik çalışmada, Prefemin® (günde 20 mg *V. agnus-castus* kuru meyve ekstresi) üç ay boyunca kullanılmıştır. Klinik çalışma sonucunda bu dönemde görülen rahatsızlık, sinirlilik, mod düşüklüğü, baş ağrısı, cilt problemleri, göğüs ağrısı, yorgunluk, uyuşukluk ve uykusuzluk semptomlarında azalma olduğu gözlemlenmiştir. Ayrıca, katılımcıların adet döngülerinin düzene girdiği de vurgulanmıştır. [119]. Bir başka çalışmada, orta ile şiddetli PMS semptomları gösteren 120 katılımcı 3 ay boyunca günde 1 kez Agnucaston® tablet (günlük 4 mg *V. agnus-castus* kuru meyve ekstresi) kullanmıştır. Katılımcıların %67,8’nin 3 aylık kullanıma yanıt verdiği ve PMS semptomlarının azaldığı görülmüştür [120]. PMS’den muzdarip 1634 katılımcının yer aldığı bir araştırmada Femicur® (4 mg *V. agnus-castus* meyve kuru meyve ekstresi, günde 2 kez), isimli preparat 3 ay boyunca kullanılarak özellikle depresyon, anksiyete, cinsel istek ve fazla sıvı tüketimi semptomları üzerindeki etkileri incelenmiştir. Çalışmanın sonunda katılımcıların %93’ünün semptomlarının azaldığı görülmüştür. Ayrıca katılımcıların %94’ünün *V. agnus-castus* ekstresine olan toleranslarının iyi olduğu bildirilmiştir [120]. Dismenore (sancılı adet ağrısı) bulunan 60 kadın katılımcıdan oluşan bir başka çalışmada; birinci grup 3 ay süreyle Agnucaston® (günlük 4 mg *V. agnus castus* kuru meyve ekstresi) kullanırken, ikinci grup Yasmin® (0,03 mg etinilestradiol/ 3 mg drospirenon) kullanmıştır. Çalışmanın sonucunda *V. agnus castus* meyve ekstresinin dismenorede bir oral kontraseptif olan etinilestradiol/drospirenon kadar etkili olduğu görülmüştür. Bu çalışmanın, oral kontraseptiflerin sahip olduğu pek çok olumsuz yan etkiler göz önünde bulundurulduğunda oldukça önemli olduğu görülmektedir [121]. Adet döngüsü düzensizliği bulunan 211 katılımcının yer aldığı bir klinik çalışmada katılımcılar, 3 ay süreyle günde 1 tablet Ze 440 (Prefemin®,

günlük 20 mg *V. agnus-castus* kuru meyve ekstresi) kullanmıştır. Çalışmanın sonucunda; dismenore, hipermenore (adet kanamasının az olması veya kısa sürmesi) ve menometroraji (ağır düzensiz adet kanaması) semptomlarının iyileştiği, katılımcıların ve hekimlerin tedaviden memnun oldukları görülmüştür [122]. Amenore (adet görememe) sorunu yaşayan 20 katılımcı, 6 ay boyunca %68 EtOH (h/h) kullanılarak 1:5 oranında hazırlanmış likit formdaki *V. agnus-castus* meyve ekstresini kullanmıştır. Çalışmayı 15 kadın tamamlamış ve aralarından 10 tanesi tekrardan adet görmeye başlamıştır [3]. Mastalji adıyla da bilinmekte olan mastodini, meme ağrısını tanımlayan tıbbi terimdir. Bu semptom hem erkeklerde hem de kadınlarda görülebilmektedir, ancak kadınlarda daha sık görülür. Üreme çağındaki kadınların üçte ikisini etkilemekte olup, çok şiddetli ağrılara yol açabilmektedir. Psikolojik bozukluklar, PMS, hiperprolaktinemi gibi hormonal bozukluklar veya meme kanseri mastodiniye yol açmaktadır [123]. *V. agnus-castus* meyve ekstrelerinin mastaljide kullanımı, Komisyon E tarafından onaylanmıştır. Mastodini ve hiperprolaktinemi bulunan 40'ar kadının yer aldığı toplamda 80 katılımcıdan oluşan bir klinik çalışmada, *V. agnus-castus* meyve ekstresinin etkinliği araştırılmıştır. Bromokriptin (dopamin agonisti, Parlodel®) tedavisi ile *V. agnus-castus* kuru meyve ekstresinin (Agnucaston®) etkinliğinin karşılaştırıldığı çalışmada katılımcılar randomize olarak ikiye ayrılarak; bromokriptin (günlük 5 mg) ya da *V. agnus-castus* meyve ekstresinin (günlük 4 mg kuru meyve ekstresi) 3 aylık uygulamasına tabi tutulmuştur. Prolaktin seviyeleri tedaviden sonra her iki grupta da önemli ölçüde azalmıştır ancak bu süre içinde Agnucaston® kullanan kadınlarda herhangi bir yan etki gözlenmezken, bromokriptin ile tedavi edilen kadınların %12,5'inde bulantı ve kusma yan etkileri görülmüştür. Çalışmanın sonucunda *V. agnus-castus* meyve ekstresinin serum prolaktin seviyelerini ve mastaljiyi azaltmada konvansiyonel olarak kullanılmakta olan bromokriptin kadar etkili olduğu, ancak hasta uyuncu ve yan etki profili açısından bromokriptin daha iyi olduğu görülmüştür [124]. Bir başka çalışmada ise, mastodiniden muzdarip 40 yaşından küçük 104 premenopozal hasta iki gruba ayrılmıştır. Birinci gruptaki katılımcılar (51 kişi) 3 ay süreyle Agnucaston® (günde 1 tablet, 4 mg kuru *V. agnus-castus* meyve ekstresi) alırken, ikinci gruptakiler (53 kişi) flurbiprofen (günde 2 tablet, 200 mg) almıştır. Sonuç olarak her iki tedavinin de mastodini semptomlarını azalttığı ortaya konulurken bu iki grup arasında istatistiksel olarak dikkate değer bir fark görülmediği anlaşılmıştır [125]. Anormal uterus kanaması, dismenore ve premenstrüel sendromla ilişkili mastodini gibi adet döngüsü

bozuklukları olan 1700 kadının yer aldığı bir klinik çalışmada katılımcılar, 3 ay boyunca günde 1 tablet Cyclodynon® (Agnucaston®, bazı ülkelerde bu isimle satışa sunulmaktadır, 4 mg *V. agnus-castus* kuru meyve ekstresi) kullanmışlardır. Çalışmanın sonucunda, düzensiz adet döngüsü bulunan hastaların yüzdesi %9,1'den %0,1'e, mastodinisi bulunan hastaların yüzdesi ise %39,9'dan %0,8'e gerilemiştir. Hastaların kanama yoğunluğu (%83,4), kanama sıklığı (%79,2) ve adet ağrılarında (%85,2) iyileşme oranları ise oldukça yüksektir [126].

V. agnus-castus ekstresinin etkisinin görülebilmesi için devamlı olarak, en az 3 ay süreyle kullanılması gerekmektedir. Genellikle de 5-7 ay boyunca kullanılması önerilmektedir. Preparatlar sabah aç karna alınmalıdır. *V. agnus-castus* oldukça güvenlidir ve bilinen önemli bir yan etkisi yoktur. Bazı çalışmalarda akne, kaşıntı, baş ağrısı, mide bulantısı, yorgunluk, ağız kuruluğu, eritematöz döküntüler ve hafif gastrointestinal şikayetleri raporlanmıştır ancak belirtilen olumsuz etkiler hafif ve geri döndürülebilir. *V. agnus-castus* bromokriptin ve metoklopramid gibi dopamin reseptörleri üzerinde etkili olan ilaçlarla etkileşime girebileceğinden birlikte kullanılmamalıdır. Antipsikotik grubu ilaçlarla beraber de kullanılmamaları gerekmektedir. Ayrıca hipofiz tümörleri bulunanlara, gebe kadınlara da kontraendikedir. *V. agnus-castus* hormonlar üzerinde etkili olduğundan, hormon tedavisi alan kişilerin kullanırken dikkatli olmaları önerilmektedir. [3, 117].

4.2.2 *V. agnus-castus* endikasyon dışı kullanımı

V. agnus-castus meyve ekstresi yukarıda belirtilen endikasyonların dışında kadınlarda; menopoz, PKOS ve fertilité sorunlarında da kullanılabilir. Literatürde bu alanda yapılmış klinik çalışmalar mevcuttur. Ayrıca geleneksel olarak kadınlarda süt üretimini arttırdığına da inanılmaktadır, hatta piyasada bu amaçla kullanıma hazırlanmış müstahzarlar da bulunmaktadır. Ancak *V. agnus-castus*'un süt üretimini sağlayan prolaktin hormonunu baskılaması dolayısıyla tam tersi etkiye neden olabileceği de düşünülmektedir. Yeterli veri olmadığından bu konu netliğe kavuşmamıştır [3, 117].

Menopoz, kadınlarda yumurtalıklardan üreme hormonları üretiminin en az 12 ay boyunca durması nedeniyle adet döngülerinin kalıcı olarak sona ermesini içeren normal bir durumdur. Bu dönemde sıcak basması, gece terlemeleri, vajinal kuruluk, uyku bozuklukları, depresyon ve anksiyete gibi semptomlar görülebilmektedir [127].

52 menopoz semptomlarından muzdarip kadın katılımcının yer aldığı bir klinik çalışmada, katılımcılar 8 hafta boyunca günlük 30 mg *V. agnus-castus* meyve ekstresi almışlardır. Çalışmanın sonunda herhangi bir yan etki oluşmamış olup somatik bozukluklarda, anskiyete ve depresyon semptomlarında azalma görülmüştür [128]. Bir başka çalışmada, yaşları 45-60 yaşlarında olan menopoz sonrası dönemde olup yüksek oranda ateş basması semptomu olan 60 kadın katılımcı likit formda bulunmakta olan *V. agnus-castus* meyve ekstresinden 8 hafta boyunca günlük 40 damla kullanmıştır. 8 haftanın ardından kontrol grubuna göre, *V. agnus-castus* kullanan gruptakilerin ateş basması semptomlarının azaldığı görülmüştür [129]. Kadınlarda progesteron hormonu seviyelerinin normalden düşük olması; yumurtalıklarda kist oluşumuna, fertilité sorunlarına veya PKOS'a sebep olabilmektedir. *V. agnus-castus* progesteron üretimini desteklediği için PKOS ve fertilité sorunlarında kullanılabileceği düşünülmektedir. Polikistik over sendromu, tipik olarak yumurtlamama, kısırlık, obezite, insülin direnci ve yumurtalarda oluşan kistlerle karakterize edilen karmaşık bir metabolik bozukluktur [130]. Bir çalışmada PKOS indüklenmiş dişi albino sıçanlara 30 günlük süreyle, %70 EtOH (h/h) kullanılarak hazırlanmış *V. agnus-castus* meyve ekstresi (250 mg/kg vücut ağırlığı/5 ml deiyonize su/gün) oral yoldan uygulanmıştır. Çalışmanın sonucunda, *V. agnus-castus* ekstresinin LH (Luteinleştirici hormon) seviyelerini belirgin şekilde düşürerek LH/FSH (Folikül Uyarıcı Hormon) oranını azalttığı ve dişi sıçanlarda ovülasyonu arttırdığı tespit edilmiştir [131]. Başka bir çalışmada, *V. agnus-castus* meyve ekstresinin günlük 365 mg/kg dozuyla dişi sıçanlara 30 gün boyunca uygulanmasının ardından LH ve testosteron seviyelerinin düşerek; FSH, progesteron ve östrojen seviyelerinin ise artarak hormonların dengelendiği sonucuna ulaşılmıştır. Ayrıca dişi sıçanlarda PKOS indüklenmesinin *KISS-1* geninin aşırı ekspresyonuna neden olduğu, ancak *V. agnus-castus* ekstresi kullanımının ardından gen ekspresyonunun normal seviyeye düştüğü gözlemlenmiştir. *V. agnus-castus* meyve ekstresi PKOS için potansiyel göstermektedir [132]. *V. agnus-castus* meyve ekstresinin fertilité üzerindeki olumlu etkilerini gösteren klinik çalışmalar da mevcuttur. Bir klinik çalışmada, prematür ovaryen yetmezlik (kadınlarda 40 yaşından önce FSH yüksekliği ve östrojen düşüklüğü) tanımlı çocuk sahibi olmak isteyen 61 kadın (21-37 yaş aralığı) katılımcıdan kontrol grubunda olan 29'u adet döneminin 3. gününden itibaren toplamda 4 gün, 5 mg letrozol kullanmıştır. Müdahale grubunda olan 32'si ise kontrol grubundakilere ek olarak günlük 40 damla sıvı *V. agnus castus* meyve ekstresini 4 ay boyunca kullanmıştır. Çalışmanın sonucunda her iki grupta da

tedavi sonrası fertilitenin bir ölçütü olan AMH (Anti-Müllerian Hormon) düzeyleri artmıştır, *V. agnus castus* kullanan müdahale grubunda, kontrol grubuna göre serum FSH ve östradiol konsantrasyonları anlamlı derecede azdır. *V. agnus-castus* grubunda hamile kalma oranı 78.1% (25/32) iken, kontrol grubunda 34.48% (10/29) olmuştur. Prematür ovaryen yetmezliği olan kadınların belirlenen doz dahilinde *V. agnus-castus* ekstresi kullanmalarının güvenli olduğu ve doğurganlığı arttırdığı kanıtlanmıştır [133]. 2006 yılında Amerika’da gerçekleştirilmiş bir klinik çalışmada, 6-36 hafta boyunca gebe kalamayan yaşları 24-42 arasında olan 93 kadın katılımcıdan 53’ü 3 ay boyunca günde 3 kapsül olacak şekilde etken maddesi *V. agnus-castus* meyve ekstresi olan Fertility Blend® isimli ürünü kullanmışlardır. Çalışmanın sonucunda, Fertility Blend® kullanan kadınlarda doğurganlık parametrelerinin plasebo grubuna kıyasla önemli derecede düzeldiği gözlemlenmiştir. Fertility Blend® grubundaki 53 kadından 17’si çalışmanın sonucunda hamile kalırken, kontrol grubundaki 40 kadından 4’ü hamile kalmıştır. *V. agnus-castus* meyve ekstresi kullanan katılımcılarda herhangi bir yan etki de gözlemlenmemiştir [134]. 2017 yılında 6 aylık süreyle gerçekleştirilen bir klinik çalışmaya ise 189 kadın (yaş ortalaması 30) katılmıştır. Katılımcılar iki tedavi grubuna ayrılmıştır. 103 katılımcıdan oluşan A grubu *V. agnus-castus* ekstresi, *Lepidium meyenii* (Maca) ekstresi ve folat kombinasyonundan oluşan patentli karışımdan günlük 1 tablet, 86 katılımcıdan oluşan B grubu ise ilk gruba ek olarak DHA ve EPA omega 3 yağ asitlerinden oluşan bir jel kapsülü de almıştır. Çalışmanın sonucunda, her iki grup arasında belirgin bir fark olmaksızın %37’lik başarılı gebelik oranı tespit edilmiştir. 6 ay boyunca yan etki tespit edilmemiştir. Çalışmanın sonucunda ovülasyon oranı %10’dan %43’e yükselmiştir [135].

5. GEREÇ ve YÖNTEM

5.1 Kimyasal Maddeler ve Çözücüler

- N-hekzan (suitable for GC – 104391; \geq %98,0 – Sigma-Aldrich)
- Dimetil sülfoksit (DMSO) (276855; \geq %99,9 – Sigma-Aldrich)
- Tripsin/EDTA solüsyonu (Wisent Bio Products)
- Fetal sığır serumu ([Fetal bovine serum] FBS) (Wisent Bio Products)
- 3-(4,5-dimetiltiyazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür (MTT) (475989; \geq %98 – Sigma-Aldrich)
- Fosfat tampon çözeltisi ([Phosphate buffer solution] PBS) (Wisent Bio Products)
- Yüksek glukozlu DMEM [Dulbecco's Modified Eagle Medium, Dulbecco'nun modifiye edilmiş Eagle ortamı] (Wisent Bio Products)
- F12 Hücre Kültürü Besiyeri [F12 cell culture medium] (Wisent Bio Products)
- Etanol (absolute, suitable for HPLC - 34852-M; \geq %99,8 – Sigma-Aldrich)
- Dihidrokapaisin (M1022; \geq %97 – Sigma-Aldrich)
- Formik asit (for analysis Emsure® - 100264; %98-100 – Merck)
- Metanol (suitable for HPLC - 34860; \geq %99,9 – Sigma-Aldrich)
- Kastisin (phyproof® Reference Substance - PHL89173; \geq %95.0% – Merck)
- Asetonitril (suitable for HPLC, gradient grade-34851; \geq %99.9 – Sigma-Aldrich)
- orto-Fosforik asit (for analysis Emsure® - 100573; %85 – Supelco®)
- Gallik asit (G7384; \geq %97.5% – Sigma-Aldrich)
- Kersetin (Q4951; \geq %95 – Sigma-Aldrich)
- Folin & Ciocalteu fenol reaktifi (FCR) (F9252 – Sigma-Aldrich)
- Sodyum karbonat (223530; %99,5 – Sigma-Aldrich)

- Alüminyum klorür (206911; %98 – Sigma-Aldrich)
- Amonyum asetat (A7262; ≥%98 – Sigma-Aldrich)

5.2 *V. agnus-castus* Uçucu Yağı Üzerine Yapılan Çalışmalar

5.2.1 Bitkisel materyaller

Beyaz ve mor çiçekli *Vitex agnus-castus* bitkileri, doğal yaşam alanından, 2022 yılında Temmuz (çiçek ve yaprak) ve Eylül (meyve) aylarında Balıkesir (Burhaniye)'den toplanmıştır. Dr. Öğr. Üyesi Ebru Özdemir Nath tarafından, Türkiye ve Doğu Ege Adaları Florası (Flora of Turkey and The East Aegean Islands) 7. Cilt kullanılarak tayinleri gerçekleştirilmiştir [136]. Beyaz çiçekli bitki örneği HERA 1057 koduyla, mor çiçekli bitki örneği HERA 1061 koduyla Altınbaş Üniversitesi Herbaryumun'da muhafaza edilmektedir.

Kültüre alınmış mor çiçekli *Vitex agnus-castus* bitkisi, 2022 yılında Temmuz (çiçek ve yaprak) ve Ekim (meyve) aylarında Zeytinburnu Tıbbi Bitkiler Bahçesi (İstanbul)'nden toplanmıştır. Bitki tayini Dr. Öğr. Üyesi Ebru Özdemir Nath tarafından, Türkiye ve Doğu Ege Adaları Florası (Flora of Turkey and The East Aegean Islands) 7. Cilt kullanılarak yapılmıştır [136]. Bitki materyali, Altınbaş Üniversitesi Herbaryumun'da muhafaza edilmektedir (HERA 1058).

5.2.2 Uçucu yağ eldesi ve verimleri

Balıkesir ve İstanbul'dan toplanmış bitki örnekleri gölgede kurutuldu ve ardından çiçek, yaprak ve meyveleri ayrılarak her bitki materyalinden 300 gram üç kopya halinde, 3 saat boyunca Clevenger cihazı kullanılarak Avrupa Farmakopesi 7.0 prosedürüne uygun olarak hidrodistilasyona tabi tutuldu [137]. Uçucu yağlar elde edildikten sonra, susuz sodyum sülfat (Na₂SO₄) ile suyundan kurtarıldıktan sonra analizleri yapılmak üzere 4 °C'de kahverengi şişelerde saklandı.



Şekil 5.1: *V. agnus-castus* bitkisinden uçucu yağ eldesi.

5.2.3 Uçucu yağların rölatif yoğunlukları

Elde edilen *V. agnus-castus* uçucu yağlarının rölatif yoğunlukları (d^{20}), bir piknometre (1mL) kullanılarak 20°C'de 3 tekrarlı olarak ölçülmüştür.

5.2.4 GC-FID/MS ile uçucu yağ analizi

V. agnus-castus uçucu yağları, GC-FD/MS ile analiz edilmiştir. Uçucu yağ bileşikleri, çift yönlü bir kapiler ayırıcı aracılığıyla Agilent 5977E kütle spektrometresine (Santa Clara, CA, ABD) bağlı Agilent 7890B GC-FID (Santa Clara, CA, ABD) kullanılarak tespit edilmiş ve miktarları ölçülmüştür. Agilent G4513A (Santa Clara, CA, ABD) otomatik enjektörü, 1 µL numune enjekte etmek için kullanılmıştır. DB-WAX kolonunun (60m, 0,25mm, 0,25µm) sıcaklık programı, 15 dakika boyunca 70°C'ye ayarlandıktan sonra dakikada 2°C/dk hızla artacak şekilde 180°C'ye yükseltilmiştir. Kolon sıcaklığı, 180°C'de izotermal sıcaklıkta 5 dakika boyunca beklenildikten sonra, dakikada 5°C/dk hızla artacak şekilde 230°C'ye çıkarılmıştır. Daha sonra, izotermal kolon sıcaklığı 15 dk boyunca 230 °C olarak ayarlanmıştır. Analiz süresi toplamda 100 dakikadır. Taşıyıcı gaz olarak helyum kullanılmıştır (sabit akış hızı 1,5 mL/dakika). 1:50'lik bir split oranı seçilmiştir. Enjektör portu, kuadropol, MSD transfer hattı, iyon kaynağı ve FID sıcaklıkları sırasıyla 220 °C, 150 °C, 250 °C, 230 °C ve 220 °C dir. Kütle spektrumları 70 eV'de kaydedilmiştir. H₂ akışı 30 mL/dk, FID hava akışı 400 mL/dk, mass aralığı ise 45-450 m/z olarak ayarlanmıştır [138].

Wiley Mass Spectral Data Registry, 9th edition (Nisan 2011) ve NIST 11 Mass Spectral Library (NIST11/2011/EPA/NIH) kullanılarak elde edilen kütle spektrumları karşılaştırılarak uçucu yağların kimyasal bileşikleri tespit edilmiştir. GC-FID/MS'de aynı koşullarda, üç ayrı eş zamanlı oto-enjeksiyon gerçekleştirilmiştir. Bileşiklerin tanımlanma yöntemleri; DB-WAX kolonu üzerindeki bileşiklerin rölatif alıkonma

indislerine (RRI) dayanmaktadır, FID verileri kullanılarak elde edilen doymuş n-alkan serisine göre (C₇-C₄₀) hesaplamalar yapılmıştır. Elde edilen sonuçların değerlendirilmesi, literatürde yer almakta olan çalışmalar ve NIST online web kütüphanesi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Relatif yüzdelere, temsili bileşiklerin GC-FID analizlerinden türetilen kalibrasyon eğrileri kullanılarak hesaplanmıştır [138, 139].

5.2.5 *In-vitro* sitotoksite testi

Çalışma sırasında kullanılan insan meme adenokarsinomu hücresi (MCF-7, HTB-22) ve insan alveolar adenokarsinom hücresi (A549, CCL-185) hatları, Amerikan Tipi Kültür Koleksiyonundan (ATCC) elde edilmiştir. Her iki hücre hattı, FBS (%10) ve antibiyotik (100 U/mL penisilin ve 100 mg/mL streptomisin) eklenerek DMEM: F12 (1:1) hücre kültürü besiyeri ortamında büyütülmüştür. Hücreler 37 °C'de, %5 CO₂'de ve %90 nem içeren bir ortamda inkübe edilmiştir. Daha sonra, 96 kuyulu bir plakaya 1x10⁴ hücre/100 µL olacak şekilde hücre ekimi gerçekleştirilmiştir. Hücrelerin plakada tutunmaları için 24 saat inkübasyonundan sonra farklı konsantrasyonlarda taze DMSO ile çözülmüş *V. agnus-castus* örnekleri eklenmiştir. Hücreler, örnekler 24 saat boyunca maruz bırakılmıştır, ardından her kuyucuğa 20 µL MTT çözeltisi (0,5 mg/mL) eklenmiş ve 3 saat daha inkübe edilmiştir. Daha sonra kuyucuklarda bulunan MTT içeren besiyeri dökülerek her bir kuyucuğa 100 µL DMSO eklenmiştir. Çözülmüş formazan kristallerinin absorbansı (OD), 590 nm'de bir Thermofisher mikro plaka okuyucusu (Massachusetts, ABD) ile ölçülmüştür. %1 oranında DMSO'ya maruz bırakılan hücreler ve %1 triton-x 100'e maruz bırakılan hücreler sırasıyla negatif (büyüme) ve pozitif kontrol grupları olarak kabul edildi. Canlılık ve ölüm oranları negatif kontrol ile karşılaştırılarak hesaplandı. Çalışma üç tekrarlı olarak üç ayrı günde uygulandı (n=3x3). Farklı konsantrasyonlardaki hücre ölüm oranları (%) ortalama±standart sapma (SD) olarak ifade edildi ve sonuçlar hücrelerin yarısında ölüme neden olan konsantrasyon, yarı maksimum inhibitör konsantrasyonu (IC₅₀) olarak ifade edildi. IC₅₀ değeri hesaplamasının yapılamadığı durumlarda ise bu etkiden sorumlu olan konsantrasyon ile maksimum hücre ölümü oranı olarak gösterilmiştir [140].

5.3 *V. agnus-castus* Ekstresi Üzerine Yapılan Çalışmalar

5.3.1 Bitkisel materyal

Çalışmada kullanılan mor çiçekli *Vitex agnus-castus* bitkisi, 2022 yılında Temmuz (çiçek ve yaprak) ve Eylül (meyve) aylarında Balıkesir (Burhaniye)'den toplanmış olup Dr. Öğr. Üyesi Ebru Özdemir Nath tarafından, Türkiye ve Doğu Ege Adaları Florası (Flora of Turkey and The East Aegean Islands) 7. Cilt kullanılarak tayin edilmiştir [136]. Bitki örneği, Altınbaş Üniversitesi Herbaryumun'da muhafaza edilmektedir (HERA 1061).

5.3.2 *V. agnus-castus* çiçek, yaprak ve meyve ekstralarının hazırlanması

10 g *V. agnus-castus* mor çiçeği (10:100, %70 EtOH), 10 g *V. agnus-castus* yaprağı (10:100, %70 EtOH) ve 10 g *V. agnus-castus* meyvesi (10:100, %70 EtOH) tartıldı ve belirtilen çözücülerle 1 gün boyunca maserasyona bırakıldı. Whatman® Grade 1 filtre kâğıdı kullanılarak filtrelenen ekstraktların çözücülerini döner buharlaştırıcı (Heidolph Rotary Evaporator, Germany) kullanılarak uzaklaştırıldı [3].

5.3.3 Ekstrelerin sıvı kromatografisi ve yüksek rezolüsyonlu kütle spektrometresi (LC-HRMS) ile fenolik bileşiklerinin tayin edilmesi

Elde edilen *V. agnus-castus* kuru mor çiçek, yaprak ve meyve ekstralarının her biri tartılarak (250 mg) 10 ml MeOH içerisinde çözülüp, sonike edilmiştir. Ardından, çözeltiler 0,45 µm Millipore MillexHV filtreden geçirilmiştir. Standart dihidrokapsaisin, LC-HRMS ölçümleri için internal standart olarak kullanılmıştır. 1,000 ppm'lik stok dihidrokapsaisin/MeOH çözeltisinden 30 µL alınarak ekstre numuneleri üzerine eklenmiştir. Son olarak numuneler, cihaza enjekte edilmek üzere vialer (1 mL) alınmıştır.

LC-HRMS ölçümleri için, Thermo ORBITRAP Q-EXACTIVE (Bremen, Almanya) kütle spektrometresi donanımlı ESI iyon kaynağı ve Dionex sıvı kromatografisi (LC) sistemi kullanılmıştır. Tarama aralığı m/z 100-900 amu olarak programlanmıştır. Diğer kütle parametreleri ise sırasıyla: gaz akış hızı: 45, yardımcı gaz akış hızı: 10, püskürtme voltajı: 3,80 kV, kapiler sıcaklık: 320 °C, yardımcı gaz ısıtıcı sıcaklığı: 320 °C ve S-lens RF 50 olacak şekilde ayarlanmıştır. Analiz sırasında, Troyasil C18 kolonu (150 x 3 mm iç çap, 5 µm partikül boyutu, İstanbul, Türkiye) kullanıldı. Mobil faz A %1 formik asit-su çözeltisi iken, Mobil faz B %1 formik asit-metanol çözeltisiydi.

Gradyan programı: 0-1,00 dk %50 A ve %50 B, 1,01-6.00 dk %100 B ve son olarak 6,01-15 dk %50 A ve %50 B şeklindedir. Mobil fazın akış hızı 0,35 mL/dak olup kolon sıcaklığı 22°C'ye ayarlanmıştır. Ortam koşulları sıcaklık $22,0 \pm 5,0$ °C ve bağıl nem (50 ± 15) % rh olarak seçilmiştir. Bileşiklerin tanımlanması, standart bileşiklerin alıkonma süreleri ve Bezmialem Vakıf Üniversitesi İlaç Uygulama ve Araştırma Merkezi Kütüphanesi verilerinin karşılaştırılmasıyla gerçekleştirilmiştir [141].

5.3.4 *In-vitro* sitotoksite testi

“5.2.5 *In-vitro* sitotoksite testi” başlığında yer almakta olan yöntem kullanılmıştır.

5.4 Ege Bölgesi Hayıt (*Vitex agnus-castus* L.) Popülasyonlarının Bazı Agromorfolojik ve Biyokimyasal Özelliklerinin Belirlenmesi TAGEM (Tarımsal Araştırmalar ve Politikalar Genel Müdürlüğü) Projesi Kapsamında Yapılan Çalışmalar

5.4.1 Bitkisel materyaller

Tezin bu bölümünde yer alan *V.agnus-castus* bitki örnekleri, T.C. Tarım ve Orman Bakanlığı Ege Tarımsal Araştırma Enstitüsü ile ortaklaşa çalışılan “Ege Bölgesi Hayıt (*Vitex agnus-castus* L.) Popülasyonlarının Bazı Agromorfolojik ve Biyokimyasal Özelliklerinin Belirlenmesi” isimli proje kapsamında TAGEM tarafından toplanmıştır. 95 farklı bölgeden gelmekte olan *V. agnus-castus* meyve örnekleri aşağıda yer almakta olan Tablo 5.1’de gösterilmiştir. Örneklerin kastisin analizleri tamamlandıktan sonra en yüksek miktarda kastisin bileşiği içeren ilk 10 drog (57, 111, 70, 13-40, 49, 60, 65, 47, 28 ve 69 kodlu örnekler), 1 sene sonrasında 2022 yılında TAGEM tarafından tekrar toplanmıştır.

Tablo 5.1: “Ege Bölgesi Hayıt (*Vitex agnus-castus* L.) popülasyonlarının bazı agromorfolojik ve biyokimyasal özelliklerinin belirlenmesi” isimli TAGEM projesi kapsamında çalışılan *V. agnus-castus* örnekleri.

Örnek Kodu	Toplanma Yılı	Toplanma Bölgesi
1	2021	Aydın, Çine
2	2021	Aydın, Çine
3	2021	Aydın, Çine
4	2021	Aydın, Çine
6	2021	Aydın, Çine
13-40	2021, 2022	Aydın, Çine
15	2021	Aydın, Karpuzlu

Tablo 5.2 (devamı): “Ege Bölgesi Hayıt (*Vitex agnus-castus* L.) popülasyonlarının bazı agromorfolojik ve biyokimyasal özelliklerinin belirlenmesi” isimli TAGEM projesi kapsamında çalışılan *V. agnus-castus* örnekleri.

48	2021	Balıkesir, Ayvalık
67	2021	Çanakkale, Ayvacık
77	2021	İzmir, Menderes
73	2021	İzmir, Menderes
76	2021	İzmir, Menderes
78	2021	İzmir, Menderes
81	2021	Muğla, Yatağan
89	2021	Muğla, Milas
95	2021	Muğla, Ula
41	2021	İzmir, Aliağa
103	2021	Manisa, Salihli
91	2021	Muğla, Milas
80	2021	Muğla, Yatağan
11	2021	Aydın, Çine
45	2021	İzmir, Dikili
46	2021	İzmir, Dikili
25	2021	Aydın, Karpuzlu
44	2021	İzmir, Aliağa
104	2021	Manisa, Salihli
87	2021	Muğla, Milas
85	2021	Muğla, Milas
23	2021	Aydın, Karpuzlu
63	2021	Çanakkale, Ayvacık
98	2021	Muğla, Köyceğiz
82	2021	Muğla, Yatağan
84	2021	Muğla, Milas
64	2021	Çanakkale, Ayvacık
8	2021	Aydın, Çine
42	2021	İzmir, Aliağa
100	2021	Aydın, Koçarlı
53	2021	Balıkesir, Burhaniye
33	2021	İzmir, Kaynaklar
86	2021	Muğla, Milas
79	2021	Aydın, Karpuzlu
38	2021	İzmir, Menderes
55	2021	Balıkesir, Burhaniye
34	2021	İzmir, Kaynaklar
74	2021	İzmir, Menderes
35	2021	İzmir, Kaynaklar
59	2021	Balıkesir, Burhaniye
17	2021	Aydın, Karpuzlu
43	2021	İzmir, Aliağa
102	2021	İzmir, Aliağa
22	2021	Aydın, Karpuzlu
60	2021, 2022	Balıkesir, Burhaniye
94	2021	Muğla, Ula
54	2021	Balıkesir, Burhaniye
109	2021	Balıkesir, Gömeç
49	2021, 2022	Balıkesir, Ayvalık
90	2021	Muğla, Milas

Tablo 5.3 (devamı): “Ege Bölgesi Hayıt (*Vitex agnus-castus* L.) popülasyonlarının bazı agromorfolojik ve biyokimyasal özelliklerinin belirlenmesi” isimli TAGEM projesi kapsamında çalışılan *V. agnus-castus* örnekleri.

37	2021	İzmir, Menderes
58	2021	Balıkesir, Burhaniye
69	2021, 2022	Çanakkale, Ayvacık
39	2021	İzmir, Menderes
105	2021	Manisa, Salihli
66	2021	Çanakkale, Ayvacık
26	2021	Aydın, Karpuzlu
21	2021	Aydın, Karpuzlu
72	2021	Çanakkale, Ayvacık
70	2021, 2022	Çanakkale, Ayvacık
110	2021	Balıkesir, Gömeç
29	2021	Aydın, Koçarlı
101	2021	Aydın, Koçarlı
92	2021	Muğla, Ula
57	2021, 2022	Balıkesir, Burhaniye
75	2021	İzmir, Menderes
107	2021	Manisa, Salihli
106	2021	Manisa, Salihli
111	2021, 2022	Çanakkale, Ayvacık
71	2021	Çanakkale, Ayvacık
56	2021	Balıkesir, Burhaniye
68	2021	Çanakkale, Ayvacık
47	2021, 2022	İzmir, Dikili
97	2021	Muğla, Ula
65	2021, 2022	Çanakkale, Ayvacık
61	2021	Balıkesir, Burhaniye
32	2021	Aydın, Kuşadası
83	2021	Muğla, Yatağan
108	2021	Manisa, Salihli
28	2021, 2022	Aydın, Koçarlı
88	2021	Muğla, Milas
93	2021	Muğla, Ula
99	2021	Muğla, Köyceğiz
96	2021	Muğla, Ula
24	2021	Aydın, Karpuzlu
36	2021	İzmir, Kaynaklar
9	2021	Aydın, Çine
10	2021	Aydın, Çine

5.4.2 *V. agnus-castus* meyve ekstrelerindeki kastisin miktar tayini için kullanılan HPLC-PDA metodu

Kuru *V. agnus-castus* meyve örneklerinin kaliteleri, Türk Farmakopesi “Hayıt, Meyve” monografındaki yöntem kullanılarak kastisin bileşiği üzerinden değerlendirilmiştir.

5.4.2.1 Standart kastisin çözeltilerinin hazırlanması

Standart kastisin bileşiği MeOH içinde 0,1; 0,07; 0,05; 0,03; 0,01 ve 0,005 µg/mL'lik konsantrasyonlarda hazırlanarak, 0.45 µm'lik filtreden geçirilip viallere alınmıştır. Hesaplamalar, standart çözeltilerin fotodiyot dizisi (PDA) dedektörlü yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) cihazıyla (Shimadzu LC 5020) 348 nanometrede (nm) absorbanlarının ölçülmesiyle elde edilen kalibrasyon eğrisi ile yapılmıştır.

5.4.2.2 Kromatografik koşullar

Analizler, PDA dedektörlü Shimadzu LC 5020 cihazı ile gerçekleştirilmiştir. Kolon olarak ise GL Sciences Inc. InertSustain C-18, Serial No:22E0328078 (5 µm x 250 x 4,6 mm) kullanılmıştır. Mobil faz olarak 5,88 g/L fosforik asit çözeltisi (A) ve asetonitril (B) kullanılmıştır. Akış gradienti; 0-50 dk: %70 A–%45 A, %30 B–%55 B şeklindedir. Akış hızı 1 mL olacak şekilde 50 dakika sürmektedir. Enjeksiyon hacmi 10 µL olup, kolon sıcaklığı 25 °C'de tutulmuştur. Hesaplamalar, 348 nm dalga boyunda elde edilen kromatogramlardan yapılmıştır [142].

5.4.2.3 Ekstrelerin nicel analizi

Analiz örneklerinin hazırlanması için; her bir öğütülmüş kuru *V. agnus-castus* meyve drogundan 1 g tartılmış, ardından 25 mL %70'lik EtOH ile 30 dk boyunca sonike edilerek ekstre edilmiştir. Ekstreler süzildükten sonra hacimleri %70'lik EtOH ile 50 mL'ye tamamlanmıştır. Ekstreler, HPLC analizi için filtrelendikten sonra viala alınarak 348 nm'de absorban ölçümü yapılmıştır. Kastisin miktarı, oluşturulan kalibrasyon eğrisinin denklemi ($y = 39209360,32238x - 28411,58091$) kullanılarak hesaplanmıştır. Çalışma 3 tekrarlı olarak gerçekleştirilmiştir.

5.4.3 Total fenolik madde tayini

HPLC-PDA analizi sonuçları değerlendirildikten sonra, en yüksek kastisin içeriğine sahip 10 adet örnek belirlenmiş ve bu örneklerin total fenolik madde tayinleri gerçekleştirilmiştir.

Ekstrelerin total fenolik madde miktarları Folin-Ciocalteu metodu kullanılarak tayin edilmiştir. Gallik asit standart maddesinden, farklı konsantrasyonlarda seyreltilerek bir kalibrasyon eğrisi oluşturulmuştur. *V. agnus castus* ekstrelerinin ve gallik asit

seyreltilerinin test çözeltileri hazırlanmıştır. 104 µL distile su, 8 µL numune, 8 µL FCR ve 80 µL %7 Na₂CO₃ kullanılarak elde edilen test çözeltileri 90 dakika karanlıkta tutulmuş, ardından da absorbanları 765 nm dalga boyunda UV-Vis mikropilaka spektrofotometre (BioTek Epoch Microplate Spectrophotometer, ABD) cihazı kullanılarak ölçülmüştür. Total fenolik madde değeri, gallik asitin kalibrasyon eğrisinden elde edilen denklem ile gallik asit eşdeğeri (GAE) olarak ifade edilmiştir. Çalışma 3 tekrarlı olarak yürütülmüştür [143].

5.4.4 Total flavonoit madde tayini

HPLC-PDA analizi sonuçları değerlendirildikten sonra, en yüksek kastisin içeriğine sahip 10 adet örnek belirlenmiş ve bu örneklerin total flavonoit madde tayinleri gerçekleştirilmiştir.

Ekstrelerin total flavonoit madde miktarları alüminyum klorür (AlCl₃) kolorimetrik metodu kullanılarak tayin edilmiştir. Kersetin standart maddesinden, farklı konsantrasyonlarda seyreltilerek bir kalibrasyon eğrisi oluşturulmuştur. *V. agnus castus* ekstrelerinin ve kersetin seyreltilerinin test çözeltileri hazırlanmıştır. 134 µL distile su, 20 µL numune, 6 µL %10 AlCl₃ ve 40 µL CH₃COONH₄ kullanılarak elde edilen test çözeltileri 10 dakika karanlıkta tutulmuş, ardından da absorbanları 415 nm dalga boyunda UV-Vis mikropilaka spektrofotometre (BioTek Epoch Microplate Spectrophotometer, ABD) cihazı kullanılarak ölçülmüştür. Total flavonoit madde değeri, kersetinin kalibrasyon eğrisinden elde edilen denklem ile kersetin eşdeğeri (KE) olarak ifade edilmiştir. Çalışma 3 tekrarlı olarak yürütülmüştür [144].

5.5 In-vivo Biyolojik Aktivite Çalışması için Kullanılan Gereç ve Metodlar

5.5.1 Bitkisel materyal

In-vivo biyolojik aktivite çalışmalarında 2022 yılı Temmuz (çiçek ve yaprak) ve Eylül (meyve) aylarında Balıkesir (Burhaniye)'den toplanmış olan mor çiçekli *Vitex agnus-castus* bitkisi kullanılmıştır. Bitki, Dr. Öğr. Üyesi Ebru Özdemir Nath tarafından, Türkiye ve Doğu Ege Adaları Florası (Flora of Turkey and The East Aegean Islands) 7. Cilt kullanılarak tayin edilmiş olup, HERA 1061 koduyla Altınbaş Üniversitesi Herbaryumun'da muhafaza edilmektedir [136].

5.5.2 *V. agnus-castus* çiçek, yaprak ve meyve ekstralarının hazırlanması

V. agnus-castus bitkisinden *in-vivo* anti-obezite aktivitesi çalışmasında kullanılmak üzere 6 adet ekstre hazırlanmıştır. Kurutulmuş *V. agnus-castus* yaprak, çiçek ve meyve kısımları ayrılarak mekanik bir öğütücüde öğütülmüştür. 100 gram hayıt yaprak, çiçek ve meyveleri tartıldıktan sonra 1:10 DEO (drog/ekstre oranı) ile %70 EtOH ve %100 su çözücülerıyla 25°C’de 12 saat boyunca masere edilmiştir. Elde edilen ekstraktlar, Whatman® Grade 1 filtre kağıdından süzülüp bir Heidolph Döner Buharlaştırıcıda (Almanya) azaltılmış basınç altında, 50°C’de kuruyana kadar birer birer buharlaştırılmıştır [3, 94].

5.5.3 Total fenolik madde tayini

Elde edilen 6 adet ekstrenin total fenolik madde miktarları, “5.4.3 Total fenolik madde tayini” başlığı altında açıklanmış olan yöntem uygulanarak tespit edilmiştir.

5.5.4 Total flavonoit madde tayini

Elde edilen 6 adet ekstrenin total flavonoit madde miktarları, “5.4.4 Total flavonoit madde tayini” başlığı altında açıklanmış olan yöntem uygulanarak tespit edilmiştir.

5.5.5 LC-HRMS ile fenolik bileşen tayini

Elde edilen 6 adet ekstrenin içerdiği fenolik bileşenleri, “5.3.3 Ekstrelerin sıvı kromatografisi ve yüksek rezolüsyonlu kütle spektrometresi (LC-HRMS) ile fenolik bileşiklerinin tayin edilmesi” başlığı altında açıklanmış olan yöntem uygulanarak tespit edilmiştir.

5.5.6 *In-vivo* anti-obezite aktivite testleri

5.5.6.1 Deney protokolü

Deney hayvanları

Deney çalışmaları, Kobay Deney Hayvanları Laboratuvarı’ndan temin edilmiş 200-250 g ağırlığa sahip erkek, Wistar albino ratlar ile gerçekleştirilmiştir. Wistar albino ratlar, standart şartlar altında 12 saat aydınlık-12 saat karanlık ışık periyodunda bekletilip, standart pellet yem / su ile beslenmiştir (*ad libitum*). Deney protokolü, 10.00-18.00 arasında uygulanmıştır. Her bir grupta minimum 7 rat kullanılmıştır.

Bütün çalışmalar uluslararası etik kurallarına uygun olarak, hayvan haklarını suistimal etmeden gerçekleştirilmiştir [145].

Test numunelerinin hazırlanması

Test numuneleri, biyolojik aktivite deneylerinde kullanılmak üzere %0,5'lik sodyum karboksimetil selüloz (CMC) çözeltisi içerisinde, gerekli durumlarda ultrasonik banyoda süspansiyon edilerek, deney hayvanlarına özel mide gavajıyla oral yol ile 100 mg/kg dozda uygulanmıştır. Kontrol grubunda bulunan ratlere ise sadece, test numunelerinin hazırlanmasında kullanılan %0,5'lik CMC verilmiştir. Test numuneleri ratlere 7 hafta boyunca uygulanmıştır [145].

Referans madde

Referans madde olarak Orlistat kullanılmıştır. 5 mg/kg dozda olacak şekilde %0,5'lik CMC içerisinde süspansiyon edilerek hazırlanmıştır. Deney süresi boyunca, ratlere gastrik gavajla günde bir kez uygulanmıştır [145].

Deney grupları

Deneyler 7 hafta sürmüştür. Haftalık periyotlar halinde, kullanılan sıçanların ağırlık takipleri yapılmıştır. Her bir deney grubunda minimum 7 rat yer almaktadır. Ratler, bireysel kafeslerde barındırılmış olup 15 gruba ayrılmıştır (Tablo 5.2).

Tablo 5.4: *In-vivo* anti-obezite aktivite testlerinde yer alan deney grupları.

Gruplar	Uygulama
Kontrol grubu	%0,5'lik CMC süspansiyonu (1mL/kg/p.o.) + Standart pellet yem
Negatif kontrol grubu	%0,5'lik CMC süspansiyonu (1mL/kg/p.o.) + %40 dana eti içeren yüksek yağlı diyet yemi
Test numune grupları (6 adet)	
Hayıt yaprakları etanol-su ekstresi	%0,5'lik CMC süspansiyonu içerisinde süspansiyon edilmiş test numuneleri (100 mg/kg, p.o.) + %40 dana eti içeren yüksek yağlı diyet yemi
Hayıt yaprakları sulu ekstresi	
Hayıt çiçekleri etanol-su ekstresi	
Hayıt çiçekleri sulu ekstresi	
Hayıt meyveleri etanol-su ekstresi	
Hayıt meyveleri sulu ekstresi	
Referans madde grubu	Orlistat (5 mg/kg doz) + %40 dana eti içeren yüksek yağlı diyet yemi

5.5.6.2 Biyokimyasal analizler

Serum parametrelerinin ölçümü

7 haftalık deney süresi tamamlandıktan sonra, sıçanlar sakrifiye edilmiştir. Göğüs kafesleri açılmış ve kalplerinden alınan kan örnekleri antikoagülansız tüpe alınmıştır. Oda sıcaklığında pıhtılaşmasının beklenilmesinden sonra 1000 g'de 10 dakika santrifüj edilerek serumları elde edilmiştir. Elde edilen serumlar 1,5 mL'lik ependorf tüplere konulmuş ve ölçümler yapıncaya kadar -20 °C'de muhaza edilmiştir [145].

Elde edilen serum örneklerinde insülin (Cat. EZRMI-13K), trigliserit, HDL, LDL, adiponektin (Human Diagnostica. GmbH, Germany), leptin (Cat. EZRL-83K), serbest T₃ (DSL-10-41100), serbest T₄ (DSL-10-40100i), TNF- α , IL-1 β ve lipaz seviyeleri ticari kitler kullanılarak ölçülmüştür [146].

HDL-C tayini

Serum HDL-C seviyeleri, Dimension RL Max otoanalizör cihazı kullanılarak mg/dL cinsinden hesaplanmıştır [145]. Yöntem; esterleşmemiş kolesterolün N, N-bis (4-sulfobütil)-m-toluidin-disodyum (DSBmT) ile reaksiyona girmesi sonucu ortaya çıkan renksiz ürününün kolesterol esteraz enzimi ile renkli bileşiğe dönüştürülmesi ile oluşan HDL-C seviyesinin ölçülmesi esasına dayanmaktadır [145, 147].

LDL-C tayini

Serum LDL-C düzeyleri, Hitachi Moduler otoanalizör cihazı kullanılarak mg/dL cinsinden ölçülmüştür [145]. Yöntem; çok düşük dansiteli lipoprotein, HDL ve şilomikronların belirli koşullar altında parçalanarak LDL-C'ye dönüştürülmesi ve bundan enzim ve surfaktanlar yardımı ile renkli bileşiklerin oluşturularak absorbansının ölçülmesi esasına dayanmaktadır [145, 147].

Trigliserit tayini

Serum trigliserit seviyeleri, Dimension RL Max otoanalizör cihazı kullanılarak, bikromatik uç nokta tekniği ile mg/dL cinsinden hesaplanmıştır [145]. Lipoprotein lipaz enzimi aracılığıyla trigliseritlerden açığa çıkan gliserolün gliserol kinaz ile fosforilasyonu sonucu oluşan gliserol-3-fosfatın, gliserol-3-fosfat oksidaz enzimi ile okside olarak dihidroksiaseton fosfat ve hidrojen peroksite dönüşmesi ve bundan 4-

klorofenol ile H₂O₂ varlığında kuinoniminin oluşması, oluşan rengin 510 ve 700 nm'lerde absorbanlarının ölçülmesi ile tespit edilmektedir [145, 147].

Leptin seviyesinin ölçülmesi

Leptin düzeyleri ELISA kit ile tespit edilmiştir. Reajanlar, örnekler ve standartlar üretici talimatlarına göre hazırlanmıştır. Kuyucuklara 100 µL eklenerek 1 saat inkübe edilmiştir. Ardından, kuyucuklar boşaltılmış, yıkama çözeltisi ile yıkandıktan sonra kuyucuklara 100 µL biotinle işaretlenmiş antikor çözeltisi eklenmiş ve 1 saat inkübe edilmiştir. Kuyucuklar yıkama çözeltisi ile 3 kez yıkanmıştır. Daha sonra üzerine 100 µL streptavidin-HRP konjugatı eklenerek 30 dakika inkübe edilmiş ve yıkanmıştır. Yıkamadan sonra 100 µL substrat çözeltisi ilave edilerek 10 dakika inkübe edilmiş ve son olarak 100 µL durdurma çözeltisi ilave edilerek 450 nm'de okuma yapılmıştır [145].

IL-1 β ve TNF- α seviyelerinin ölçümü

IL-1 β ve TNF- α düzeyleri ELISA kitlerin kullanılması ile tespit edilmiştir. Reajanlar, örnekler ve standartlar üretici talimatlarına göre hazırlanmıştır. 96 kuyucuklu plakanın her bir kuyucuğuna, 100 µL standart ve test numunesi konulmuştur. 37 °C'de 2 saat inkübasyona bırakıldıktan sonra her bir kuyucuktan sıvılar çıkarılmış ve kuyucuklara 100 µL biotin antikor ilave edilerek 37 °C'de 1 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresinin ardından kuyucuklar 3 kez yıkama çözeltisi ile yıkanmıştır. Ardından, kuyucuklar boşaltılmış ve her bir kuyucuğa 100 µL yaban turpu peroksidazı (HRP)-avidin ilave edilerek tekrar 37 °C'de 1 saat inkübasyona bırakılmıştır. Kuyucuklar boşaltılarak 5 kez yıkama çözeltisi ile yıkandıktan sonra 90 µL 3,3',5,5'-tetrametilbenzidin (TMB) substratı eklenmiş, 37 °C'de 30 dakika karanlık ortamda inkübasyona bırakılmıştır. Son olarak 50 µL durdurma çözeltisi ilave edilerek 450 nm'de ELISA mikropłaka okuyucu ile okuma yapılmıştır [145].

Lipaz enzim inhibisyonu tayini

Test numuneleri 0,1 M Tris-HCl tamponu (pH=8.0) ile mikropłaklardaki son konsantrasyonları 25, 50, 100, 200 ve 400 µg/mL olacak şekilde seyreltilmiştir. Lipaz enzim inhibisyon düzeyleri, substrat olarak *p*-nitro fenil butirat (*p*-NPB) (CAS:2635-84-9)'ın kullanıldığı modifiye metot ile tespit edilmiştir [148-150]. Lipaz inhibitörü etki gösteren orlistat, referans madde olarak seçilmiştir. Orlistat, son konsantrasyonları

6,25; 12,5; 25; 50 ve 100 µg/mL olacak şekilde mikroplaktaki tampon çözelti ile dilüe edilmiştir. Örneklerin absorbans ölçümleri spektrofotometrede, 405 nm dalga boyunda 96 kuyucuklu mikropalak kullanılarak yapılmıştır. Her bir örneğe ait, her bir konsantrasyon 3 paralel olarak çalışılmıştır [145].

Deney sonucunda belirlenen % enzim inhibisyon değerleri ve ait oldukları konsantrasyonun logaritması (ordinat ve absis) şeklinde grafiğe aktarılmıştır. Oluşturulan grafik denkleminde örneklerin, lipaz enzim üzerine olan IC₅₀ değerleri tespit edilmiştir. Çalışılan doz aralığı dışında IC₅₀ değerine sahip olan örnekler, lipaz inhibitör etkili olarak değerlendirilmemiştir [145].

İstatiksel analiz

Çalışma sona erdikten sonra ratlerin; haftalık ağırlıkları, haftalar arası ağırlık farkları ve haftalar arası % ağırlık değişimleri, biyokimyasal parametrelere ait veriler istatistiksel ortalama±standart sapma olarak hesaplanmıştır. İstatistiksel analizler için GraphPad Prism 6.0 (San Diego, CA, ABD) programı kullanılmıştır. Tüm parametrelerde ANOVA testi yapılmış ve ardından Dunnett testi uygulanmıştır [145].

6. BULGULAR ve TARTIŞMA

6.1 *V. agnus-castus* Uçucu Yağı Üzerine Yapılan Çalışmalarla İlgili Bulgular

6.1.1 Uçucu yağ verimleri ve rölatif yoğunlukları

V. agnus-castus meyvesinden elde edilen uçucu yağların; hem Balıkesir hem de İstanbul bölgelerinde en yüksek verime ($1,37\pm 0,04$ mL/100 g ve $1,09\pm 0,06$ mL/100 g) sahip olduğu görülmüştür. Çiçeklerden elde edilen uçucu yağların ise en düşük verime ($0,38\pm 0,07$ mL/100 g, $0,44\pm 0,19$ mL/100 g ve $0,50\pm 0,00$ mL/100 g) sahip olduğu tespit edilmiştir. Elde edilen uçucu yağların bölgeleri, örnek kodları, % verimleri (mL/100 g) ve rölatif yoğunlukları (g/L) Tablo 6.1’de yer almaktadır.

Tablo 6.1: *V. agnus-castus* uçucu yağı parametreleri.

Bitki bölümü	Bölge	Örnek kodu	% Verim (mL/100 g)	Rölatif Yoğunluk (g/L)
Çiçek	Balıkesir (Burhaniye)	BBÇ (beyaz çiçekli bitki)	$0,38\pm 0,07$	$0,84\pm 0,08$
	Balıkesir (Burhaniye)	BMCÇ (mor çiçekli bitki)	$0,44\pm 0,19$	$0,90\pm 0,09$
	İstanbul (Zeytinburnu)	İMÇ (mor çiçekli bitki)	$0,50\pm 0,03$	$0,86\pm 0,05$
Yaprak	Balıkesir (Burhaniye)	BMY (mor çiçekli bitki)	$0,59\pm 0,02$	$0,87\pm 0,12$
	İstanbul (Zeytinburnu)	İMY (mor çiçekli bitki)	$0,63\pm 0,12$	$0,86\pm 0,04$
Meyve	Balıkesir (Burhaniye)	BMM (mor çiçekli bitki)	$1,37\pm 0,04$	$0,85\pm 0,02$
	İstanbul (Zeytinburnu)	İMM (mor çiçekli bitki)	$1,09\pm 0,06$	$0,86\pm 0,05$

6.1.2 Uçucu yağların GC-FD/MS sonuçları

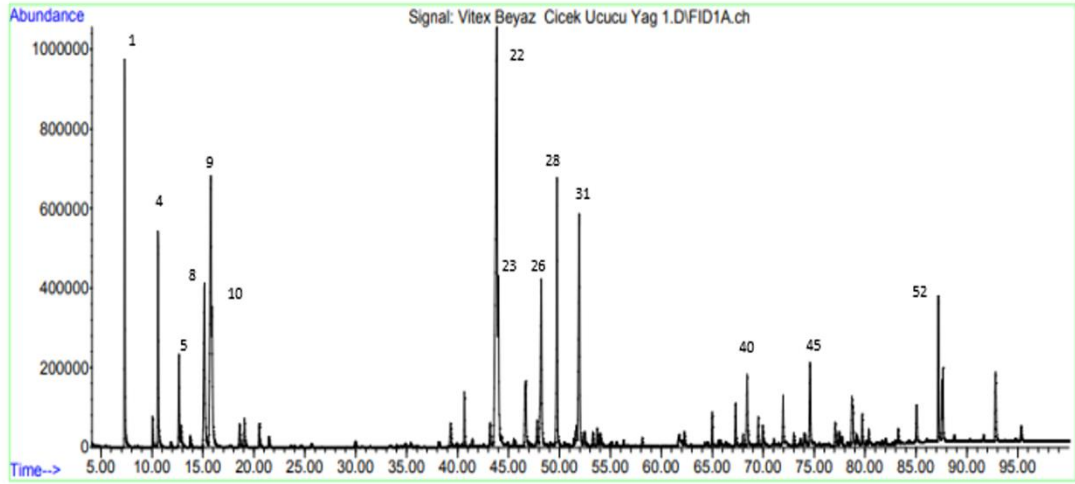
V. agnus-castus çiçek, yaprak ve meyve uçucu yağlarının analizinde toplam 54 bileşik belirlenmiştir. Tespit edilen bileşenler uçucu yağların %96,8-100'ünü oluşturmaktadır. Elde edilen uçucu yağların GC-FD/MS analizi ile belirlenen kimyasal kompozisyonları, Tablo 6.2’de yer almaktadır.

Tablo 6.2: *V. agnus-castus* uçucu yağlarının kimyasal kompozisyonları (%).

No	Bileşik	KI ^a	RAİ ^b	BBC	BMC	İMC	BMY	İMY	BMM	İMM
1	α -Pinen	1018-1032	1026	7,4±0,1	15,7±0,1	7,4±0,1	13,1±0,1	4,6±0,1	21,8±0,1	0,9±0,1
2	α -Tujen	1020-1035	1028	-	-	-	-	-	-	0,8±0,1
3	β -Pinen	1102-1118	1113	0,5±0,1	0,8±0,1	0,7±0,1	1,1±0,1	1,2±0,1	1,2±0,1	1,1±0,1
4	Sabinen	1115-1132	1125	4,1±0,1	8,1±0,1	20,1±0,1	11,4±0,1	23,5±0,1	16,6±0,1	37,3±0,1
5	Mirsen	1155-1169	1160	1,9±0,1	3,0±0,1	2,4±0,1	2,7±0,1	2,2±0,1	3,5±0,1	1,9±0,1
6	α -Felandren	1160-1176	1168	0,4±0,1	0,9±0,1	0,6±0,1	0,6±0,5	0,3±0,01	1,3±0,1	-
7	α -Terpinen	1170-1188	1181	-	0,5±0,1	0,8±0,1	0,9±0,1	1,1±0,1	0,6±0,1	0,8±0,1
8	Limonen	1190-1204	1203	5,3±0,1	7,3±0,1	2,6±0,1	6,0±0,1	1,6±0,1	7,3±0,1	0,9±0,1
9	1,8-Sineol	1203-1220	1213	9,3±0,1	9,3±0,1	9,5±0,1	17,6±0,1	26,6±0,1	16,0±0,1	17,3±0,1
10	β -Felandren	1202-1218	1217	3,5±0,1	4,6±0,1	3,2±0,1	4,4±0,1	-	5,1±0,1	-
11	γ -Terpinen	1238-1255	1247	0,5±0,1	0,9±0,1	1,5±0,1	1,6±0,1	2,1±0,1	1,0±0,1	1,4±0,1
12	β -Osimen, (E)-	1244-1257	1254	0,6±0,1	0,4±0,1	-	0,7±0,1	-	0,4±0,1	-
13	p-Simen	1264-1280	1275	0,6±0,1	0,5±0,1	-	0,3±0,1	-	0,3±0,1	-
14	Terpinolen	1277-1290	1284	-	0,3±0,1	0,4±0,1	0,4±0,1	0,5±0,1	0,3±0,1	0,4±0,1
15	3-metil-1-pentanol	1313-1341	1336	-	-	-	-	-	0,1±0,1	-
16	Trans-Sabinen Hidrat	1474	1464	-	-	-	-	0,2±0,1	-	0,9±0,1
17	α -Gurjunen	1523-1538	1524	0,6±0,1	0,3±0,1	0,5±0,1	0,3±0,1	0,4±0,1	0,4±0,1	0,3±0,1
18	Linalool	1537-1553	1545	1,0±0,1	0,8±0,1	0,2±0,1	0,5±0,1	0,3±0,1	0,4±0,1	-
19	Cis-Sabinen Hidrat	1556	1549	-	-	-	-	-	-	0,5±0,1
20	Terpin-1-ol	1562-1589	1568	-	-	0,2±0,1	0,2±0,1	0,2±0,1	0,1±0,1	0,2±0,1
21	trans- α -Bergamoten	1568-1583	1572	0,5±0,1	0,4±0,1	0,2±0,1	-	-	-	-
22	Karyofilen	1585-1612	1591	17,5±0,1	12,3±0,1	9,7±0,1	4,7±0,1	4,5±0,1	4,5±0,1	3,5±0,1
23	Terpinen-4-ol	1592-1611	1602	3,3±0,1	3,4±0,1	4,8±0,1	4,9±0,1	5,7±0,1	3,0±0,1	3,7±0,1
24	Alloaromadendren	1638-1661	1639	1,4±0,1	1,8±0,1	1,8±0,1	1,2±0,1	1,0±0,1	0,9±0,1	0,6±0,1
25	Sitronellil asetat	1650-1666	1663	0,6±0,1	0,6±0,1	0,4±0,1	0,3±0,1	-	0,2±0,1	0,4±0,1
26	(Z)- β -Farnesen	1638-1667	1667	4,8±0,1	2,6±0,1	8,6±0,1	0,7±0,1	3,7±0,1	1,4±0,1	5,3±0,1
27	α -Terpineol	1682-1706	1684	-	-	-	0,7±0,1	-	0,4±0,1	1,2±0,1
28	α -Terpinil asetat	1685-1709	1697	5,8±0,1	4,3±0,1	4,2±0,1	7,5±0,1	8,3±0,1	4,1±0,1	5,8±0,1
29	Germakren-D	1699-1726	1703	0,2±0,1	-	2,6±0,1	-	0,7±0,1	0,1±0,1	1,8±0,1
30	β -Bisabolen	1718-1741	1741	0,3±0,1	0,4±0,1	-	-	-	-	-
31	Bisiklogermakren	1723-1751	1747	6,3±0,1	3,9±0,1	7,9±0,1	4,8±0,1	6,3±0,1	4,9±0,1	6,0±0,1
32	Geraniil asetat	1743-1764	1757	0,3±0,1	0,4±0,1	-	-	-	-	-
33	δ -Kadinen	1746-1772	1771	0,3±0,1	-	0,4±0,1	-	-	-	-
34	Sitronellol	1756-1774	1767	0,3±0,1	0,2±0,1	-	0,3±0,1	-	0,1±0,1	0,2±0,1
35	β -Sesquifelandren	1766-1783	1784	-	0,2±0,1	-	-	-	-	-
36	Geraniol	1830-1857	1853	-	-	-	0,2±0,1	-	-	-
37	Palustrol	1931-1938	1937	0,2±0,1	-	-	0,2±0,1	-	-	-
38	Karyofilen oksit	1970-2008	1988	0,7±0,1	0,6±0,1	-	0,5±0,1	-	0,2±0,1	-
39	Ledol	2025-2057	2042	0,8±0,1	0,7±0,1	0,6±0,1	1,0±0,1	0,6±0,1	0,3±0,1	0,6±0,1
40	Germakren-D-4-ol	2000-2070	2044	1,6±0,1	1,5±0,1	0,6±0,1	0,8±0,1	0,4±0,1	-	0,2±0,1
41	Globulol	2070-2098	2088	0,5±0,1	0,2±0,1	0,2±0,1	0,3±0,1	0,2±0,1	-	-
42	Viridiflorol	2083-2104	2097	0,4±0,1	-	-	0,1±0,1	-	-	-
43	Spathulenol	2117-2144	2119	1,0±0,1	0,5±0,1	0,5±0,1	1,3±0,1	0,4±0,1	0,6±0,1	0,8±0,1
44	β -Bisabolol	2090-2189	2154	0,2±0,1	-	0,2±0,1	0,3±0,1	-	-	-
45	τ -Kadinol	2134-2191	2165	2,0±0,1	-	2,0±0,1	-	0,7±0,1	0,1±0,1	0,3±0,1
46	α -Bisabolol	2204-2232	2231	0,5±0,1	1,0±0,1	-	0,4±0,1	-	-	-
47	trans- α -Bergamotol	2241-2247	2244	0,2±0,1	-	-	0,2±0,1	-	-	-
48	α -Kadinol	2218-2255	2251	0,9±0,1	-	-	0,4±0,1	-	0,1±0,1	0,3±0,1
49	β -Eudesmol	2222-2256	2256	0,6±0,1	0,9±0,1	0,4±0,1	0,3±0,1	-	0,1±0,1	0,4±0,1
50	Karyofilladienol I	2316-2320	2316	0,2±0,1	-	-	-	-	-	-
51	Manoil oksit	2335-2376	2354	0,2±0,1	-	-	-	-	-	0,3±0,1
52	Abietatrien	2476-2530	2524	3,9±0,1	3,6±0,1	1,4±0,1	2,3±0,1	0,9±0,1	0,3±0,1	1,5±0,1
53	Fitol	2510-2633	2536	0,8±0,1	0,7±0,1	0,2±0,1	0,4±0,1	-	-	-
54	Manool	2370-2628	2542	0,9±0,1	1,0±0,1	0,1±0,1	0,6±0,1	0,2±0,1	-	0,2±0,1
55	Tetradekanoik asit (Miristik asit)	2670-2713	2700	1,6±0,1	1,4±0,1	0,4±0,1	1,1±0,1	0,3±0,1	-	0,5±0,1
	Toplam Tespit Edilen Miktar			96,8	97,9	98,9	99,0	100,0	99,4	99,6
	Monoterpen Hidrokarbonlar (1-8, 10-14)			25,3	43,5	40,1	43,8	37,4	60,0	45,9
	Monoterpen Oksitler (9, 16, 18-20, 23, 25, 27, 28, 32, 34, 36)			20,9	19,4	19,4	32,5	41,6	24,7	30,5
	Seskiteren Hidrokarbonlar (17, 21, 22, 24, 26, 29-31, 33, 35)			32,1	22,2	32,1	11,9	16,8	12,4	17,7
	Seskiteren Oksitler (37-50)			10,5	5,8	4,9	6,2	2,5	1,6	2,7
	Diterpen Hidrokarbonlar (52)			3,9	3,6	1,4	2,3	0,9	0,3	1,5
	Diterpen Oksitler (51, 53, 54)			2,0	1,8	0,4	1,1	0,2	-	0,5
	Yağ Asitleri (55, 56)			1,9	1,4	0,4	1,1	0,3	-	0,5
	Diğerleri (15)			-	-	-	-	-	0,1	-

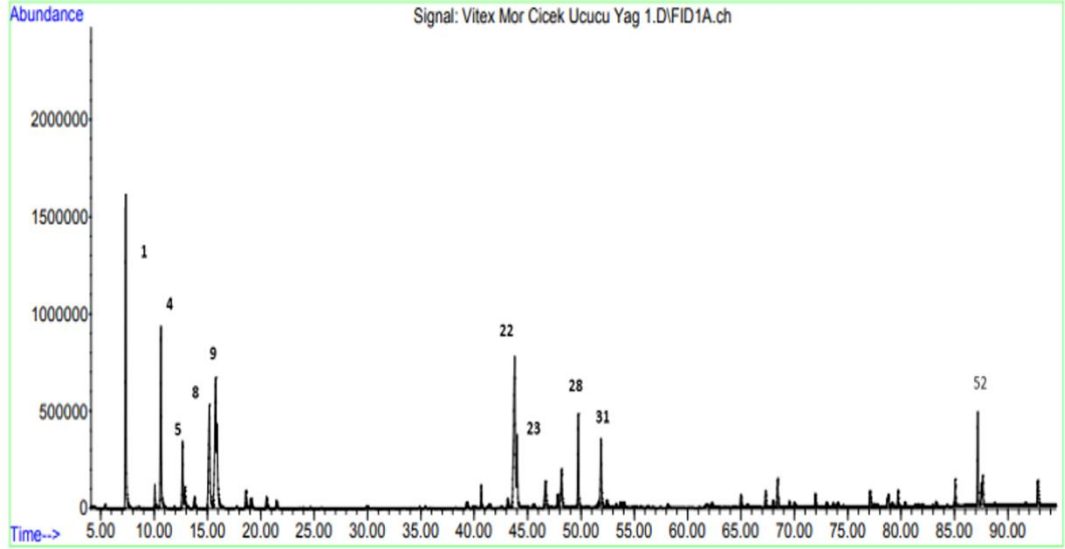
^aKI: Kovats İndeksi. Her bileşik için, alıkonma indeksi veri aralığı %50 güven aralığı ile literatürden verilmiştir [6, 151-153].^bRAİ: Rölatif Alıkonma İndeksi, n-alkan serisine karşı %FID verilerinden hesaplanmıştır.

Balıkesir bölgesinden elde edilen beyaz çiçek *V. agnus-castus* (BBÇ) uçucu yağının dört majör bileşeni karyofilen (%17,5±0,1), 1,8-sineol (%9,3±0,1), α -pinen (%7,4±0,1) ve bisiklogermakrendir (%6,3±0,1). Balıkesir bölgesinden elde edilen mor çiçek *V. agnus-castus* (BMÇ) uçucu yağının ana bileşenleri ise sırasıyla α -pinen (%15,7±0,1), karyofilen (%12,3±0,1), 1,8-sineol (%9,3±0,1) ve sabinen (%8,1±0,1) olarak tespit edilirken, İstanbul'dan elde edilen mor çiçek (İMÇ) uçucu yağının ana bileşenleri sabinen (%20,1±0,1), karyofilen (%9,7±0,1), 1,8-sineol (%9,5±0,1) ve (Z)- β -farnesen (%8,6±0,1) olarak tespit edilmiştir. Balıkesir'den elde edilen yaprak (BMY) uçucu yağında: 1,8-sineol (%17,6±0,1), α -pinen (%13,1±0,1), sabinen (%11,4±0,1) ve α -terpinil asetat (%7,5±0,1) başlıca bileşenler olarak tespit edilmiştir. Diğer yaprak uçucu yağında ise (İMY) başlıca 1,8-sineol (%26,6±0,1), sabinen (%23,5±0,1), α -terpinil asetat (%8,3±0,1) ve bisiklogermakren (%6,3±0,1) bileşikleri bulunmaktadır. Meyve uçucu yağlarına gelindiğinde ise, Balıkesir'den elde edilen meyve (BMM) uçucu yağının ana bileşenlerinin sırasıyla α -pinen (%21,8±0,1), sabinen (%16,6±0,1), 1,8-sineol (%16,0±0,1) ve limonen (%7,3±0,1) olduğu tespit edilirken, İstanbul'dan elde edilen meyve (İMM) uçucu yağının ana bileşenlerinin sırasıyla sabinen (%37,3±0,1), 1,8-sineol (%17,3±0,1), bisiklogermakren (%6,0±0,1) ve α -terpinil asetat (%5,8±0,1) olduğu anlaşılmıştır. Uçucu yağların majör bileşiklerinin yer aldığı GC-FD/MS kromatogramları Şekil 6.1-6.7'de gösterilmiştir.



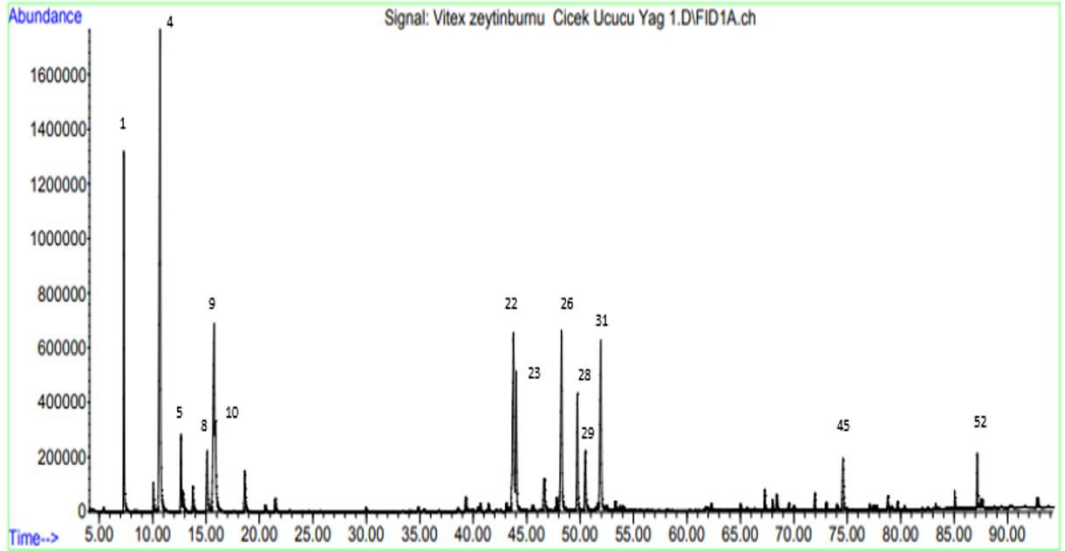
Şekil 6.1: BBÇ uçucu yağı kromatogramı.

1: α -Pinen, 4: Sabinen, 5: Mirsen, 8: Limonene, 9: 1,8-Sineol, 10: β -Felandren, 22: Karyofilen, 23: Terpinen-4-ol, 26: (Z)- β -Farnesen, 28: α -Terpinil asetat, 31: Bisiklogermakren, 40: Germakren-D-4-ol, 45: τ -Kadinol, 52: Abietatrien.



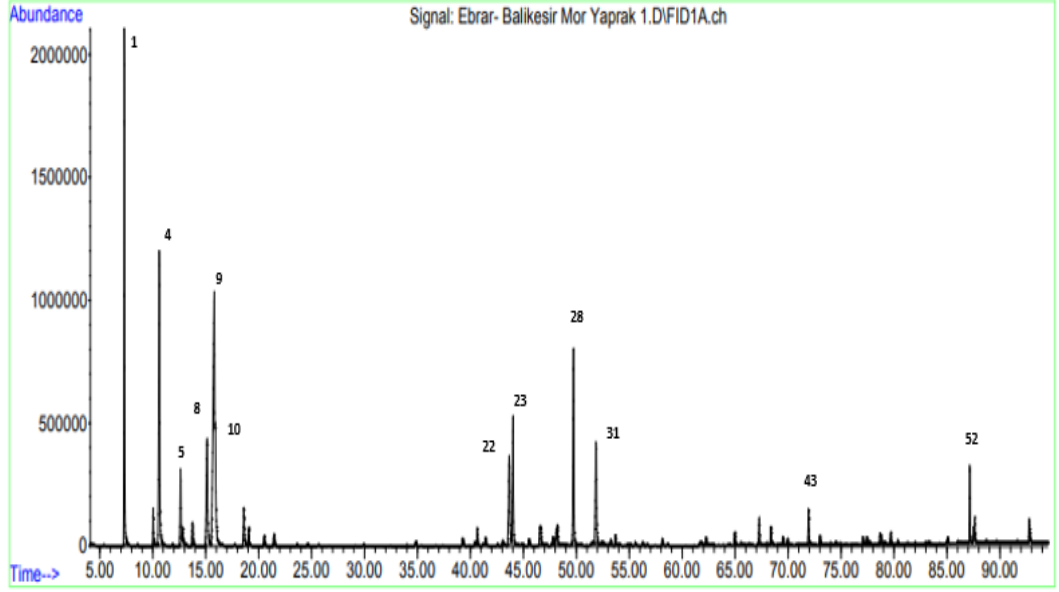
Şekil 6.2: BMCÇ uçucu yağı kromatogramı.

1: α -Pinen, 4: Sabinen, 5: Mirsen, 8: Limonen, 9: 1,8-Sineol, 22: Karyofilen, 23: Terpinen-4-ol, 28: α -Terpinil asetat, 31: Bisiklogermakren, 52: Abietatrien.



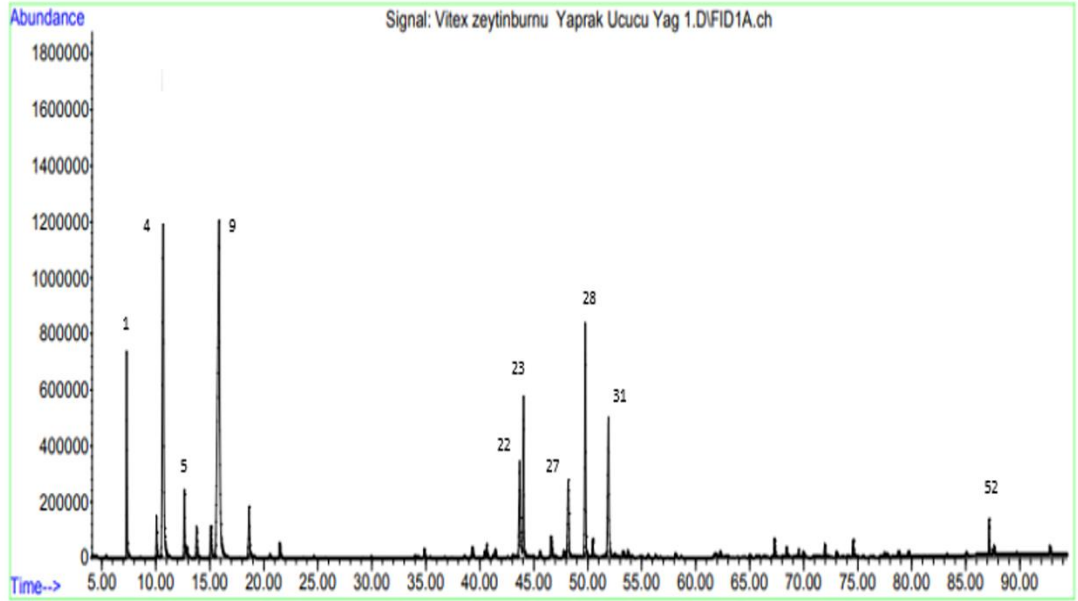
Şekil 6.3: İMÇ uçucu yağı kromatogramı.

1: α -Pinen, 4: Sabinen, 5: Mirsen, 8: Limonen, 9: 1,8-Sineol, 10: β -Felandren, 22: Karyofilen, 23: Terpinen-4-ol, 26: (*Z*)- β -Farnesen, 28: α -Terpinil asetat, 29: Germakren-D, 31: Bisiklogermakren, 45: τ -Kadinol, 52: Abietatrien.



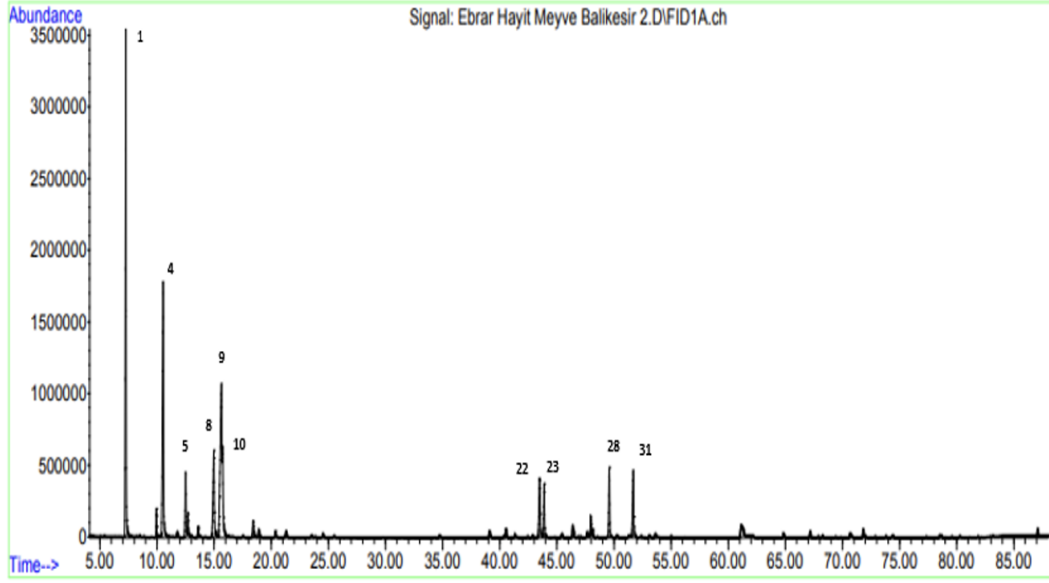
Şekil 6.4: BMY uçucu yağı kromatogramı.

1: α -Pinen, 4: Sabinen, 5: Mirsen, 8: Limonen, 9: 1,8-Sineol, 10: β -Felandren, 22: Karyofilen, 23: Terpinen-4-ol, 28: α -Terpinil asetat, 31: Bisiklogermakren, 43: Spathulenol, 52: Abietatrien.



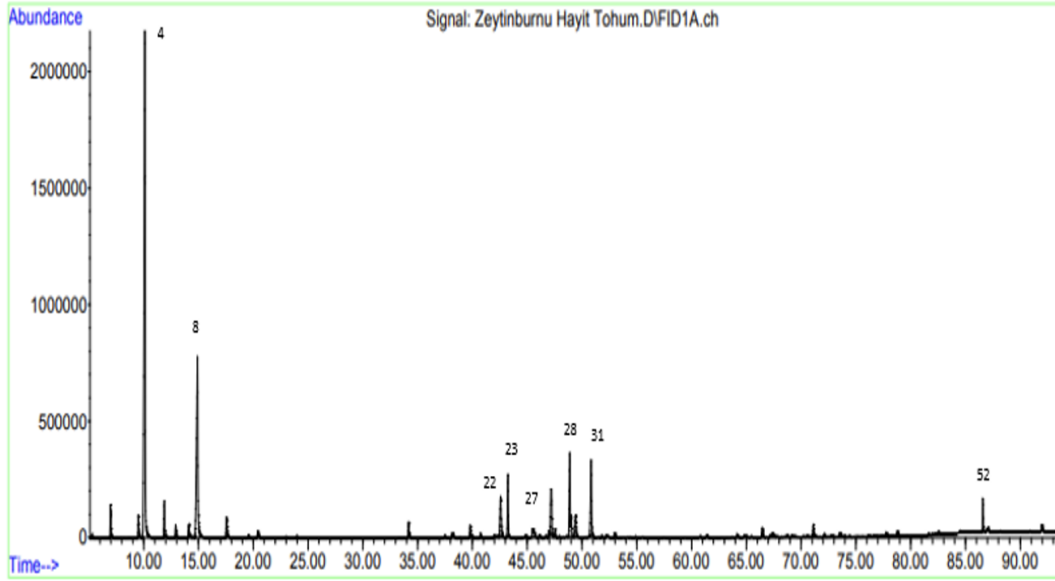
Şekil 6.5: İMY uçucu yağı kromatogramı.

1: α -Pinen, 4: Sabinen, 5: Mirsen, 9: 1,8-Sineol, 22: Karyofilen, 23: Terpinen-4-ol, 27: α -Terpineol, 28: α -Terpinil asetat, 31: Bisiklogermakren, 52: Abietatrien.



Şekil 6.6: BMM uçucu yağı kromatogramı.

1: α -Pinen, 4: Sabinen, 5: Mirsen, 8: Limonen, 9: 1,8-Sineol, 10: β -Felandren, 22: Karyofilen, 23: Terpinen-4-ol, 28: α -Terpinil asetat, 31: Bisiklogermakren.



Şekil 6.7: IMM uçucu yağı kromatogramı.

4: Sabinen, 8: Limonen, 22: Karyofilen, 23: Terpinen-4-ol, 27: α -Terpineol, 28: α -Terpinil asetat, 31: Bisiklogermakren, 52: Abietatrien.

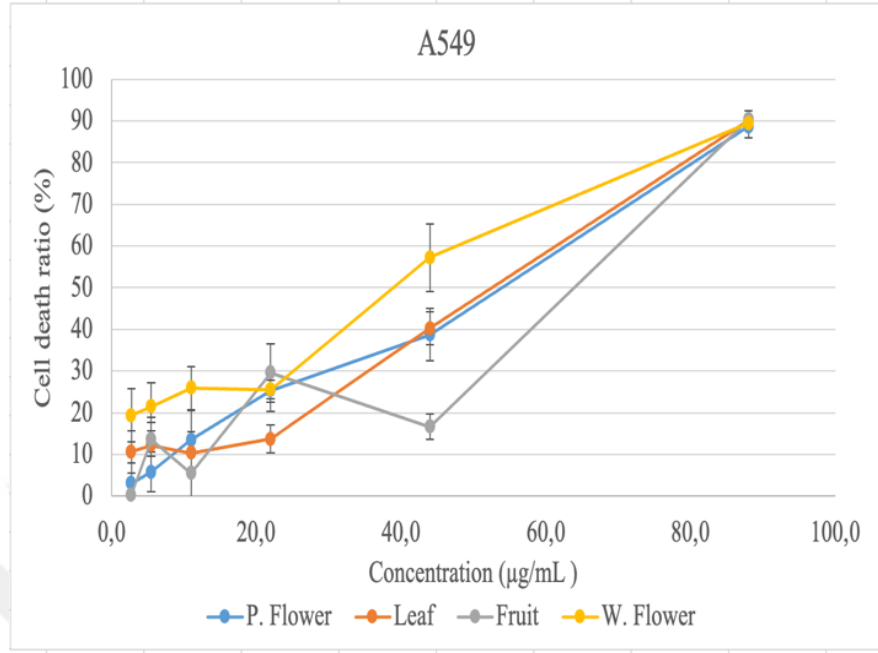
Monoterpen hidrokarbon ve monoterpen oksit bileşikleri hayıt uçucu yağlarının baskın grubunu oluşturmaktadır. Seskiterpen hidrokarbonlar, seskiterpen oksitler, diterpen hidrokarbonlar, diterpen oksitler ve yağ asitleri sırasıyla onları takip etmektedir. BMM monoterpen hidrokarbon bileşiklerini en yüksek miktarda içeren uçucu yağ olurken

(%60,0), İMY en yüksek miktarda monoterpen oksit bileşiklerine sahip olan uçucu yağdır (%41,6). BMCÇ uçucu yağıyla karşılaştırıldığında, BBCÇ uçucu yağının daha az miktarda monoterpen hidrokarbon bileşiği içermekteyken (%25,3), seskiterpen hidrokarbonlar açısından daha zengin olduğu (%32,1) görülmektedir. Elde edilen sonuçlara göre hayıt çiçek, yaprak ve meyve uçucu yağlarını birbirinden ayırt etmek mümkündür. Seskiterpen hidrokarbonlar hem yaprak hem de meyve uçucu yağlarındaki bileşiklerin %20'sinden azını oluştururken, çiçeklerden elde edilen uçucu yağlardaki bileşiklerin %20'sinden fazlasını oluşturmaktadır. Yaprak uçucu yağlarının her ikisi de (BMY, İMY), en bol bileşen olarak 1,8-sineol içermektedir, bu da onları meyve ve çiçek uçucu yağlarından ayırmaktadır. Tez kapsamında gerçekleştirilmiş olan bu çalışma, Novak ve arkadaşlarının bahsettiği, *V. agnus-castus* yaprak ve meyve uçucu yağlarında iki ayrı kemotip bulunduğu - α -pinen ve α -terpinil asetat- varsayımını desteklememektedir [33]. Literatürde bulunan güncel çalışmalar; *V. agnus-castus* bitkisinin meyve ve yaprak uçucu yağı kemotiplerinin "sabinen-1,8-sineol", " α -pinen-1,8-sineol" ve "(Z)- β -farnesene-bisiklogermakren" gibi ikili bileşiklere göre yapıldığına işaret etmektedir. Mevcut çalışma, literatürde bulunan bu alandaki güncel çalışmalarla uyumludur [59, 100, 154]. Bu tezde; Balıkesir'den (BBCÇ, BMCÇ, BMY ve BMM) elde edilen uçucu yağlar; " α -pinen-1,8-sineol" kemotipi olarak tanımlanırken, İstanbul'dan elde edilen uçucu yağlar "sabinen-1,8-sineol" kemotipi olarak tanımlanmıştır.

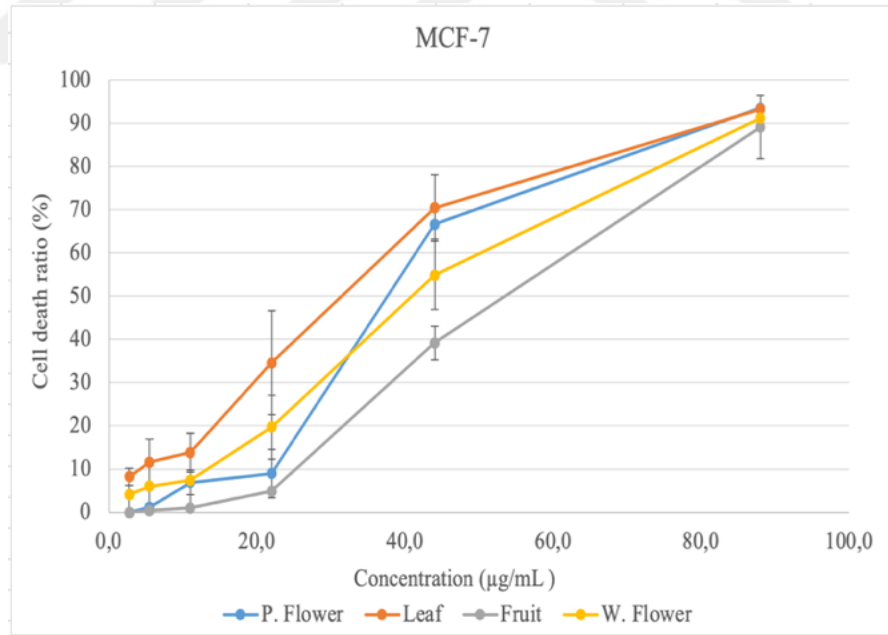
6.1.3 Uçucu yağların *in-vitro* sitotoksite testi sonuçları

V. agnus-castus uçucu yağlarının sitotoksik potansiyelini değerlendirmek için MTT testi kullanılmış olup, sonuçlar hücrelerin yarısının öldürülmesinden sorumlu olan ortalama IC₅₀ konsantrasyonu olarak belirtilmiştir. Test sonuçları ile MCF-7 hücrelerinin, A549 hücrelerine göre daha duyarlı olduğu belirlenmiştir. Balıkesir bölgesinden elde edilen uçucu yağlar MCF-7 ve A549 hücrelerinde daha potent görünmektedir. Balıkesir bölgesinden beyaz çiçek, mor çiçek, yaprak ve meyveden elde edilen uçucu yağların IC₅₀ değerleri sırasıyla A549 hücre hattında 39,39, 48,62, 49,77 ve 55,85 μ g/mL (Şekil 6.8) ve MCF-7 hücre hattında sırasıyla 45,93, 4,68, 39,2 ve 32,43 μ g/mL (Şekil 6.9) olarak hesaplanmıştır. İstanbul'dan elde edilen mor çiçek, yaprak ve meyve uçucu yağlarının IC₅₀ değerleri A549 hücre hattında sırasıyla 63,84, 75,16 ve 55,37 μ g/mL (Şekil 6.10), MCF-7 hücrelerinde ise sırasıyla 57,77, 65,08 ve

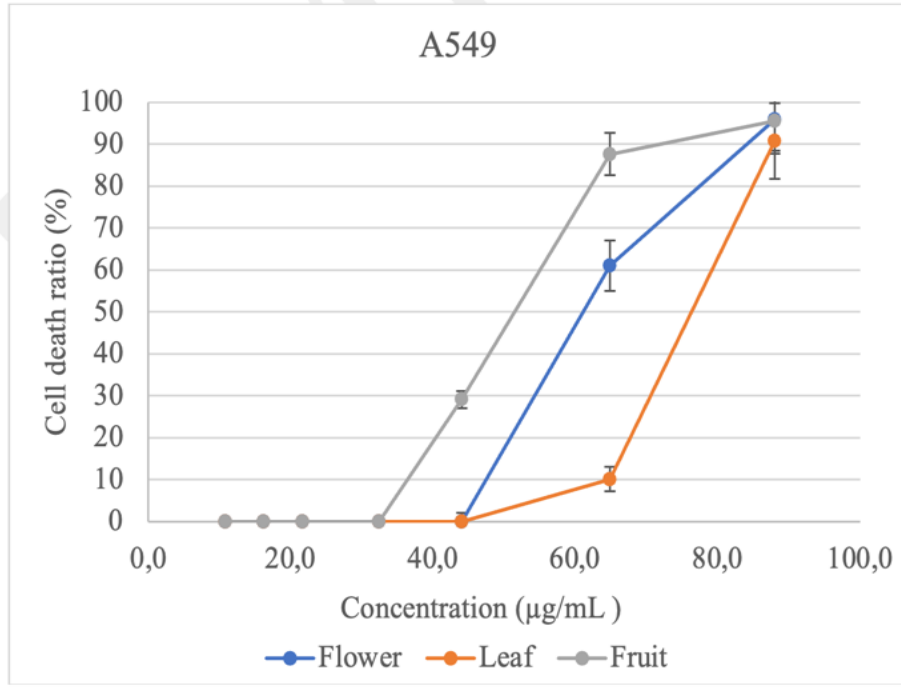
58,11 $\mu\text{g/mL}$ (Şekil 6.11) olarak hesaplanmıştır. İstanbul ve Balıkesir’den elde edilen *V. agnus-castus* uçucu yağlarının sitotoksik aktiviteleri Tablo 6.3’de gösterilmiştir.



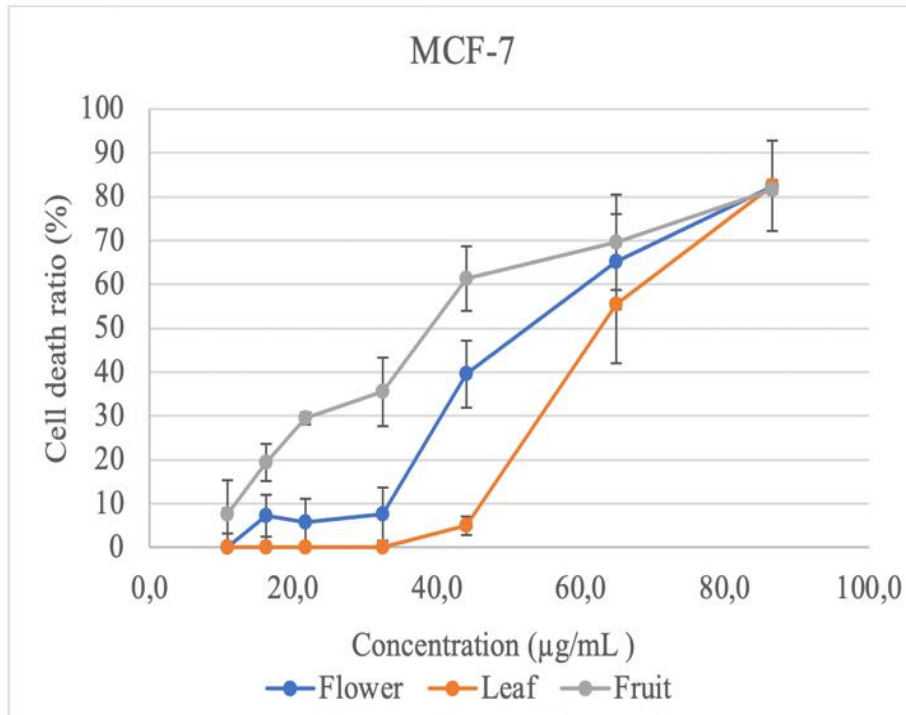
Şekil 6.8: Balıkesi uçucu yağlarının A549 hücre hattındaki sitotoksitesi.



Şekil 6.9: Balıkesir uçucu yağlarının MCF-7 hücre hattındaki sitotoksitesi.



Şekil 6.10: İstanbul uçucu yağlarının A549 hücre hattındaki sitotoksitesi.



Şekil 6.11: İstanbul uçucu yağlarının MCF-7 hücre hattındaki sitotoksitesi.

Tablo 6.3: *V. agnus-castus* uçucu yağlarının sitotoksosite (IC₅₀) değerleri.

Örnek kodu	MCF-7	A-549
BBÇ	45,93 µg/mL	39,39 µg/mL
BMÇ	4,68 µg/mL	48,62 µg/mL
İMÇ	57,77 µg/mL	63,84 µg/mL
BMY	39,2 µg/mL	49,77 µg/mL
İMY	65,08 µg/mL	75,16 µg/mL
BMM	32,43 µg/mL	55,85 µg/mL
İMM	58,11 µg/mL	55,37 µg/mL

Literatürde *V. agnus-castus* uçucu yağının sitotoksik etkisini inceleyen az sayıda çalışma bulunmaktadır, bu çalışmalarda bitkinin yaprak veya toprak üstü kısımlarına odaklanılmıştır. Zhelev ve arkadaşları tarafından yürütülen bir çalışmada *V. agnus-castus* meyve uçucu yağının HeLa, A549, ve LS180 hücre hatlarındaki etkinliği incelenmiştir. HeLa hücrelerinin *V. agnus-castus* uçucu yağına daha duyarlı olduğu görülmüş, *V. agnus-castus* uçucu yağının test edilen tüm hücre hatlarında sitotoksosite gösterdiği belirlenmiştir. IC₅₀ değeri %0,118 - 0,252 (h/h) olarak hesaplanmıştır. A549 hücre hattında, *V. agnus-castus*'un meyveli toprak üstü kısımlarından edilen uçucu yağın IC₅₀'si 90,0 µg/mL iken, aynı çalışmada bitkinin meyvesiz toprak üstü kısmından edilen uçucu yağın IC₅₀ değeri 157 µg/mL bulundu. Bir başka çalışmada MCF-7 hücre hattında, *V. agnus-castus*'un meyveli toprak üstü kısmından elde edilen uçucu yağının IC₅₀'si 70,0 µg/mL, meyvesiz toprak üstü kısmından elde edilen uçucu yağının IC₅₀ değeri ise 111,7 µg/mL olarak hesaplanmıştır. Ricarte ve arkadaşları, taze yapraklardan elde ettikleri uçucu yağın MCF-7 hücre hattında IC₅₀ değerinin 32,4 µg/mL olduğunu bildirmiştir [33, 154, 155].

Bu tez çalışması ile *V. agnus-castus* meyve uçucu yağının MCF-7 hücre hattı üzerindeki sitotoksik etkisi ilk kez incelenmiştir. MCF-7 hücre hattında, Balıkesir bölgesinden elde edilen meyve uçucu yağının IC₅₀ değeri 32,43 µg/mL olarak hesaplanırken, İstanbul bölgesinden edilen meyve uçucu yağının IC₅₀ değeri 58,11 µg/mL olarak hesaplanmıştır. Bu tez çalışmasında *V. agnus-castus*'un beyaz ve mor çiçeklerinin sitotoksitesisi de ilk kez analiz edilmiştir. MCF-7 hücrelerinde, Balıkesir'den elde edilen mor çiçek (BMÇ) uçucu yağı, beyaz çiçek uçucu yağından (BBÇ) yaklaşık 10 kat daha potent olup, IC₅₀ değeri 4.68 µg/mL'dir. BMÇ uçucu yağı, bu değer ile MCF-7 hücre hattında hem Balıkesir hem de İstanbul bölgelerinden elde edilen uçucu yağlar arasındaki en sitotoksik uçucu yağdır. Ancak, beyaz çiçek uçucu yağının A549 hücre hattında, Balıkesir bölgesindeki diğer uçucu yağların etki

gücünden (IC_{50} değer aralığı 39,39-48,62 $\mu\text{g}/\text{mL}$) büyük bir fark olmaksızın daha çok sitotoksik etkiye sahip olduğu tespit edilmiştir. İstanbul'dan elde edilen uçucu yağların (İMÇ, İMY, İMM) da A549 hücrelerinde BBÇ uçucu yağından belirgin şekilde daha az sitotoksositeye sahip olduğu tespit edildi. Sonuçlar, *V. agnus-castus*'un yüksek sitotoksosite potansiyeline sahip olduğunu göstermiş olup, bitkilerin toplanma bölgelerinin ve kullanılan kısımlarının önemini vurgulamaktadır.

Literatürde yer almakta olan çalışmalarla, uçucu yağların ve onların bileşenlerinin kanser hücre hatları üzerinde etkili olduğu ve gelecek için potansiyel vaat ettikleri kanıtlanmıştır. α -Pinen bileşiğinin, metastatik MDA-MB-231 insan meme kanseri hücrelerinde, tümör invazyonu üzerinde inhibitör bir etkiye sahip olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca ERK/AKT yolağını kullanarak A549 ve HepG2 hücre hatlarının, hücre ölümlerini de tetiklediği anlaşılmıştır [156-158]. Mevcut tez çalışmasında, İstanbul'dan elde edilen uçucu yağlardaki α -pinen bileşiği miktarı, Balıkesir bölgesinden elde edilen uçucu yağlardaki miktarından önemli ölçüde düşük olarak belirlenmiştir. α -Pinen özellikle de, İMM uçucu yağında $0,9\pm 0,1$ miktarında tespit edilmiştir. MTT testi sonucunda Balıkesir bölgesinden elde edilen uçucu yağların, hem MCF-7 hem de A549 hücrelerinde daha potent olduğu tespit edilmiştir. Bu durum, Balıkesir'den elde edilen uçucu yağların, İstanbul bölgesinden elde edilen uçucu yağlara göre daha fazla miktarda α -pinen içermesi ile ilişkilendirilebilir. α -Pinen bileşiği, BBÇ uçucu yağında, BMÇ uçucu yağından yaklaşık iki kat daha az miktarda tespit edilmiştir. Buna paralel olarak, MCF-7 hücre hattı üzerinde BMÇ uçucu yağının, BBÇ uçucu yağından daha çok sitotoksositeye sahip olduğu gözlenmiştir. Karyofilen bileşiğinin NSCLC, A549, MCF-7, DLD-1, L-929 ve NCI-H1299 hücre hatları üzerindeki sitotoksikitesi kanıtlanmıştır. Çalışmalar karyofilenin α -humulen, izokaryofilen, paklitaksel ve sisplatin gibi anti-tümör ajanlar ile yapmış olduğu sinerjistik etkiye de dikkat çekmiştir [159, 160]. Tez çalışmasında elde edilen çiçek uçucu yağlarındaki karyofilen bileşiğinin miktarının, yaprak ve meyve uçucu yağlarına göre daha yüksek miktarda olduğu tespit edilmiştir. Benzer şekilde MTT sonuçları, MCF7 hücre hattında Balıkesir ve İstanbul bölgelerinden elde edilen çiçek uçucu yağlarının diğer uçucu yağlara göre daha potent olduğunu göstermektedir. BMÇ uçucu yağı, karyofilen ($12,3\pm 0,1$) ve α -pinen ($15,7\pm 0,1$) bileşiklerini diğer uçucu yağlardan daha yüksek miktarda içermekte olup, MCF-7 hücre hattında diğer uçucu yağlardan yaklaşık 10 kat daha potenttir. Benzer şekilde limonen bileşiğinin de MCF-

7, A549 ve H1299 hücre hatları üzerindeki sitotoksitesi araştırmacılar tarafından keşfedilmiştir [161-163]. Tez alışmasında; Balıkesir bölgesinden elde edilen beyaz iek (%5,3 ± 0,1), mor iek (%7,3 ± 0,1), yaprak (%6,0 ± 0,1) ve meyve (%7,3 ± 0,1) uçucu yağlarının limonen içeriğinin, İstanbul'dan elde edilen uçucu yağlardan daha yüksek miktarda olduğu tespit edilmiştir. MTT sonuçları göz önüne alındığında, Balıkesir'den elde edilen uçucu yağların daha potent olmaları içerdikleri limonen bileşiği ile de ilişkilendirilebilir.

6.2 V. agnus-castus Ekstresi zerine Yapılan alışmalarla İlgili Bulgular

6.2.1 Ekstrelerin verimleri

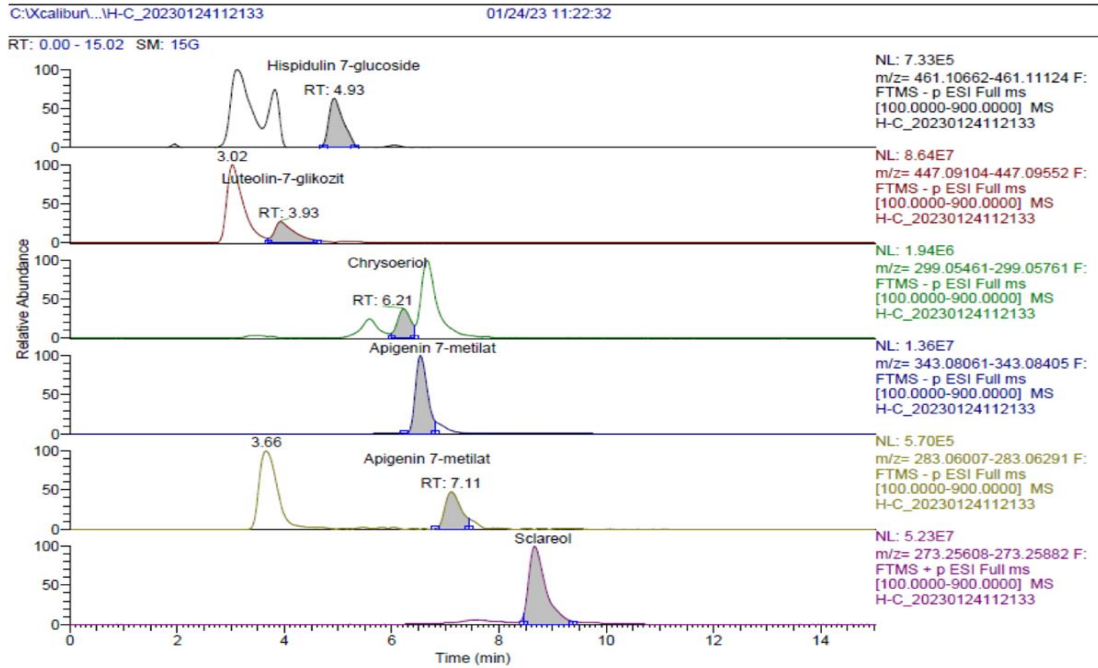
Sitotoksite çalışmasında kullanılmak üzere hazırlanmış olan ekstrelerden kuru meyve ekstresi %12,72 verimle, 1,2723 g elde edilmiştir. Kuru yaprak ekstresi %9,61 verimle 0,9615 g elde edilirken, kuru iek ekstresi %11,65 verimle 1,1651 g elde edilmiştir.

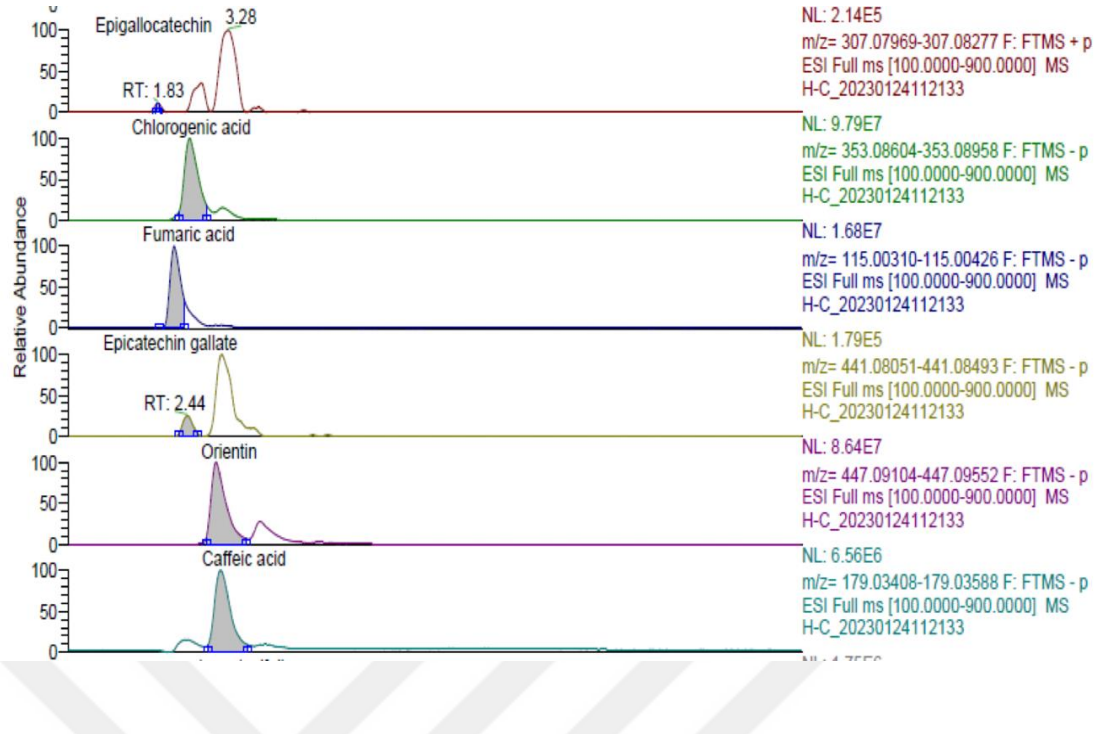
6.2.2 Ekstrelerin LC-HRMS sonuçları

Çalışmada kullanılan her üç ekstrenin fenolik bileşikleri LC-HRMS ile analiz edilmiştir. Daha sonra ekstrelerden droglara orantı ile geçiş yapılarak kurutulmuş iek, meyve ve yapraklardaki her bir bileşiğin miktarı hesaplanmıştır. Fumarik asit (70,7756±0,001 mg/100 g), klorojenik asit (34,954±0,002 mg/100 g), orientin (33,4926±0,002 mg/100 g), kastingin (9,5391±0,000 mg/100 g) ve luteolin-7-glukozit (5,0726±0,001 mg/100 g) bileşikleri kurutulmuş çiçeklerin majör bileşenleri olarak analiz edildi. Kuru meyvenin başlıca bileşenleri sırasıyla fumarik asit (107,861± 0,001 mg/100 g), klorojenik asit (46,9900±0,002 mg/100 g), orientin (44,9738± 0,002 mg/100 g), kastingin (15,5327± 0,000 mg/100 g) ve luteolin-7-glukozit (6,8472±0,002 mg/100 g) olarak tespit edildi. V. agnus-castus kurutulmuş yapraklarının majör bileşenleri ise orientin (137,5407± 0,001 mg /100 g), klorojenik asit (47,565±0,001 mg /100), fumarik asit (38,620± 0,001 mg /100 g), luteolin-7-glukozit (24,6136± 0,001 mg /100 g) ve kastingin (11,7450±0,000 mg /100) olarak tespit edildi (Tablo 6.4) Her bir ekstreye ait kromatogramlar Şekil 6.12-6.15 de gösterilmiştir.

Tablo 6.4: *V. agnus-castus* çiçek, meyve ve yapraklarındaki fenolik bileşikler.

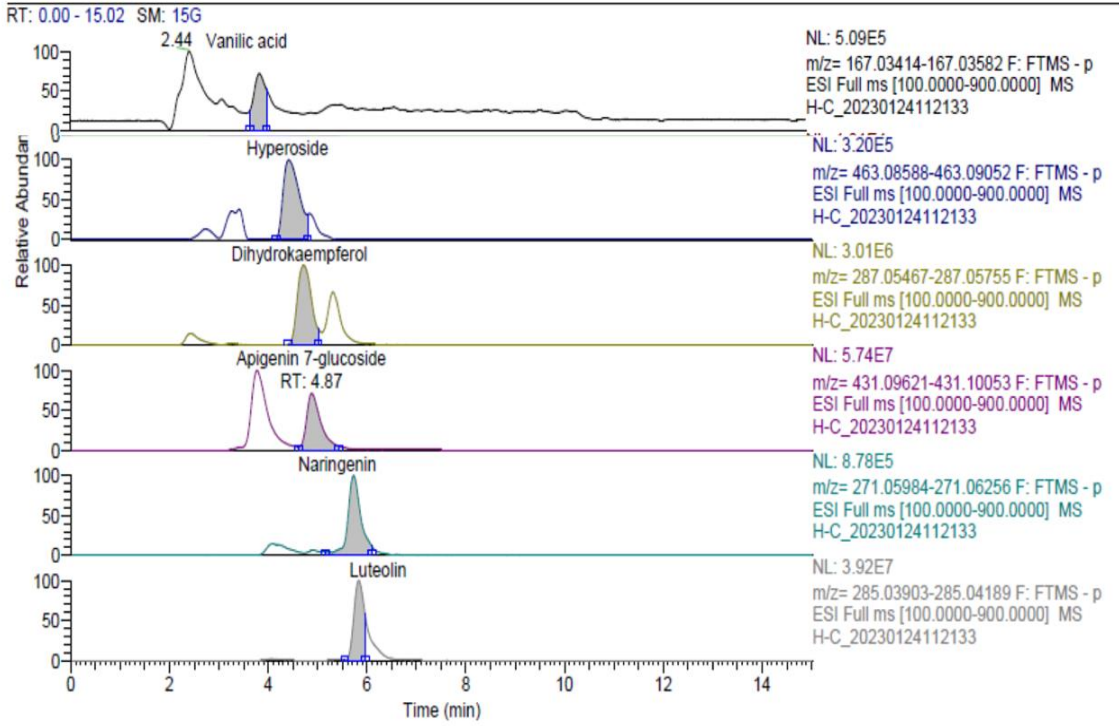
Bileşik	Rölatif belirsizlik (%)	mg/100 g kuru çiçek	mg/100 g kuru meyve	mg/100 g kuru yaprak
Klorojenik asit	3,58	34,9540	46,9900	47,5650
Fumarik asit	2,88	70,7756	107,8610	38,6200
(-)-Epikateşin gallat	3,05	0,0255	0,0330	-
Orientin	3,67	33,4926	44,9738	137,5407
Kafeik asit	3,74	0,6762	0,9207	0,7267
Vanilik asit	3,49	0,7621	0,9067	-
Luteolin 7-glukozit	4,13	5,0726	6,8472	24,6136
Hiperozit	3,46	0,1438	0,2063	-
Dihidrokemferol	2,86	0,1078	0,1479	-
Apigenin 7-glukozit	3,59	4,7415	6,5811	3,8340
Kersetin	2,95	0,0232	0,0298	0,0427
Salisilik asit	1,89	0,5713	0,7537	0,3276
Naringenin	4,20	0,0632	0,1079	0,0576
Luteolin	3,42	0,5834	0,7359	1,1740
Kemferol	3,56	1,2006	1,6141	2,4174
Apigenin	2,87	1,0121	1,4414	0,0774
Penduletin	3,20	1,1141	1,6129	1,1079
Krizin	3,24	0,0034	0,0038	-
Akasetin	3,98	0,0139	0,0171	-
Hispidulin 7-glukozit	5,15	2,9661	4,3916	-
Krizoeriol	6,13	0,0278	0,0374	0,0216
Apigenin 7-metilat	7,10	0,0023	0,0025	-
Sklareol	8,87	0,7946	0,6864	1,4350
Kastisin	6,55	9,5391	15,5327	11,7450

**Şekil 6.12:** *V. agnus-castus* çiçek ekstresi kromatogramları.



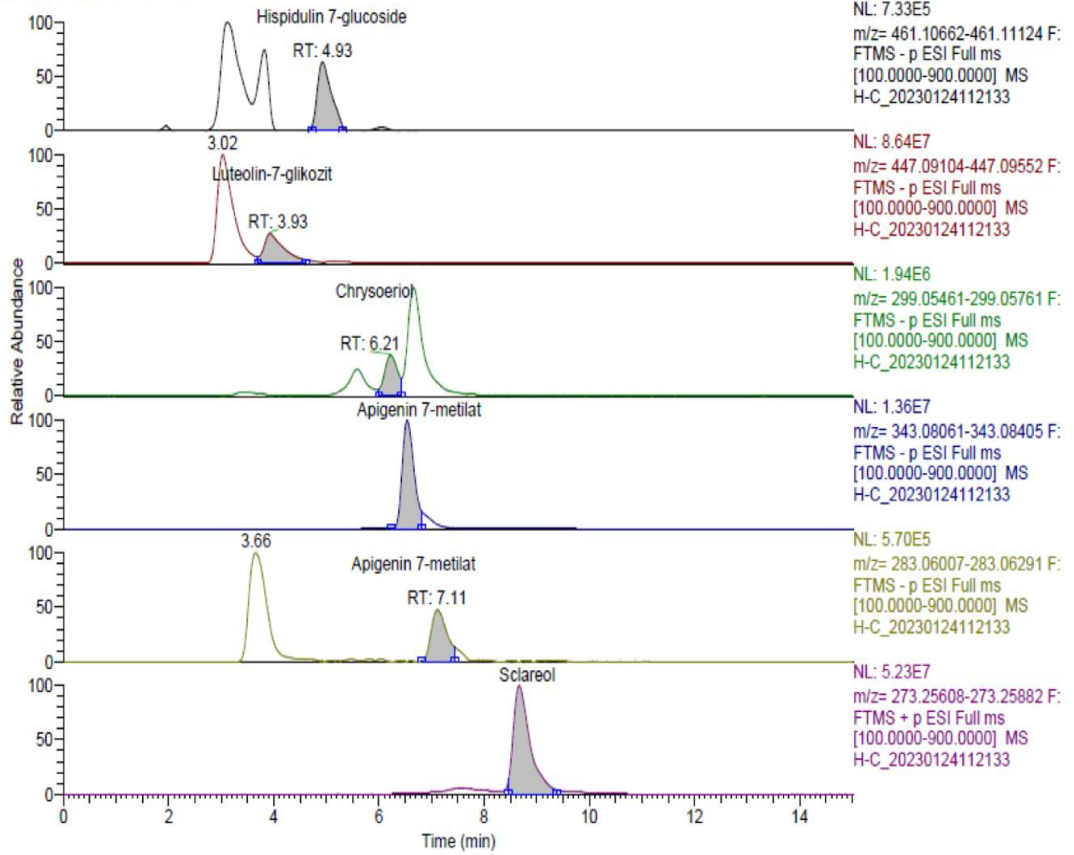
C:\Xcalibur\...H-C_20230124112133

01/24/23 11:22:32

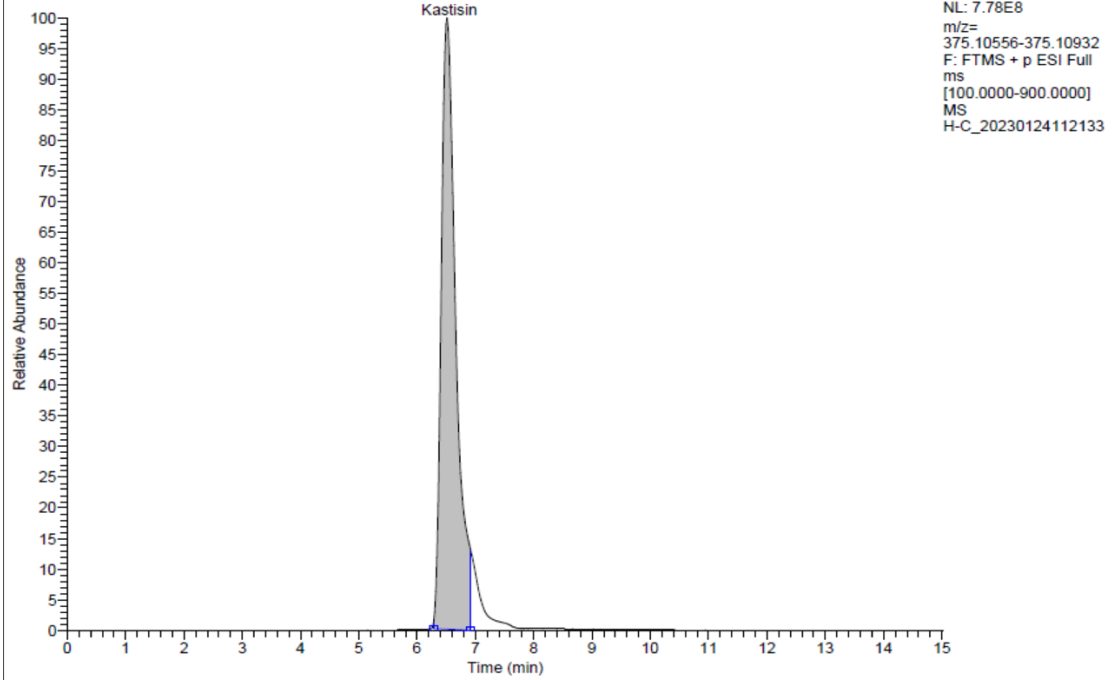


Şekil 6.12 (devamı): *V. agnus-castus* çiçek ekstresi kromatogramları.

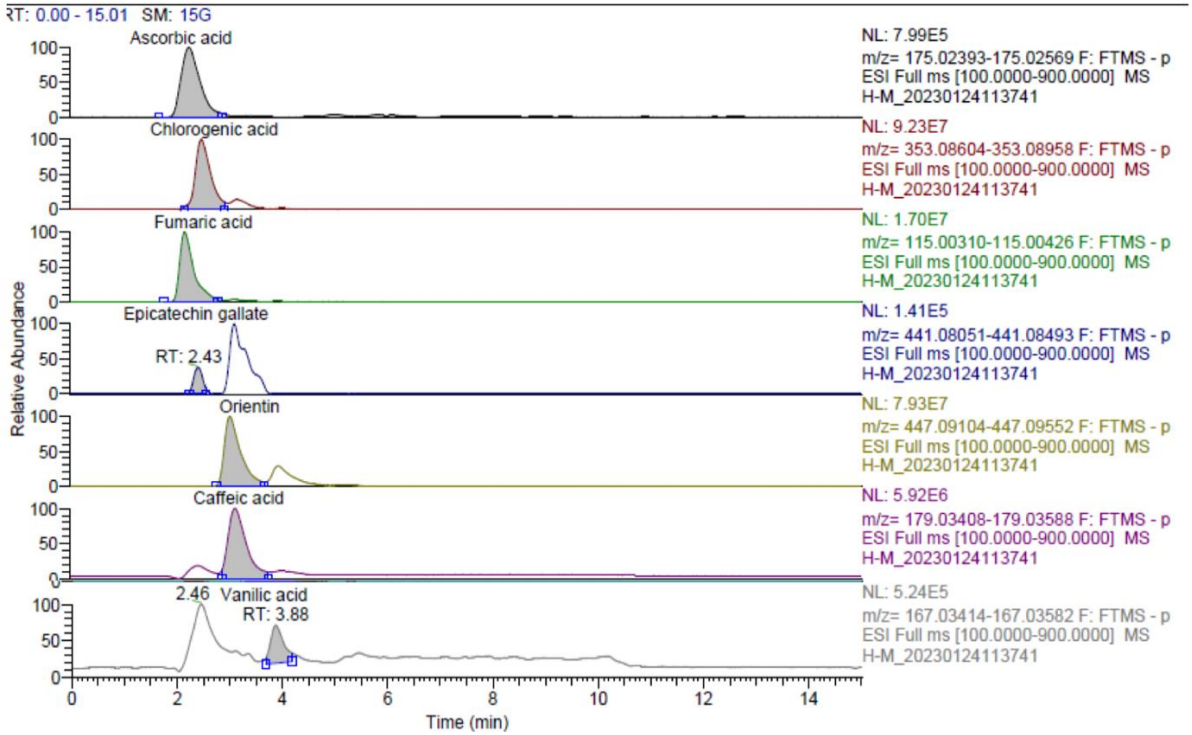
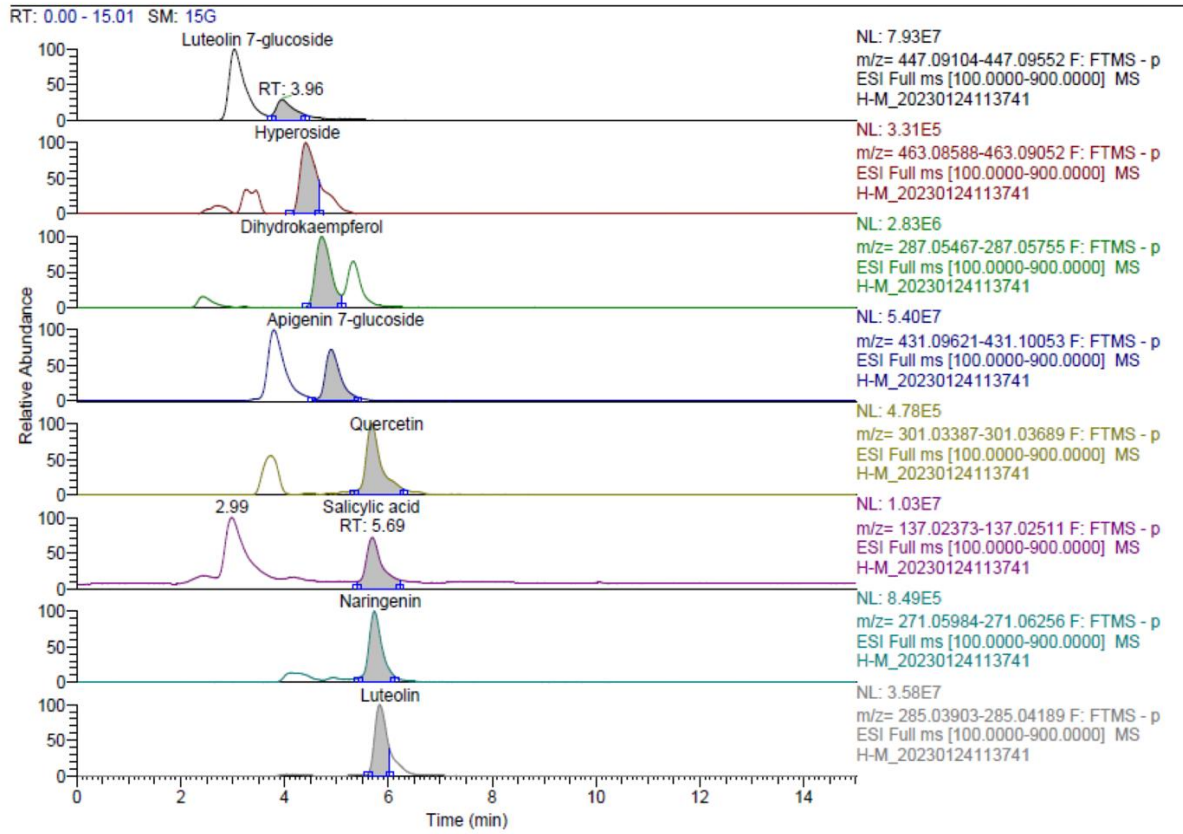
RT: 0.00 - 15.02 SM: 15G



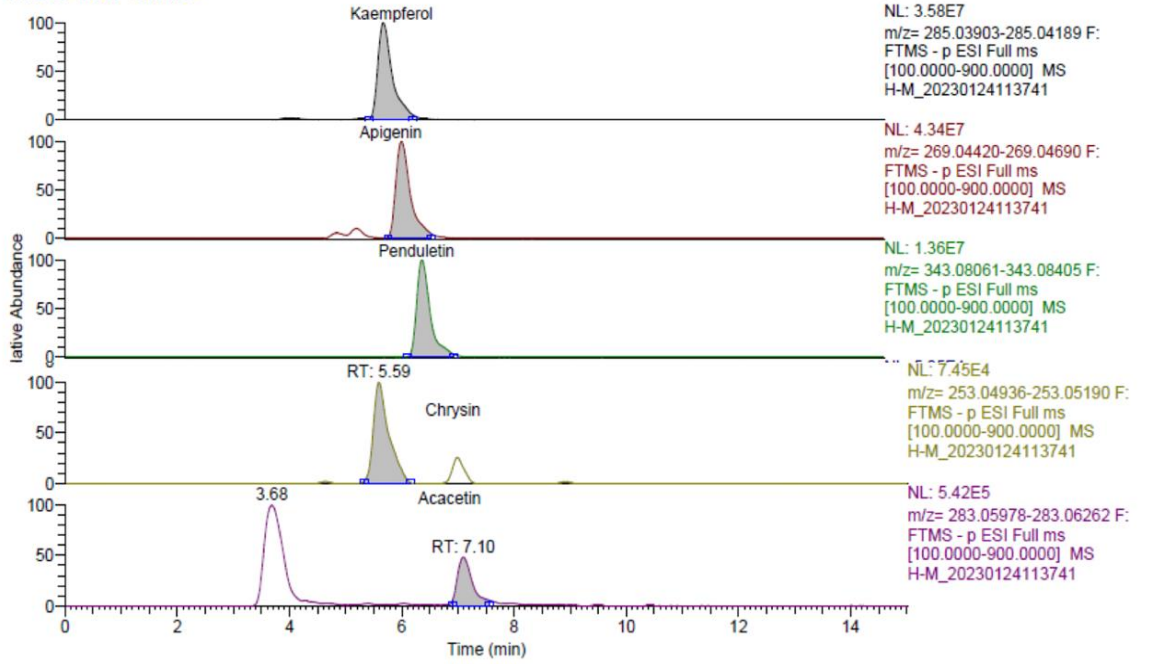
RT: 0.00 - 15.02 SM: 15G



Şekil 6.12 (devamı): *V. agnus-castus* çiçek ekstresi kromatogramları.

Şekil 6.13: *V. agnus-castus* meyve ekstresi kromatogramları.

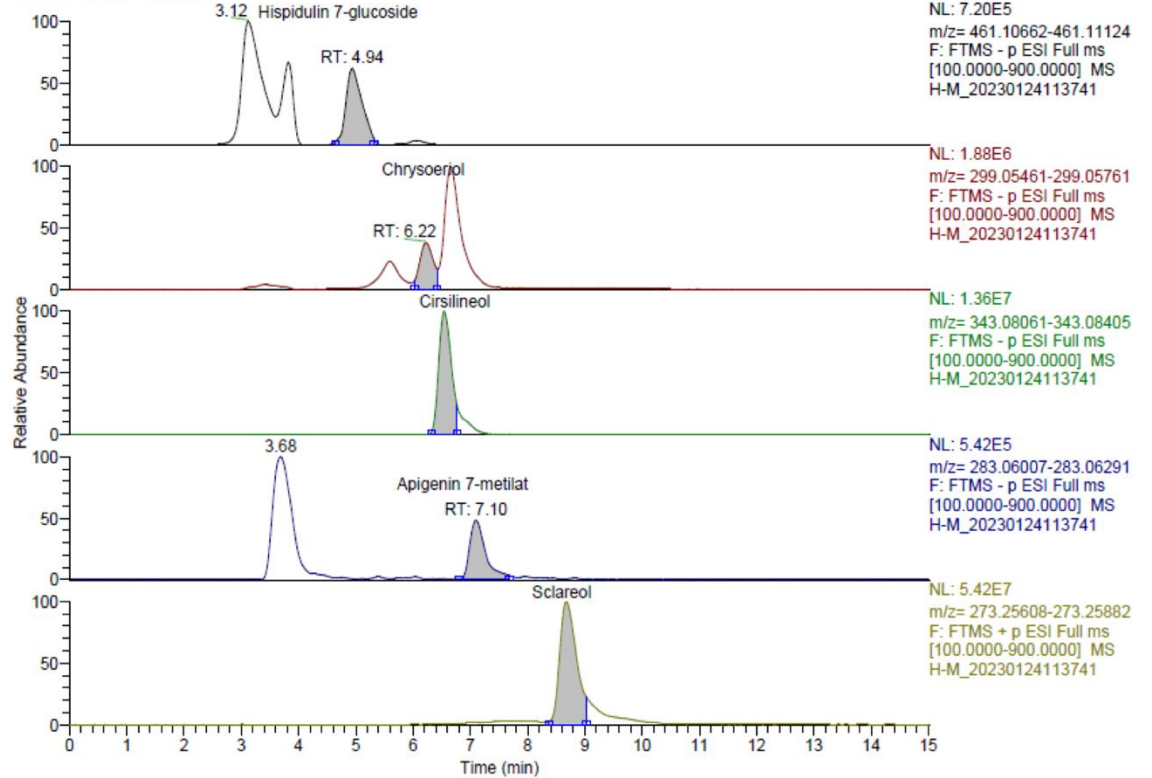
RT: 0.00 - 15.01 SM: 15G

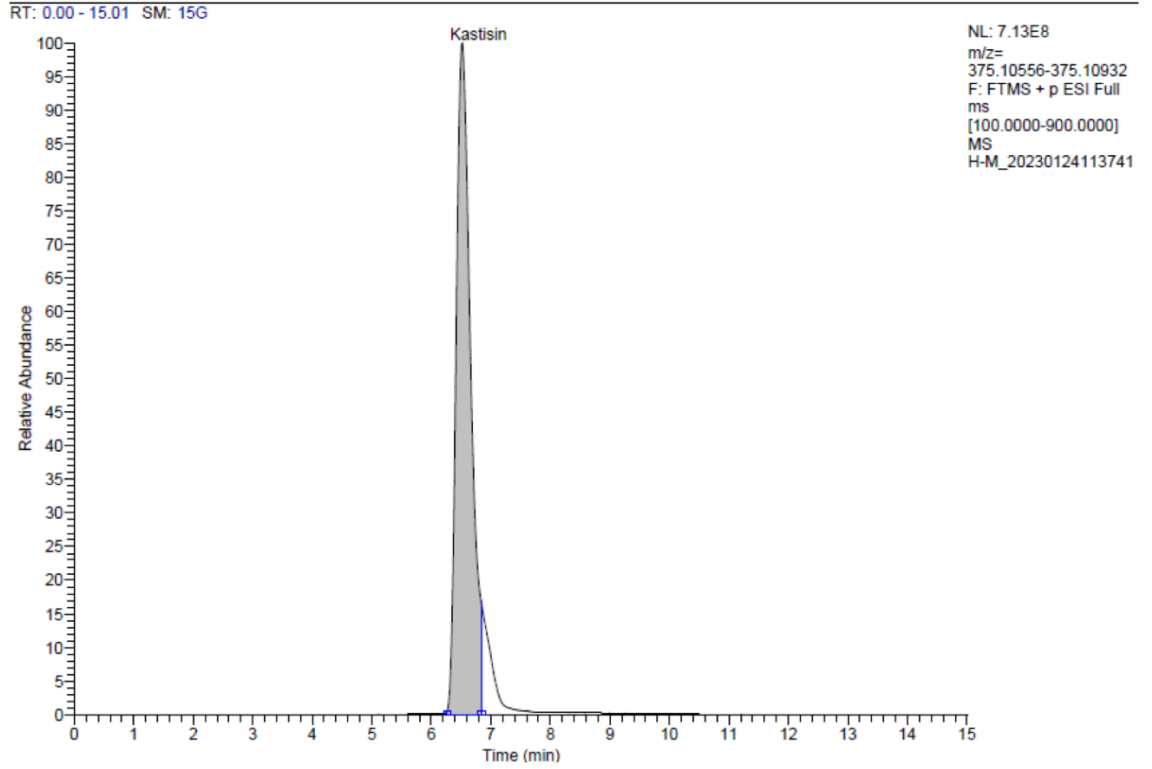


C:\Xcalibur\...H-M_20230124113741

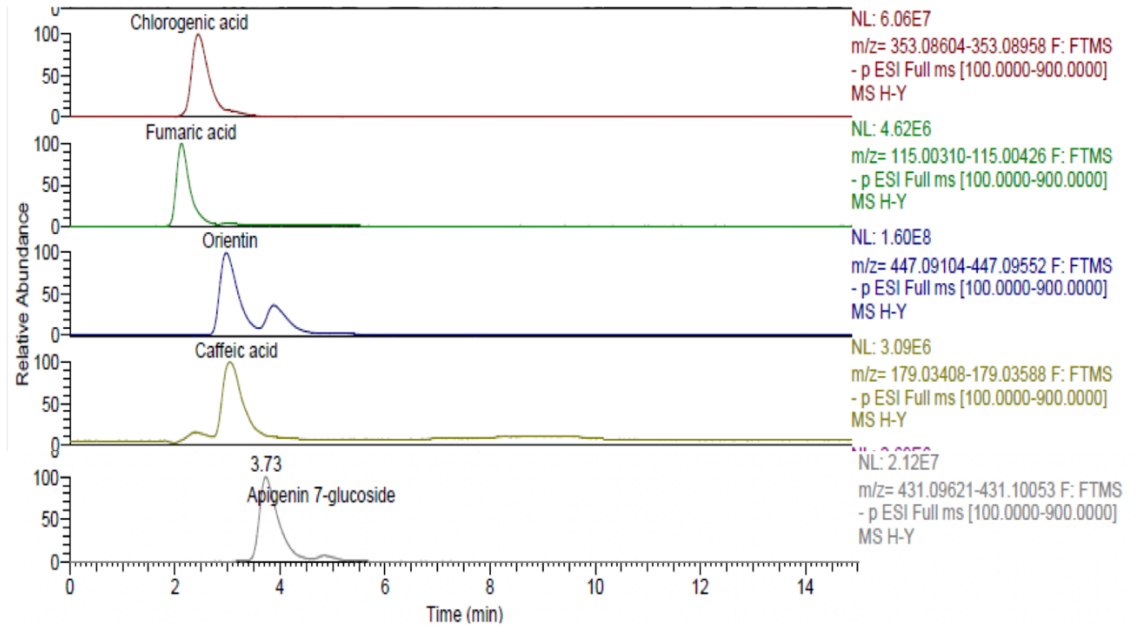
01/24/23 11:38:40

RT: 0.00 - 15.01 SM: 15G

Şekil 6.13 (devamı): *V. agnus-castus* meyve ekstresi kromatogramları.

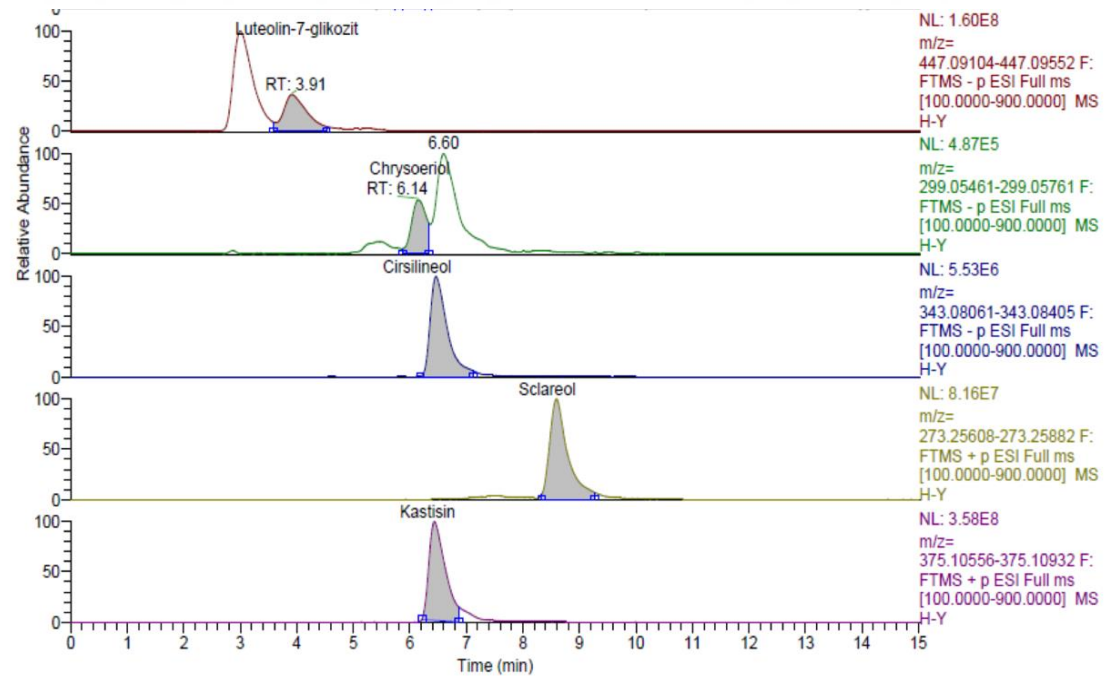
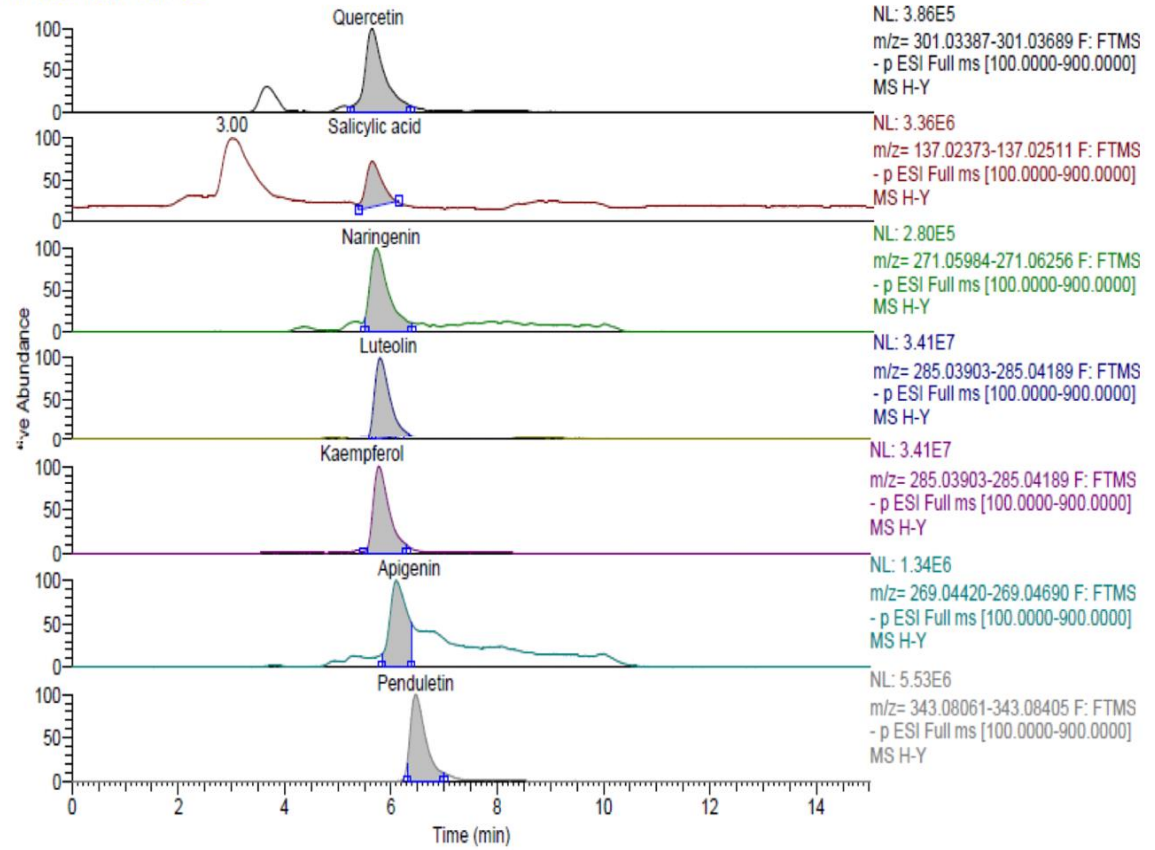


Şekil 6.13 (devamı): *V. agnus-castus* meyve ekstresi kromatogramları.



Şekil 6.14: *V. agnus-castus* yaprak ekstresi kromatogramları.

RT: 0.00 - 15.01 SM: 15G



Şekil 6.14 (devamı): *V. agnus-castus* yaprak ekstresi kromatogramları.

6.2.3 Ekstrelerin *in-vitro* sitotoksisite testi sonuçları

Ekstrelerin *in-vitro* sitotoksisite sonuçları, hücrelerin yarısının öldürülmesinden sorumlu olan ortalama IC₅₀ konsantrasyonu olarak belirtilmiştir. IC₅₀ değeri hesaplaması yapılamadığında, bu durumdan sorumlu konsantrasyonla birlikte maksimum hücre ölümü oranı şeklinde gösterilmiştir. Sitotoksisite test sonuçları; MCF-7 hücre hattının, A549 hücre hattından daha duyarlı olduğunu göstermektedir. Mevcut çalışmada, MCF-7'deki meyve, mor çiçek ve yaprak %70 etanol (h/h) ekstralarının IC₅₀'si sırasıyla 53,16 µg/mL, 62,12 µg/mL ve 159,40 µg/mL ve A549 hücre hattında sırasıyla 139,70 µg/mL, 200 µg/mL'den fazla (100 µg/mL konsantrasyonda %26,70±3,9) ve 190,55 µg/mL bulundu (Tablo 6.5).

Tablo 6.5: *V. agnus-castus*'un farklı hücre hatları üzerindeki sitotoksik etkisi.

Ekstre	Hücre hattı	Değerlendirme tipi	Sonuç
Çiçek	A549	Hücre ölüm oranı	100 µg/mL konsantrasyonda %26,70±3,9
Çiçek	MCF-7	IC ₅₀	62,12 µg/mL
Meyve	A549	IC ₅₀	139,70 µg/mL
Meyve	MCF-7	IC ₅₀	53,16 µg/mL
Yaprak	A549	IC ₅₀	190,55 µg/mL
Yaprak	MCF-7	IC ₅₀	159,40 µg/mL

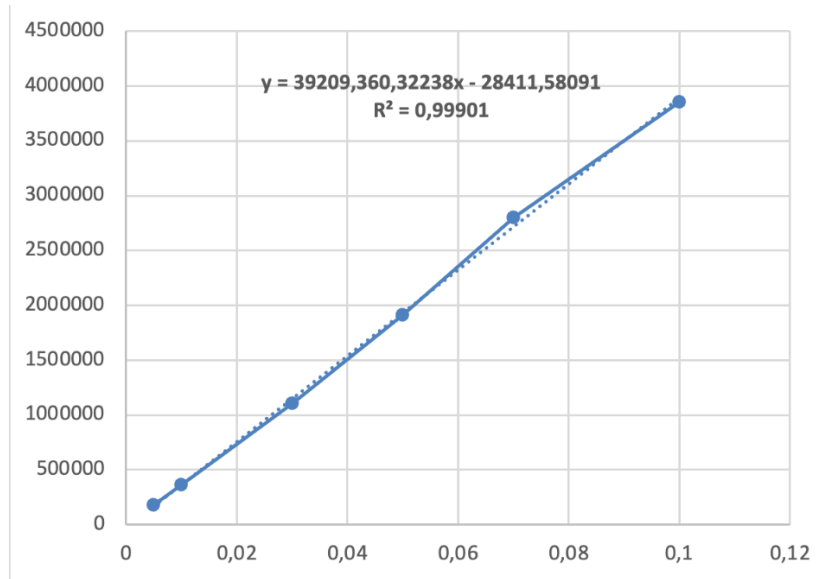
Vitex agnus-castus'un sitotoksik etkisini değerlendiren çalışmalar olmasına rağmen, bu çalışmalarda esas olarak bitkinin meyvelerine veya toprak üstü kısımlarına odaklanılmıştır. Literatürde bulunan çalışmalarda *V. agnus-castus*'dan hazırlanmış etanol veya metanol ekstralarının IC₅₀ değerleri 0,01 µg/mL ile 90,0 µg/mL arasında değişmektedir. MCF-7 hücre hattında, yapraklardan elde edilen metanol ekstresi 46,5 µg/mL IC₅₀ ile hücre ölümüne neden olurken, toprak üstü kısımlarından elde edilmiş metanol ekstresi için 23,8 µg/mL olarak hesaplanmıştır. *V. agnus-castus* meyvelerinden hazırlanmış etanol ve metanol ekstralarının her ikisinin de MCF-7 hücre hattında 30 µg/mL'lik IC₅₀ değeri ile sitotoksisite gösterdiği tespit edilirken, bir başka çalışmada bitkinin toprak üstü kısımlarından hazırlanmış metanol ekstresi A549 hücre hattında 100 µg/mL'ye kadar önemli sitotoksisiteye neden olamadığından, IC₅₀ değeri hesaplanamamıştır [95, 164, 165]. Tez kapsamında yürütülen çalışma *V. agnus-castus* çiçek ekstresinin sitotoksisitesini değerlendiren ilk çalışmadır. Yaprak ve meyve ekstralarının sonuçları ise önceki çalışmalar ve veriler ile tutarlıdır. Çiçek ekstresi, MCF-7 hücrelerinde (IC₅₀ 62,12 µg/mL değeri ile) iyi sitotoksisite gösterirken, A549 hücrelerindeki sitotoksisitesi çok düşük olup, 100 µg/mL'de ölüm oranı %26,7'dir. Meyve ekstresi, her iki hücre hattı için de yaprak ve çiçek

ekstrelerinden daha sitotoksik görünmektedir. Ekstrelerin sahip oldukları farklı kimyasal bileşenleri, sonuçları etkilemektedir.

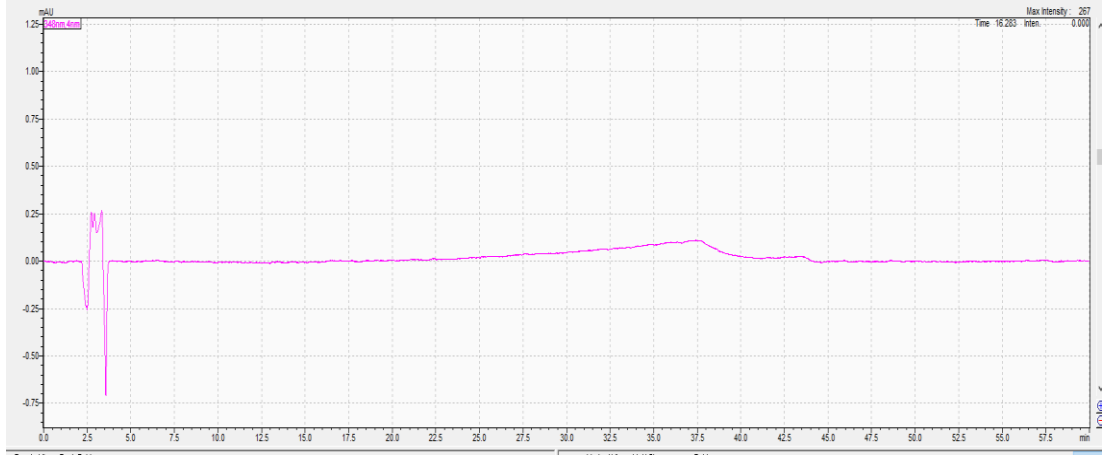
6.3 Ege Bölgesi Hayıt (*Vitex agnus-castus* L.) Popülasyonlarının Bazı Agromorfolojik ve Biyokimyasal Özelliklerinin Belirlenmesi TAGEM (Tarımsal Araştırmalar ve Politikalar Genel Müdürlüğü) Projesi Kapsamında Yapılan Çalışmalarla İlgili Bulgular

6.3.1 Örneklerin kastingin miktarlarının HPLC-PDA ile analizlerinin sonuçları

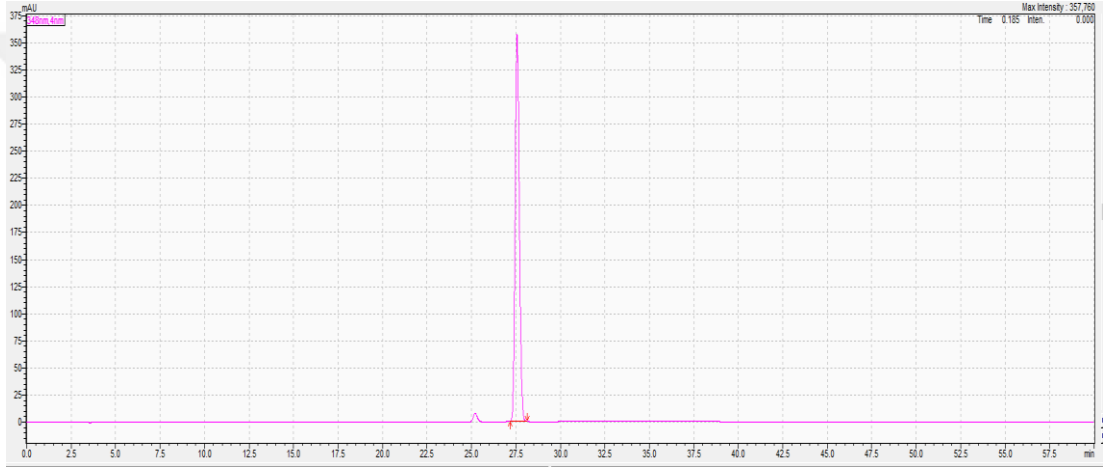
Ege Bölgesi Hayıt (*Vitex agnus-castus* L.) Popülasyonlarının Bazı Agromorfolojik ve Biyokimyasal Özelliklerinin Belirlenmesi TAGEM (Tarımsal Araştırmalar ve Politikalar Genel Müdürlüğü) projesi kapsamında 95 farklı bölgeden toplanmış *V. agnus-castus* meyvelerinin kalitelerinin belirlenmesi için; kastingin içerikleri Türk Farmakopesi “Hayıt, Meyve” monografındaki yöntem kullanılarak değerlendirilmiştir. Kastingin miktarı analizi için oluşturulan kalibrasyon eğrisi Şekil 6.15’de, boş çözücü (%70 EtOH) ve standart pikleri ise Şekil 6.16 ve Şekil 6.17’de, 77 kodlu örneğin kastingin pikini gösteren kromatogram da Şekil 6.18’de yer almaktadır.



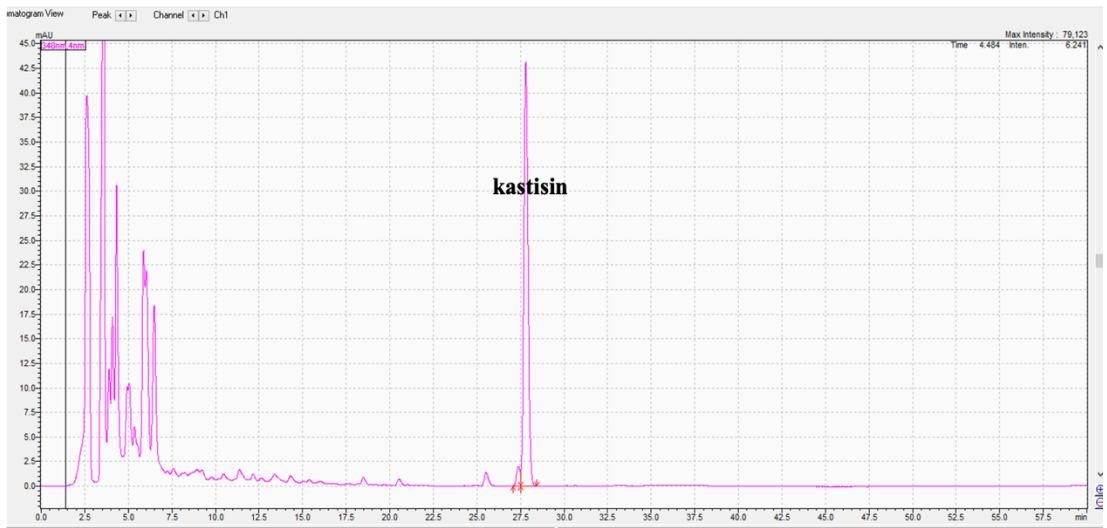
Şekil 6.15: Kastingin bileşiğinin kalibrasyon eğrisi.



Şekil 6.16: Boş çözücü kromatogramı.



Şekil 6.17: Kastisin standardı kromatogramı.



Şekil 6.18: 77 kodlu örneğin kastisin pikini gösteren kromatogram.

Avrupa Farmakopesi'ne göre *V. agnus-castus* meyve drogu minimum %0,08 olacak şekilde kastisin bileşimini içermelidir. Bu değer altındaki droglar kalite kriterini karşılamamaktadır [3]. Tez kapsamında incelenen 95 farklı *V. agnus-castus* meyve drogundan 48 tanesi bu kriteri karşılamaktadır. Sonuçlar Tablo 6.6'da yer almaktadır.

Tablo 6.6: Ege Bölgesi Hayıt (*Vitex agnus-castus* L.) Popülasyonlarının Bazı Agromorfolojik ve Biyokimyasal Özelliklerinin Belirlenmesi TAGEM (Tarımsal Araştırmalar ve Politikalar Genel Müdürlüğü) Projesi Kapsamındaki hayıt örneklerinin kastisin miktarları.

Örnek Kodu	Toplanma Yılı	Toplanma Bölgesi	% Kastisin miktarı
1	2021	Aydın, Çine	0,048 ± 0,001
2	2021	Aydın, Çine	0,075 ± 0,005
3	2021	Aydın, Çine	0,069 ± 0,002
4	2021	Aydın, Çine	0,069 ± 0,003
6	2021	Aydın, Çine	0,077 ± 0,004
13-40	2021	Aydın, Çine	0,183 ± 0,002
15	2021	Aydın, Karpuzlu	0,050 ± 0,001
48	2021	Balıkesir, Ayvalık	0,104 ± 0,003
67	2021	Çanakkale, Ayvacık	0,105 ± 0,001
77	2021	İzmir, Menderes	0,089 ± 0,003
73	2021	İzmir, Menderes	0,071 ± 0,002
76	2021	İzmir, Menderes	0,040 ± 0,001
78	2021	İzmir, Menderes	0,070 ± 0,003
81	2021	Muğla, Yatağan	0,098 ± 0,002
89	2021	Muğla, Milas	0,076 ± 0,001
95	2021	Muğla, Ula	0,116 ± 0,002
41	2021	İzmir, Aliğa	0,050 ± 0,004
103	2021	Manisa, Salihli	0,042 ± 0,001
91	2021	Muğla, Milas	0,116 ± 0,003
80	2021	Muğla, Yatağan	0,085 ± 0,002
11	2021	Aydın, Çine	0,051 ± 0,001
45	2021	İzmir, Dikili	0,118 ± 0,003
46	2021	İzmir, Dikili	0,129 ± 0,005
25	2021	Aydın, Karpuzlu	0,075 ± 0,001
44	2021	İzmir, Aliğa	0,096 ± 0,003
104	2021	Manisa, Salihli	0,102 ± 0,002
87	2021	Muğla, Milas	0,070 ± 0,001
85	2021	Muğla, Milas	0,080 ± 0,004
23	2021	Aydın, Karpuzlu	0,054 ± 0,003
63	2021	Çanakkale, Ayvacık	0,058 ± 0,002
98	2021	Muğla, Köyceğiz	0,021 ± 0,001
82	2021	Muğla, Yatağan	0,062 ± 0,002
84	2021	Muğla, Milas	0,072 ± 0,001
64	2021	Çanakkale, Ayvacık	0,073 ± 0,002
8	2021	Aydın, Çine	0,091 ± 0,003
42	2021	İzmir, Aliğa	0,073 ± 0,001
100	2021	Aydın, Koçarlı	0,046 ± 0,003
53	2021	Balıkesir, Burhaniye	0,126 ± 0,002
33	2021	İzmir, Kaynaklar	0,107 ± 0,001
86	2021	Muğla, Milas	0,024 ± 0,001

Tablo 6.7 (devamı): Ege Bölgesi Hayıt (*Vitex agnus-castus* L.) Popülasyonlarının Bazı Agromorfolojik ve Biyokimyasal Özelliklerinin Belirlenmesi TAGEM (Tarımsal Araştırmalar ve Politikalar Genel Müdürlüğü) Projesi Kapsamındaki hayıt örneklerinin kastisin miktarları.

79	2021	Aydın, Karpuzlu	0,040 ± 0,001
38	2021	İzmir, Menderes	0,071 ± 0,003
55	2021	Balıkesir, Burhaniye	0,117 ± 0,002
34	2021	İzmir, Kaynaklar	0,058 ± 0,003
74	2021	İzmir, Menderes	0,149 ± 0,001
35	2021	İzmir, Kaynaklar	0,075 ± 0,002
59	2021	Balıkesir, Burhaniye	0,091 ± 0,004
17	2021	Aydın, Karpuzlu	0,042 ± 0,001
43	2021	İzmir, Aliğa	0,089 ± 0,001
102	2021	İzmir, Aliğa	0,099 ± 0,002
22	2021	Aydın, Karpuzlu	0,022 ± 0,003
60	2021	Balıkesir, Burhaniye	0,180 ± 0,001
94	2021	Muğla, Ula	0,069 ± 0,002
54	2021	Balıkesir, Burhaniye	0,099 ± 0,001
109	2021	Balıkesir, Gömeç	0,122 ± 0,003
49	2021	Balıkesir, Ayvalık	0,180 ± 0,002
90	2021	Muğla, Milas	0,042 ± 0,001
37	2021	İzmir, Menderes	0,066 ± 0,002
58	2021	Balıkesir, Burhaniye	0,113 ± 0,003
69	2021	Çanakkale, Ayvacık	0,155 ± 0,002
39	2021	İzmir, Menderes	0,046 ± 0,001
105	2021	Manisa, Salihli	0,153 ± 0,002
66	2021	Çanakkale, Ayvacık	0,091 ± 0,001
26	2021	Aydın, Karpuzlu	0,079 ± 0,003
21	2021	Aydın, Karpuzlu	0,042 ± 0,002
72	2021	Çanakkale, Ayvacık	0,050 ± 0,001
70	2021	Çanakkale, Ayvacık	0,191 ± 0,003
110	2021	Balıkesir, Gömeç	0,149 ± 0,001
29	2021	Aydın, Koçarlı	0,093 ± 0,002
101	2021	Aydın, Koçarlı	0,061 ± 0,001
92	2021	Muğla, Ula	0,113 ± 0,001
57	2021	Balıkesir, Burhaniye	0,216 ± 0,002
75	2021	İzmir, Menderes	0,136 ± 0,002
107	2021	Manisa, Salihli	0,066 ± 0,003
106	2021	Manisa, Salihli	0,090 ± 0,001
111	2021	Çanakkale, Ayvacık	0,202 ± 0,002
71	2021	Çanakkale, Ayvacık	0,060 ± 0,001
56	2021	Balıkesir, Burhaniye	0,150 ± 0,002
68	2021	Çanakkale, Ayvacık	0,085 ± 0,002
47	2021	İzmir, Dikili	0,171 ± 0,002
97	2021	Muğla, Ula	0,049 ± 0,001
65	2021	Çanakkale, Ayvacık	0,179 ± 0,004
61	2021	Balıkesir, Burhaniye	0,071 ± 0,003
32	2021	Aydın, Kuşadası	0,088 ± 0,001
83	2021	Muğla, Yatağan	0,095 ± 0,002
108	2021	Manisa, Salihli	0,067 ± 0,002
28	2021	Aydın, Koçarlı	0,159 ± 0,001
88	2021	Muğla, Milas	0,064 ± 0,001
93	2021	Muğla, Ula	0,115 ± 0,003

Tablo 6.8 (devamı): Ege Bölgesi Hayıt (*Vitex agnus-castus* L.) Popülasyonlarının Bazı Agromorfolojik ve Biyokimyasal Özelliklerinin Belirlenmesi TAGEM (Tarımsal Araştırmalar ve Politikalar Genel Müdürlüğü) Projesi Kapsamındaki hayıt örneklerinin kastisin miktarları.

99	2021	Muğla, Köyceğiz	0,049 ± 0,002
96	2021	Muğla, Ula	0,061 ± 0,001
24	2021	Aydın, Karpuzlu	0,056 ± 0,001
36	2021	İzmir, Kaynaklar	0,125 ± 0,001
9	2021	Aydın, Çine	0,131 ± 0,003
10	2021	Aydın, Çine	0,095 ± 0,003

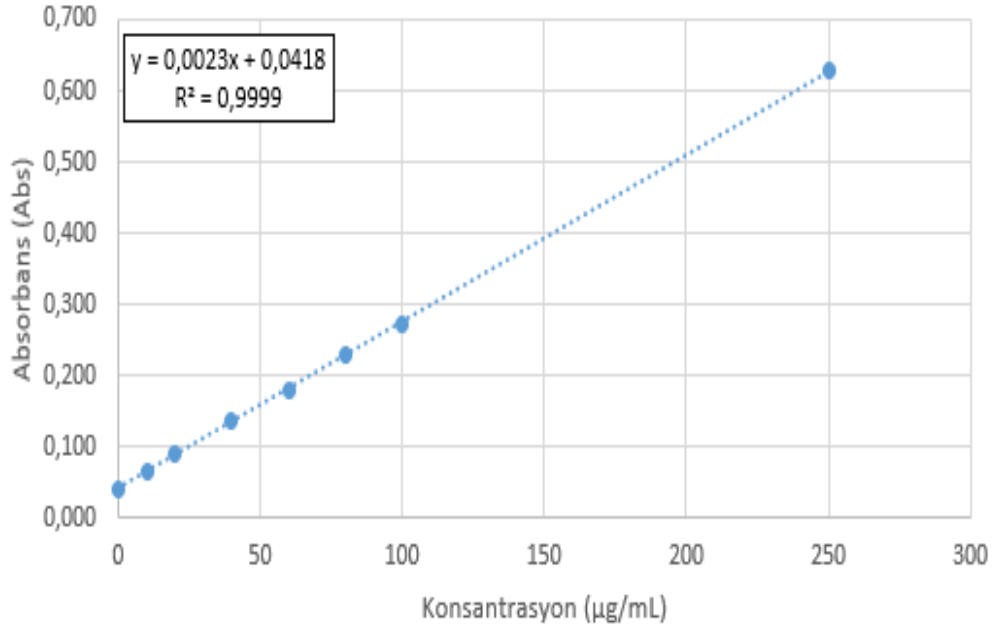
En yüksek miktarda kastisin bileşimini içeren ilk 10 *V. agnus-castus* meyve drogu belirlenmiş, 1 sene sonrasında 2022 yılında aynı bölgelerden aynı meyve drogu örnekleri toplanarak aynı yöntemle HPLC-PDA ile analiz edilmiştir. Drogların içerdiği kastisin miktarlarının bir önceki yıla paralel olarak drog sıralamasıda herhangi bir değişim olmadığı görülmüştür (Tablo 6.7).

Tablo 6.9: Kastisin miktarı en yüksek olan 10 örnek.

Örnek Kodu	Toplanma Bölgesi	% Kastisin Miktarı (2021 yılı örnekleri)	% Kastisin Miktarı (2022 yılı örnekleri)
57	Aydın, Çine	0,216 ± 0,002	0,225 ± 0,003
111	Aydın, Çine	0,202 ± 0,002	0,208 ± 0,002
70	Aydın, Çine	0,191 ± 0,003	0,195 ± 0,002
13-40	Aydın, Çine	0,183 ± 0,002	0,187 ± 0,004
49	Aydın, Çine	0,180 ± 0,002	0,182 ± 0,000
60	Aydın, Çine	0,180 ± 0,001	0,179 ± 0,001
65	Aydın, Karpuzlu	0,179 ± 0,004	0,176 ± 0,003
47	Balıkesir, Ayvalık	0,171 ± 0,002	0,175 ± 0,003
28	Çanakkale, Ayvacık	0,159 ± 0,001	0,162 ± 0,002
69	İzmir, Kaynaklar	0,155 ± 0,002	0,156 ± 0,004

6.3.2 Örneklerin total fenolik madde miktarları

TAGEM tarafından 2022 yılında toplanmış ve en yüksek miktarda kastisin bileşimi içerdiği tespit edilmiş olan 10 örneğin total fenolik madde miktarları, spektrofotometrik yöntem ile gallik asit eş değeri olarak tayin edilmiştir (Tablo 6.8). Gallik asit kullanılarak elde edilmiş kalibrasyon eğrisi Şekil 6.19'da gösterilmiştir.



Şekil 6.19: Gallik asit kalibrasyon eğrisi.

Tablo 6.10: *V. agnus-castus* ekstrelerinin total fenolik madde miktarları.

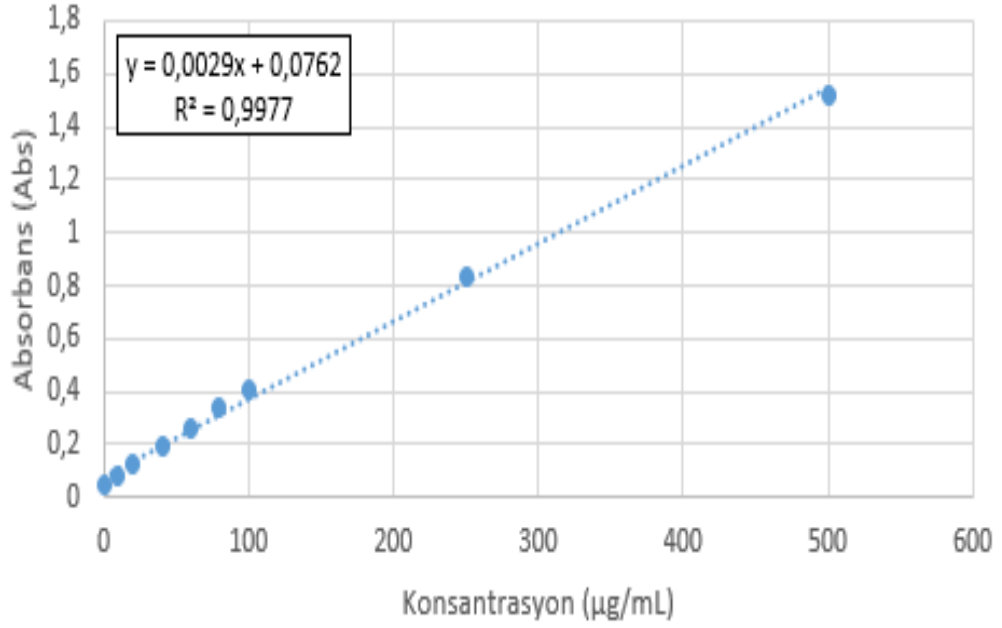
Örnek Kodu	Toplanma Bölgesi	Total fenolik ^a madde içeriği ± S.S. ^b
57	Aydın, Çine	9,67 ± 0,42
111	Aydın, Çine	18,93 ± 0,31
70	Aydın, Çine	17,63 ± 0,57
13-40	Aydın, Çine	11,33 ± 0,48
49	Aydın, Çine	6,32 ± 0,53
60	Aydın, Çine	8,89 ± 0,61
65	Aydın, Karpuzlu	15,93 ± 0,36
47	Balıkesir, Ayvalık	14,46 ± 0,62
28	Çanakkale, Ayvacık	10,14 ± 0,49
69	İzmir, Kaynaklar	13,59 ± 0,25

^a Veriler, 1 g ekstredeki gallik asit eşdeğerinin mg cinsinden değeridir.

^b Standart sapma (n = 3).

6.3.3 Örneklerin total flavonoit madde miktarları

TAGEM tarafından 2022 yılında toplanmış ve en yüksek miktarda kастisin bileşiği içerdiği tespit edilmiş olan 10 örneğin total flavonoit madde miktarları, spektrofotometrik yöntem ile kersetin eş değeri olarak tayin edilmiştir (Tablo 6.9). Kersetin kullanılarak elde edilmiş kalibrasyon eğrisi Şekil 6.20’de gösterilmiştir.



Şekil 6.20: Kersetin kalibrasyon eğrisi.

Tablo 6.11: *V. agnus-castus* ekstrelerinin total flavonoit madde miktarları.

Örnek Kodu	Toplanma Bölgesi	Total flavonoit ^a madde içeriği ± S.S. ^b
57	Aydın, Çine	3,95 ± 0,28
111	Aydın, Çine	8,52 ± 0,46
70	Aydın, Çine	5,96 ± 0,37
13-40	Aydın, Çine	6,28 ± 0,78
49	Aydın, Çine	3,18 ± 0,24
60	Aydın, Çine	2,09 ± 0,45
65	Aydın, Karpuzlu	10,17 ± 0,58
47	Balıkesir, Ayvalık	6,91 ± 0,33
28	Çanakkale, Ayvacık	3,66 ± 0,27
69	İzmir, Kaynaklar	5,93 ± 0,39

^a Veriler, 1 g ekstredeki kersetin eşdeğerinin mg cinsinden değeridir.

^b Standart sapma (n = 3).

6.4 *In-vivo* Anti-obezite Aktivite Çalışmasına Ait Bulgular

6.4.1 Ekstrelerin verimleri

V. agnus-castus bitkisinden *in-vivo* anti-obezite aktivitesi çalışmasında kullanılmak üzere 100 gram hayıt yaprak, çiçek ve meyvelerinden 1:10 DEO (drog/ekstre oranı) ile %70 EtOH ve %100 su çözücülerıyla hazırlanmış 6 adet ekstrelerin verimleri, Tablo 6.10'da gösterilmiştir.

Tablo 6.12: In-vivo anti-obezite aktivite çalışması ekstre verimleri.

Ekstre	%Verim
Hayıt yaprak %70 EtOH	32,32
Hayıt yaprak %100 su	27,67
Hayıt çiçek %70 EtOH	35,00
Hayıt çiçek %100 su	30,16
Hayıt meyve %70 EtOH	12,77
Hayıt meyve %100 su	11,81

6.4.2 Ekstrelerin total fenolik madde miktarları

V. agnus-castus bitkisinden elde edilen ekstrelerin spektrofotometrik yöntem kullanılarak tayin edilmiş olan total fenolik madde miktarları gallik asit eşdeğeri olarak Tablo 6.11’de yer almaktadır. En yüksek total fenolik içeriğine sahip üç ekstre; hayıt çiçek %70 EtOH ($68,42 \pm 1,20$), hayıt yaprak %100 su ($50,78 \pm 1,81$) ve hayıt yaprak %70 EtOH ($49,11 \pm 0,82$) olarak tespit edilmiştir.

Tablo 6.13: Ekstrelerin total fenol madde miktarları.

Ekstre	Total fenol ^a içeriği \pm S.S. ^b
Hayıt yaprak %70 EtOH	$49,11 \pm 0,82$
Hayıt yaprak %100 su	$50,78 \pm 1,81$
Hayıt çiçek %70 EtOH	$68,42 \pm 1,20$
Hayıt çiçek %100 su	$40,89 \pm 0,87$
Hayıt meyve %70 EtOH	$27,05 \pm 0,79$
Hayıt meyve %100 su	$22,66 \pm 0,83$

^a Veriler, 1 g ekstredeki gallik asit eşdeğerinin mg cinsinden değeridir.

^b Standart sapma (n = 3).

6.4.3 Ekstrelerin total flavonoit madde miktarları

V. agnus-castus bitkisinden elde edilen ekstrelerin spektrofotometrik yöntem kullanılarak tayin edilmiş olan total flavonoit madde miktarları kersetin eşdeğeri olarak Tablo 6.12’de yer almaktadır. En yüksek total flavonoit içeriğine sahip üç ekstre; hayıt yaprak %70 EtOH ($31,99 \pm 1,17$), hayıt çiçek %70 EtOH ($21,76 \pm 1,51$) ve hayıt yaprak %100 su ($21,67 \pm 1,46$) olarak hesaplanmıştır.

Tablo 6.14: Ekstrelerin total flavonoit madde miktarları.

Ekstre	Total flavonoit ^a içeriği \pm S.S. ^b
Hayıt yaprak %70 EtOH	31,99 \pm 1,17
Hayıt yaprak %100 su	21,67 \pm 1,46
Hayıt çiçek %70 EtOH	21,76 \pm 1,51
Hayıt çiçek %100 su	9,00 \pm 0,49
Hayıt meyve %70 EtOH	11,21 \pm 0,74
Hayıt meyve %100 su	3,17 \pm 0,17

^a Veriler, 1 g ekstredeki kersetin eşdeğerinin mg cinsinden değeridir.

^b Standart sapma (n = 3).

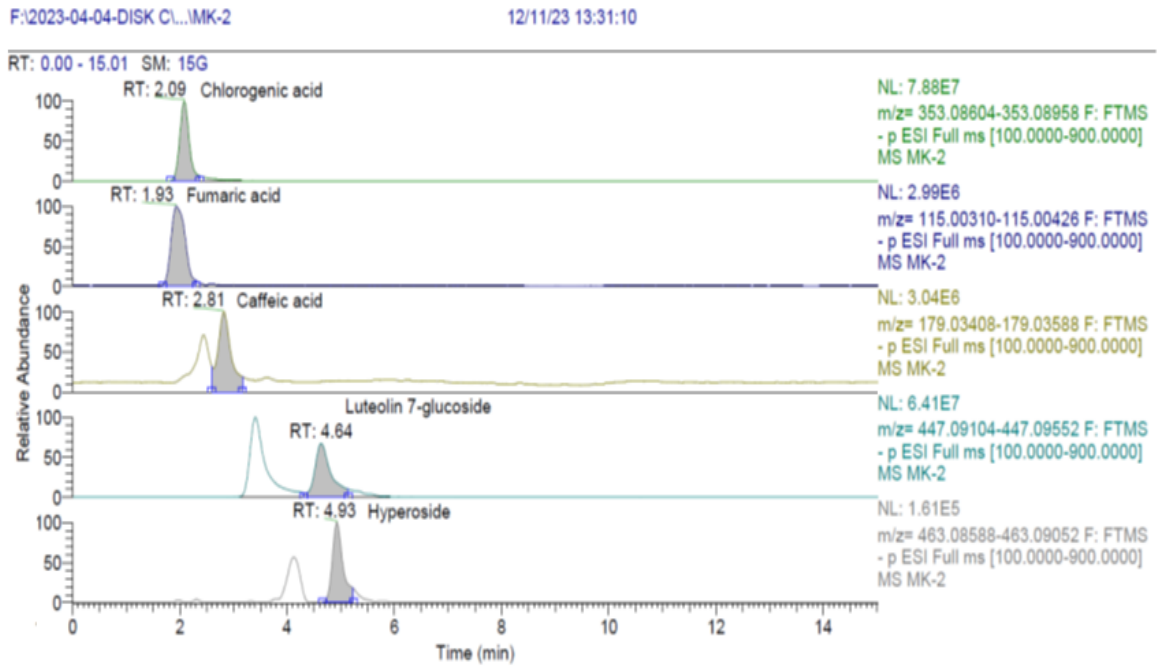
6.4.4 Ekstrelerin LC-HRMS sonuçları

In-vivo anti-obezite aktivite çalışmasında kullanılan 6 adet ekstrelerin fenolik madde içerikleri, Bezmialem Vakıf Üniversitesi İLMER’de bulunan LC-HRMS cihazı kullanılarak tayin edilmiştir. Bileşikler; İLMER Kütüphanesi’nde bulunan bileşiklerin alıkonma süreleri ve hedef iyonları karşılaştırılarak tespit edilmiştir. Analiz sonuçları incelendiğinde hayıt ekstrelerinin fenolik bileşikler açısından oldukça zengin olduğu görülmektedir. Hayıt yaprak %70 etanol kuru ekstresinin (HYE) majör fenolik bileşenleri başlıca klorojenik asit (3889,66 mg/100 g), fumarik asit (2844,38 mg/100 g) ve luteolin-7-glukozit (1720,26 mg/100 g) olarak analiz edilmiştir. Benzer şekilde, hayıt yaprak su kuru ekstresinin (HYS) ana fenolik bileşenleri sırasıyla klorojenik asit (6958,63 mg/100 g), fumarik asit (4806,52 mg/100 g) ve luteolin-7-glukozit (690,49 mg/100 g) olarak tespit edilmiştir. Klorojenik asit (8227,81 mg/100 g), apigenin-7-glukozit (684,02 mg/100 g) ve luteolin-7-glukozit (653,04 mg/100 g) hayıt çiçek %70 etanol kuru ekstresinin (HÇE) başlıca fenolik bileşikler olarak analiz edilirken; fumarik asit (7373,07 mg/100 g), klorojenik asit (4789,74 mg/100 g) ve kistin (108,51 mg/100 g) hayıt çiçek su kuru ekstresinin (HÇS) majör fenolik bileşenleri olarak belirlenmiştir. Hayıt meyve %70 etanol kuru ekstresinin (HME) başlıca fenolik bileşikler fumarik asit (4159,18 mg/100 g), kistin (3264,28 mg/100 g) ve klorojenik asit (826,60 mg/100 g) olarak tespit edilmiştir. Hayıt meyve su kuru ekstresinin (HMS) ana fenolik bileşikler ise başlıca penduletin (8453,61 mg/100 g), kistin (504,43 mg/100 g) ve luteolin-7-glukozit (187,04 mg/100 g) olarak analiz edilmiştir (Tablo 6.13). Ekstrele ait kromatogramlar Şekil 6.22- Şekil 6.26’da yer almaktadır.

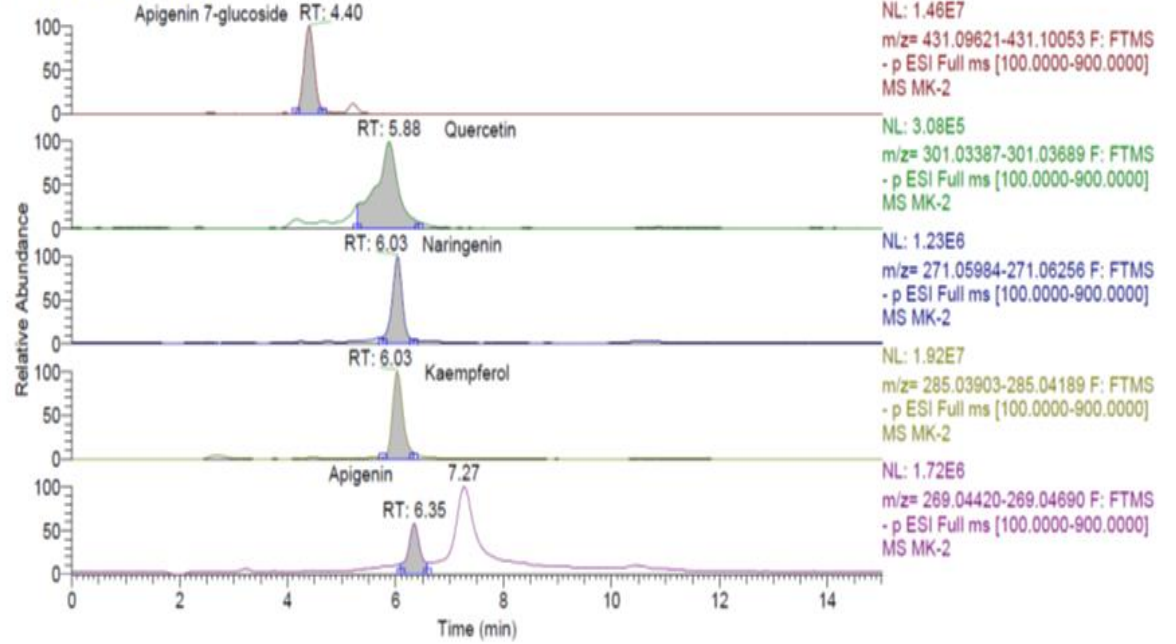
Tablo 6.15: Ekstrelerin LC-HRMS bulguları.

Fenolik Bileşik	Rölatif belirsizlik (%)	m/z	HYE	HYS	HÇE	HÇS	HME	HMS
Apigenin	2,87	269,05	3,87	4,33	68,40	77,22	7,76	3,32
Apigenin-7-glukozit	3,59	431,10	241,42	8,81	684,02	52,04	93,53	-
Kafeik asit	3,74	179,04	40,82	145,13	63,63	107,11	61,13	0,90
Kastisin	6,55	375,11	409,64	160,46	590,36	108,51	3264,28	504,43
Klorojenik asit	3,58	353,09	3889,66	6958,63	8227,81	4789,74	826,60	138,45
Sirsilineol	3,90	343,08	40,72	10,95	153,71	22,45	501,70	63,43
Fumarik asit	2,88	115,01	2844,38	4806,52	-	7373,07	4159,18	-
Hiperozit	3,46	463,09	9,28	3,61	22,27	1,29	13,07	0,34
Kemferol	3,56	285,04	95,85	194,41	62,63	85,53	34,28	37,96
Luteolin-7-glukozit	4,14	447,09	1720,26	690,49	653,04	-	683,61	187,04
Naringenin	4,20	271,06	18,12	19,61	24,46	17,35	23,97	10,90
Penduletin	3,20	343,08	53,30	17,68	190,05	30,90	596,98	8453,61
Kersetin	2,95	301,04	4,02	2,14	2,35	1,98	14,77	2,55

%U: Rölatif belirsizlik; HYE: Hayıt yaprak %70 etanol kuru ekstresi; HYS: Hayıt yaprak su kuru ekstresi; HÇE: Hayıt çiçek %70 etanol kuru ekstresi; HÇS: Hayıt çiçek su kuru ekstresi; HME: Hayıt meyve %70 etanol kuru ekstresi; HMS: Hayıt meyve su kuru ekstresi.

**Şekil 6.21:** Hayıt yaprak %70 etanol kuru ekstresi kromatogramları.

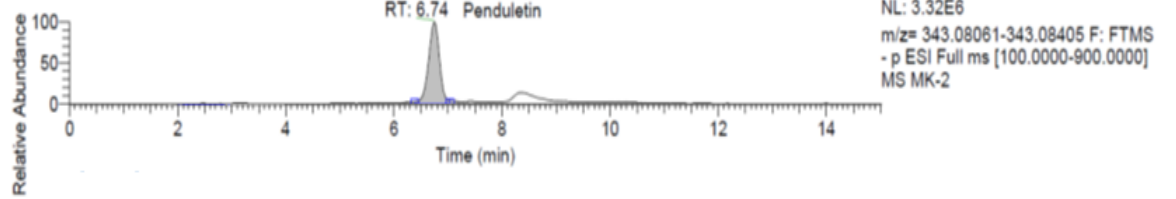
RT: 0.00 - 15.01 SM: 15G



F:\2023-04-04-DISK C\...MK-2

12/11/23 13:31:10

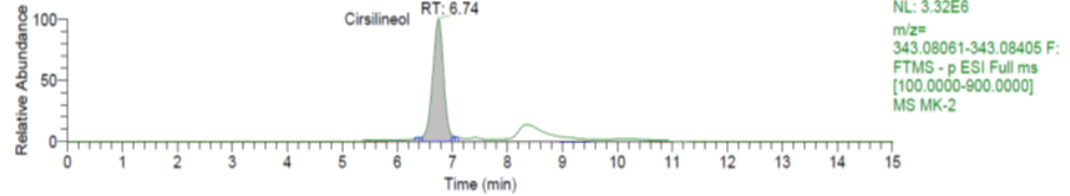
RT: 0.00 - 15.01 SM: 15G



F:\2023-04-04-DISK C\...MK-2

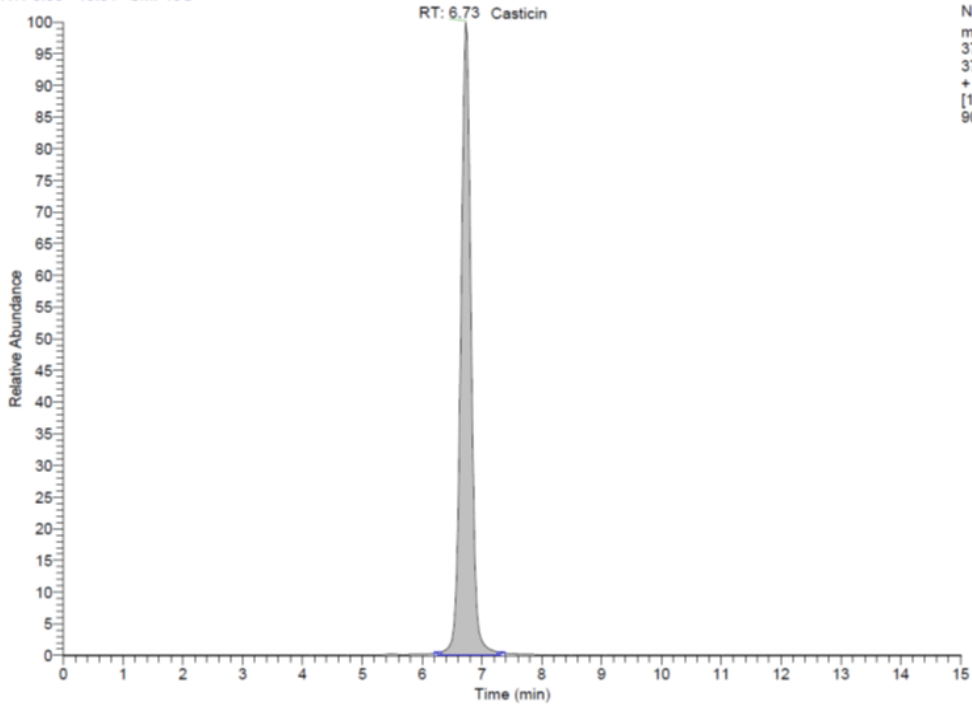
12/11/23 13:31:10

RT: 0.00 - 15.01 SM: 15G



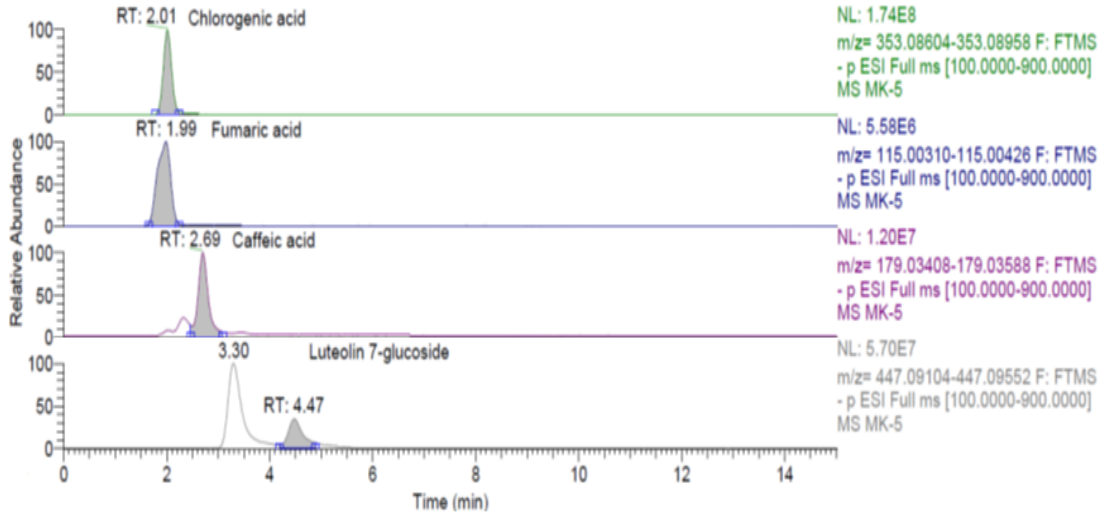
Şekil 6.22 (devamı): Hayıt yaprak %70 etanol kuru ekstresi kromatogramları.

RT: 0.00 - 15.01 SM: 15G



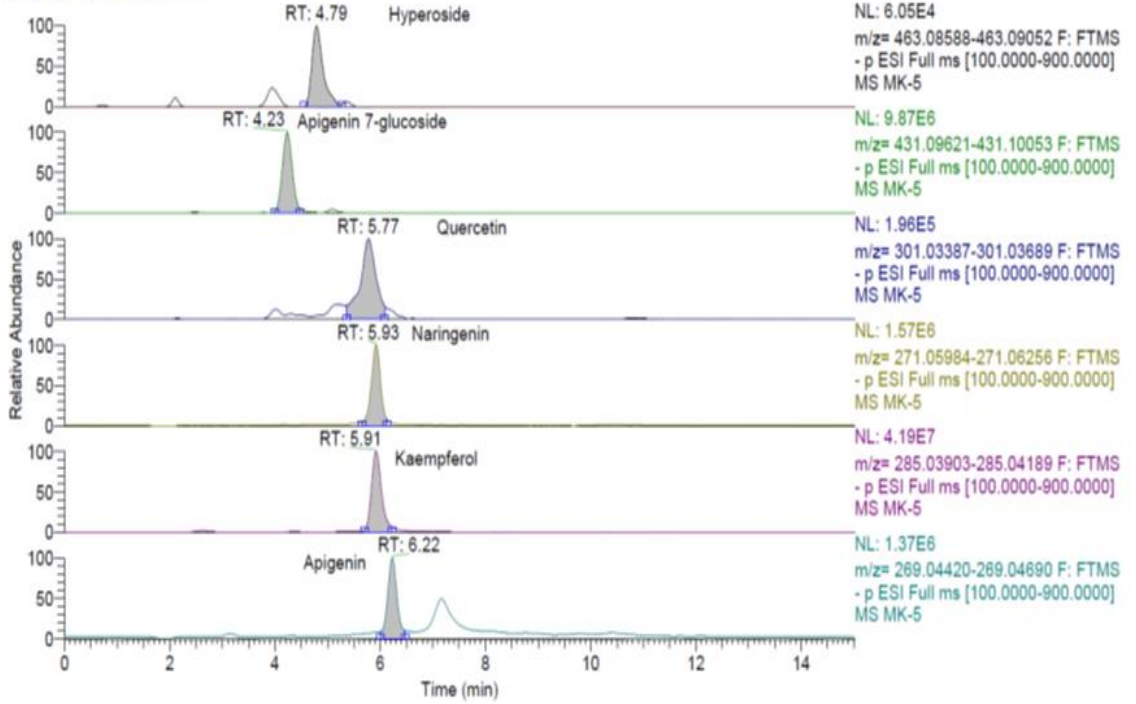
Şekil 6.21 (devamı): Hayıt yaprak %70 etanol kuru ekstresi kromatogramları.

RT: 0.00 - 15.01 SM: 15G



Şekil 6.23: Hayıt yaprak su kuru ekstresi kromatogramları.

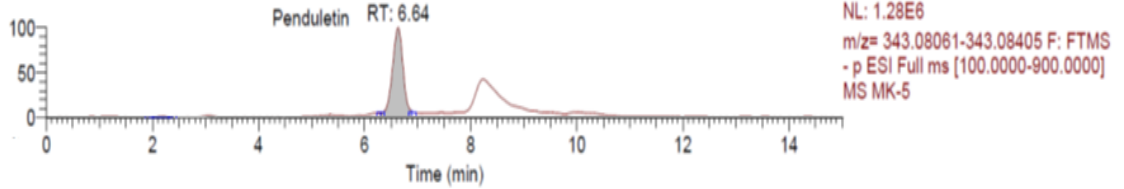
RT: 0.00 - 15.01 SM: 15G



F:\2023-04-04-DISK C\...MK-5

12/11/23 14:19:28

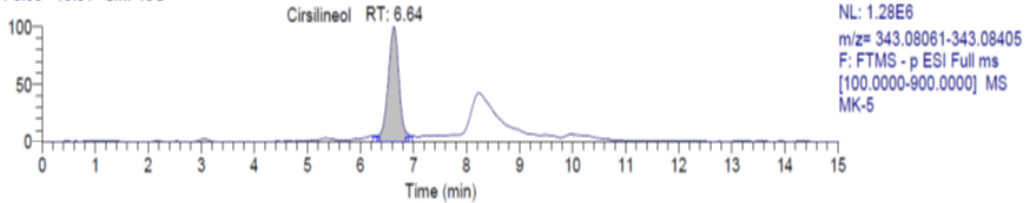
RT: 0.00 - 15.01 SM: 15G



F:\2023-04-04-DISK C\...MK-5

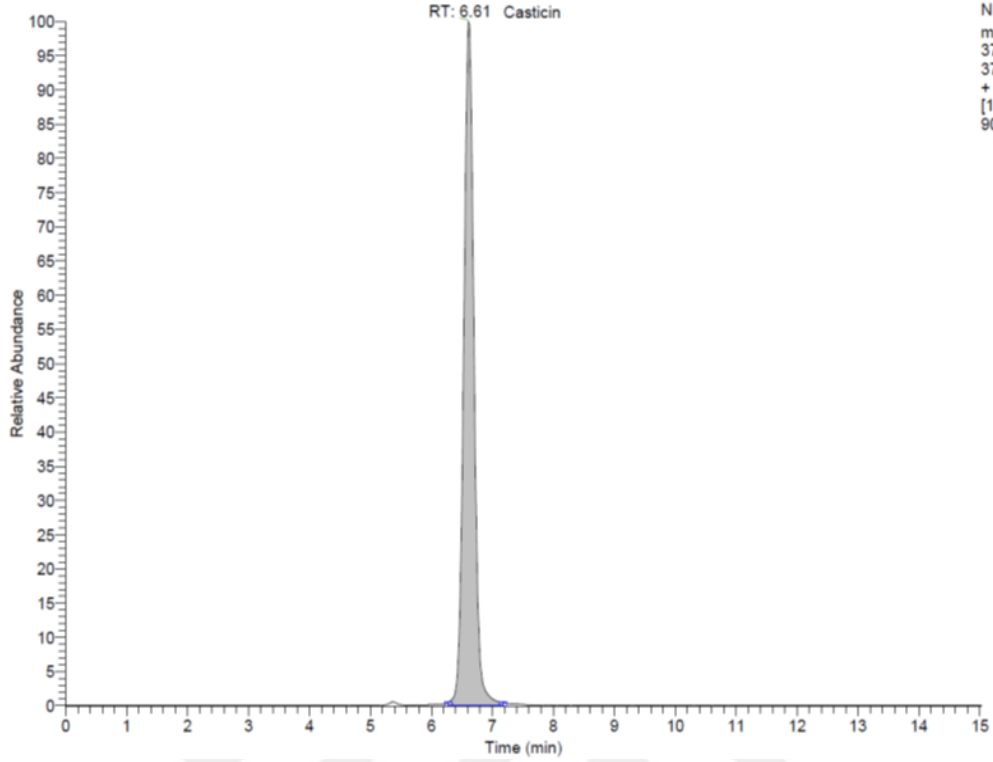
12/11/23 14:19:28

RT: 0.00 - 15.01 SM: 15G



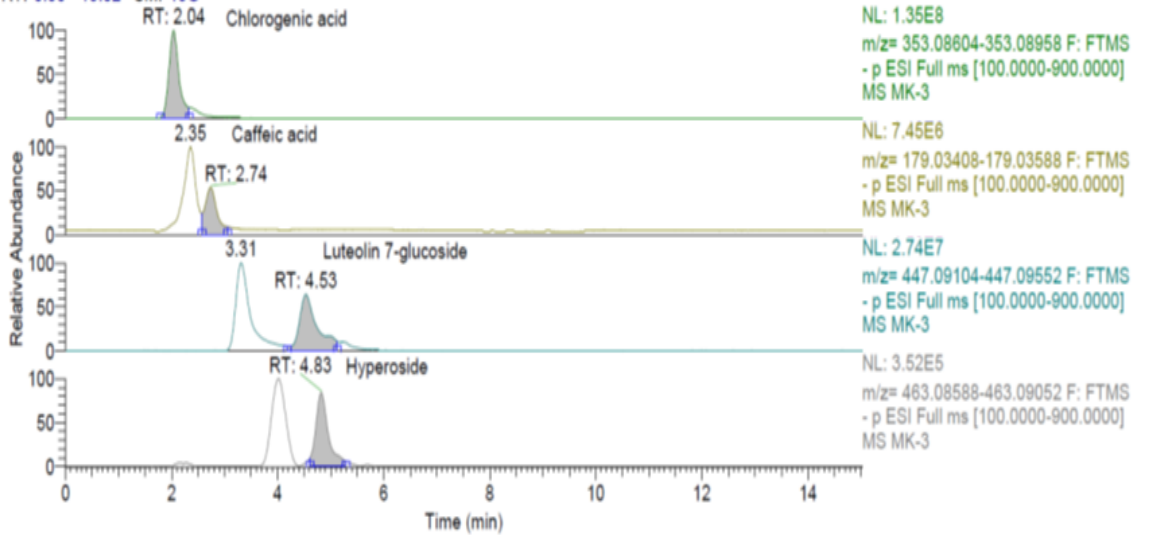
Şekil 6.22 (devamı): Hayıt yaprak su kuru ekstresi kromatogramları.

RT: 0.00 - 15.01 SM: 15G



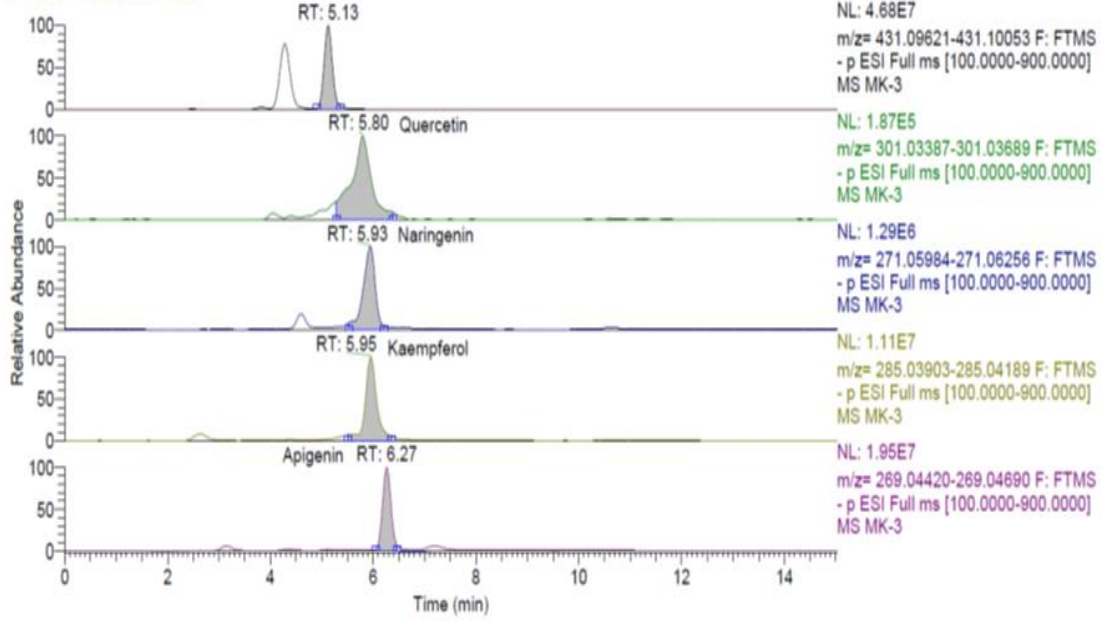
Şekil 6.22 (devamı): Hayıt yaprak su kuru ekstresi kromatogramları.

RT: 0.00 - 15.02 SM: 15G



Şekil 6.24: Hayıt çiçek %70 etanol kuru ekstresi kromatogramları.

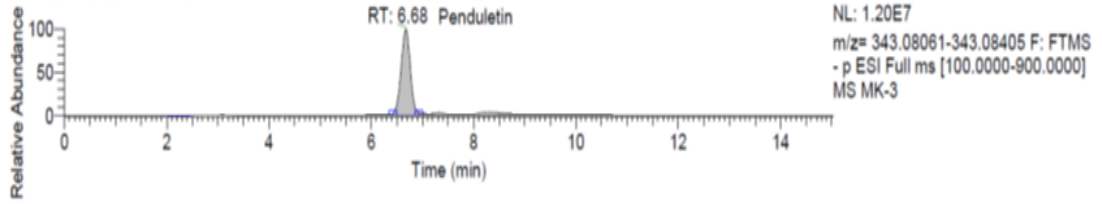
RT: 0.00 - 15.02 SM: 15G



F:\2023-04-04-DISK C\...MK-3

12/11/23 13:47:18

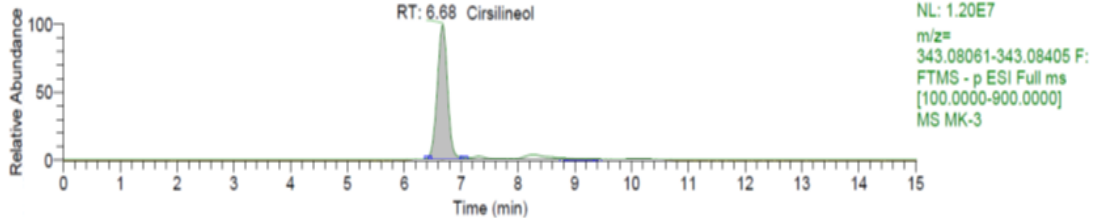
RT: 0.00 - 15.02 SM: 15G



F:\2023-04-04-DISK C\...MK-3

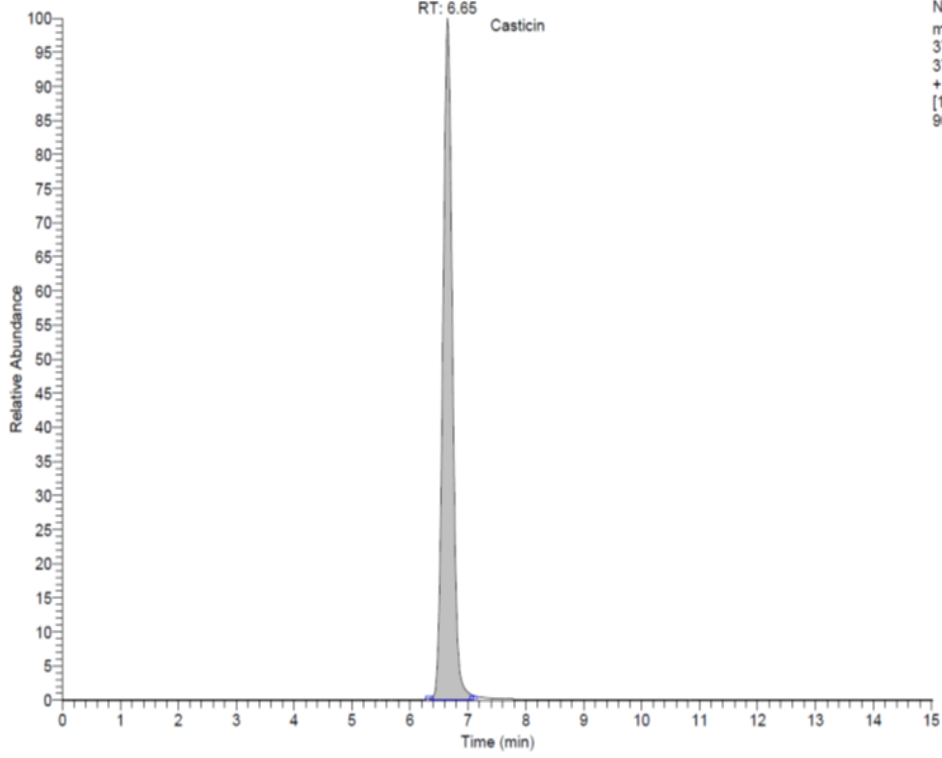
12/11/23 13:47:18

RT: 0.00 - 15.02 SM: 15G



Şekil 6.23 (devamı): Hayıt çiçek %70 etanol kuru ekstresi kromatogramları.

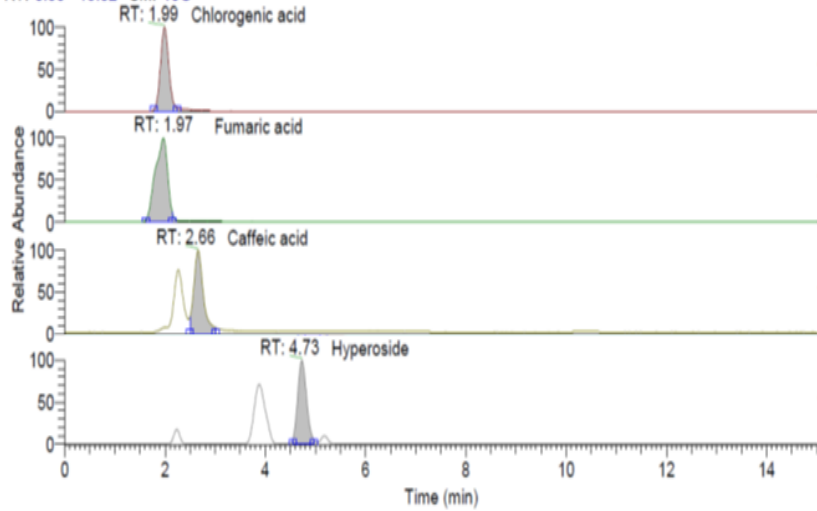
RT: 0.00 - 15.02 SM: 15G



NL: 2.45E8
m/z=
375.10556-
375.10932 F: FTMS
+ p ESI Full ms
[100.0000-
900.0000] MS MK-3

Şekil 6.23 (devamı): Hayıt çiçek %70 etanol kuru ekstresi kromatogramları.

RT: 0.00 - 15.02 SM: 15G



NL: 1.38E8
m/z= 353.08604-353.08958 F: FTMS
- p ESI Full ms [100.0000-900.0000]
MS MK-6

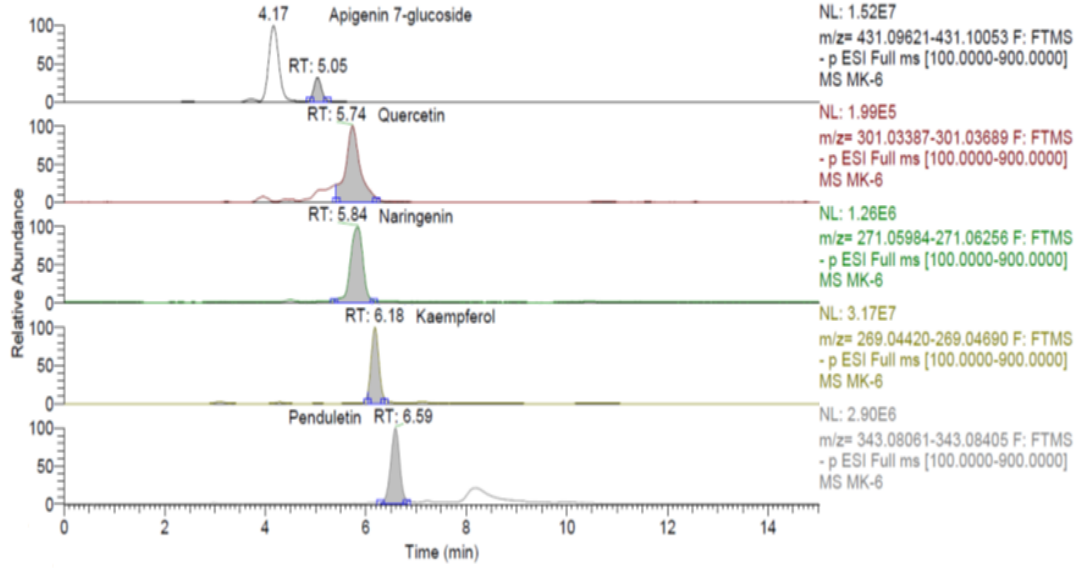
NL: 1.09E7
m/z= 115.00310-115.00426 F: FTMS
- p ESI Full ms [100.0000-900.0000]
MS MK-6

NL: 1.05E7
m/z= 179.03408-179.03588 F: FTMS
- p ESI Full ms [100.0000-900.0000]
MS MK-6

NL: 2.89E4
m/z= 463.08588-463.09052 F: FTMS
- p ESI Full ms [100.0000-900.0000]
MS MK-6

Şekil 6.25: Hayıt çiçek su kuru ekstresi kromatogramları.

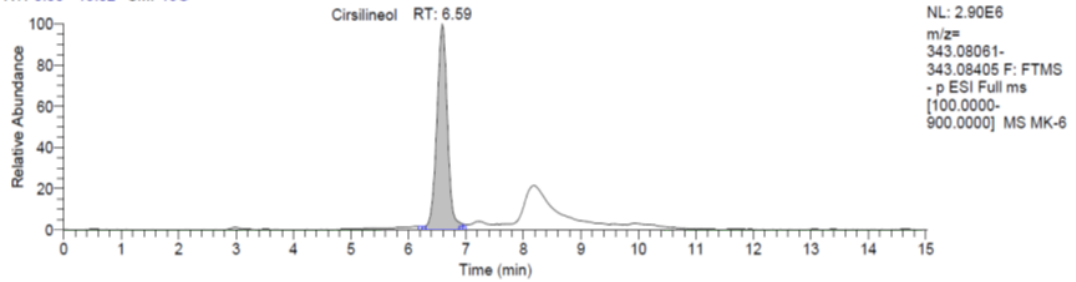
RT: 0.00 - 15.02 SM: 15G



F:\2023-04-04-DISK Cl...MK-6

12/11/23 14:35:34

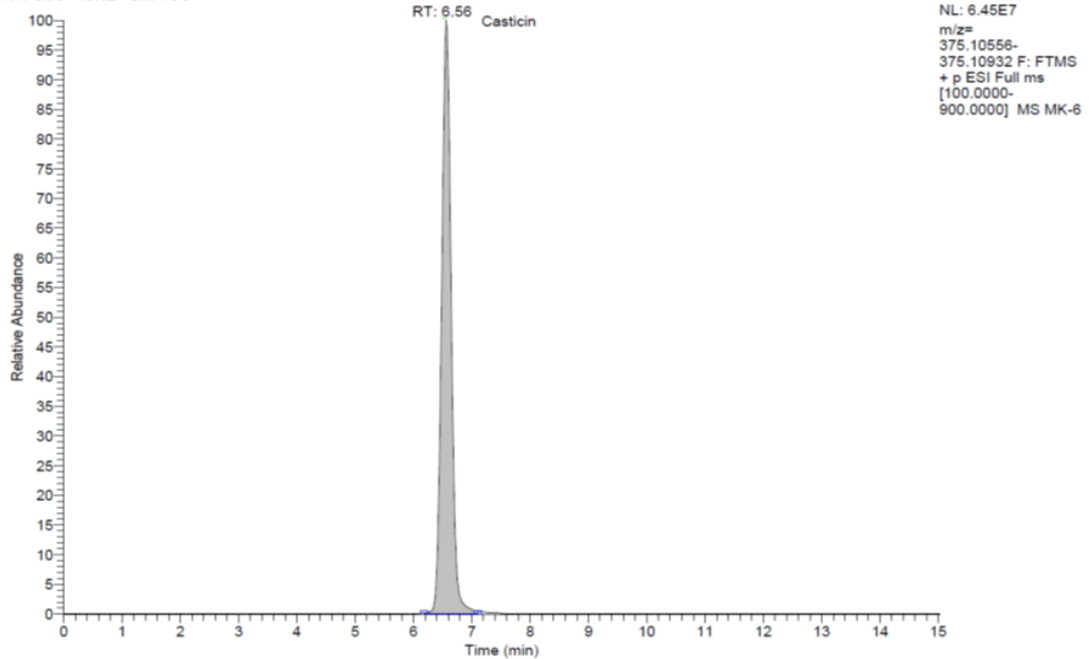
RT: 0.00 - 15.02 SM: 15G



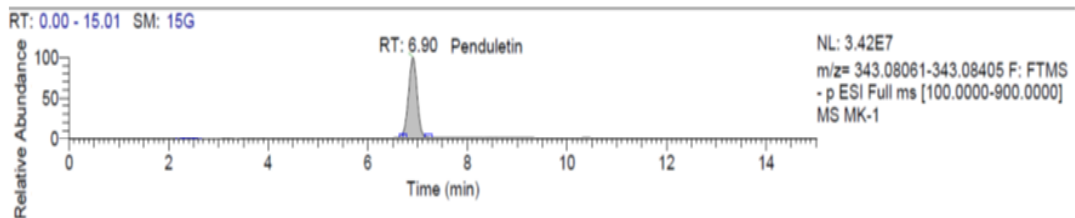
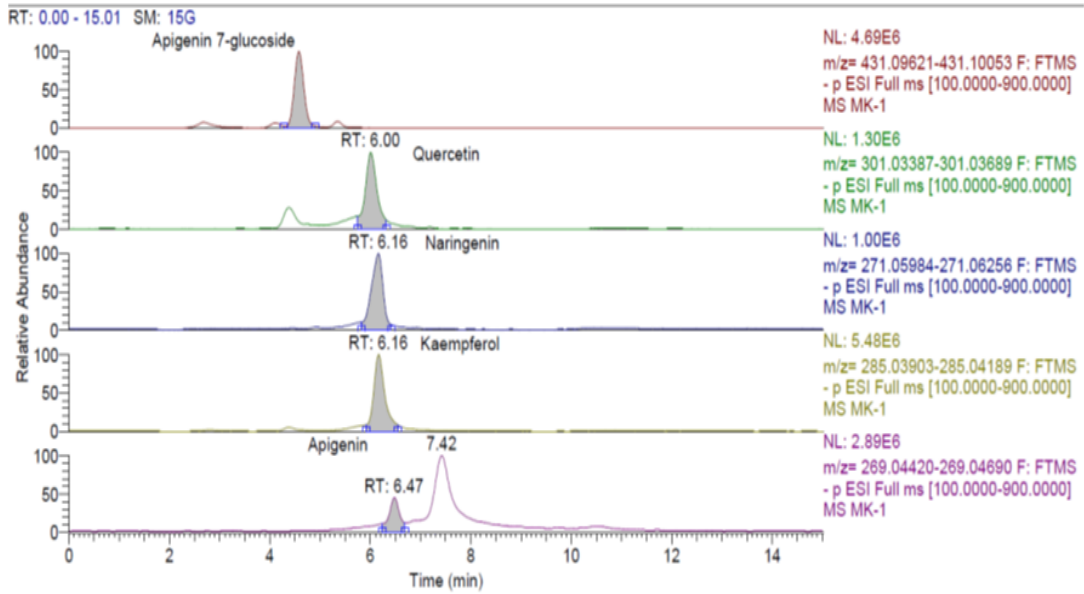
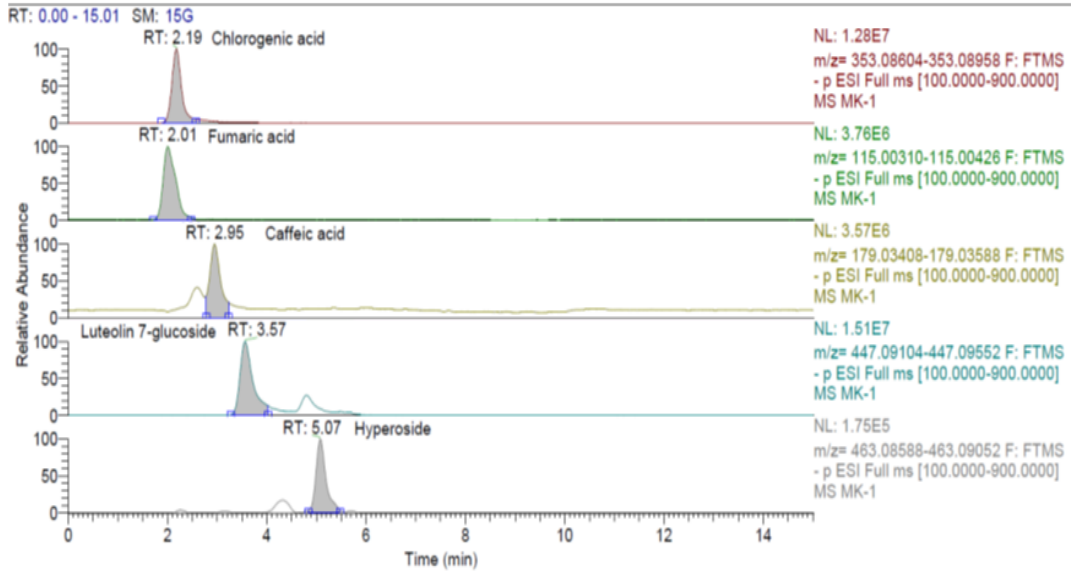
F:\2023-04-04-DISK Cl...MK-6

12/11/23 14:35:34

RT: 0.00 - 15.02 SM: 15G

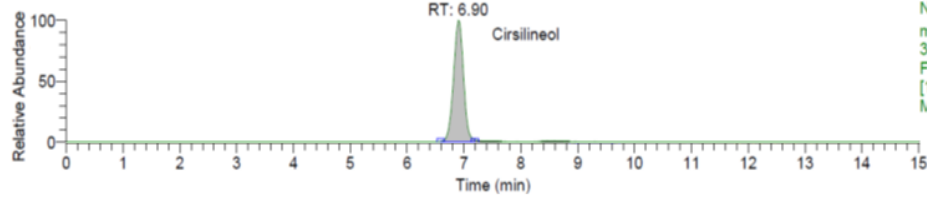


Şekil 6.24 (devamı): Hayıt çiçek su kuru ekstresi kromatogramları.



Şekil 6.26: Hayıt meyve %70 etanol kuru ekstresi kromatogramları.

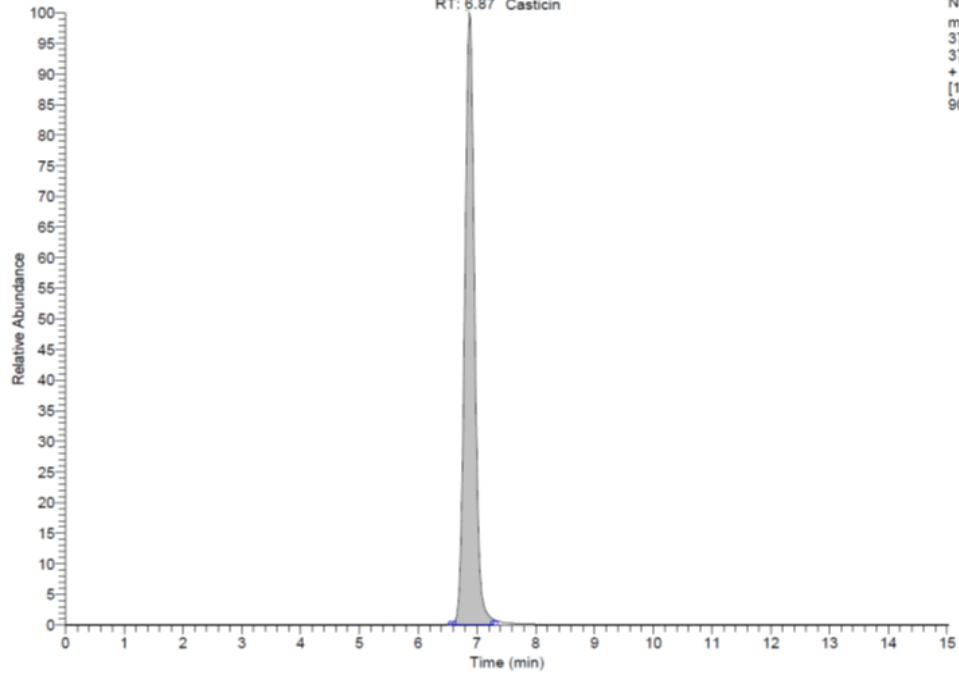
RT: 0.00 - 15.01 SM: 15G



F:\2023-04-04-DISK CL...MK-1

12/11/23 13:15:04

RT: 0.00 - 15.01 SM: 15G

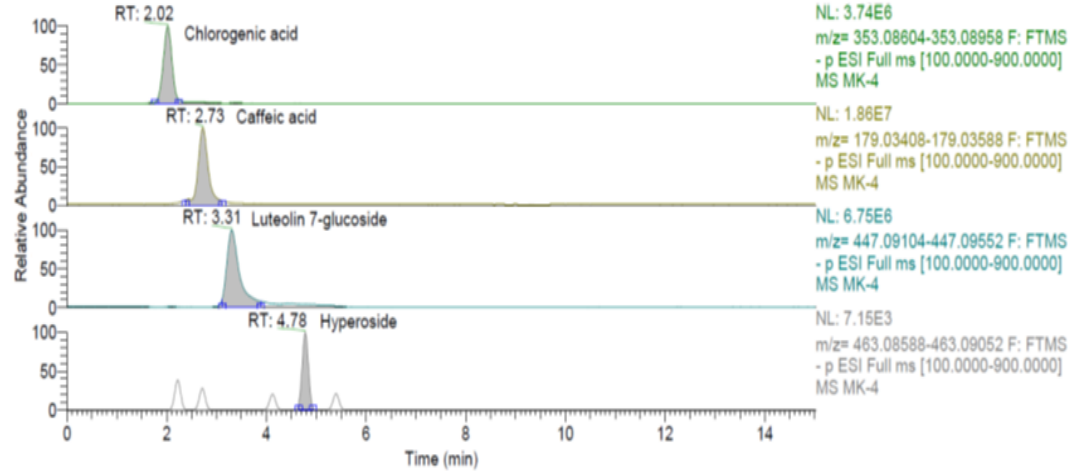


Şekil 6.25 (devamı): Hayıt meyve %70 etanol kuru ekstresi kromatogramları.

F:\2023-04-04-DISK CL...MK-4

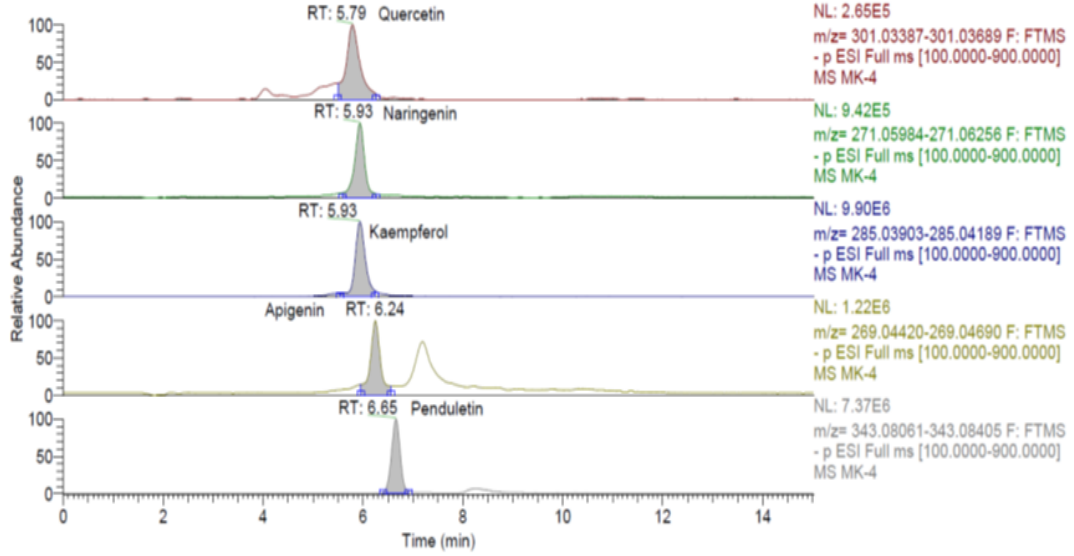
12/11/23 14:03:22

RT: 0.00 - 15.02 SM: 15G



Şekil 6.27: Hayıt meyve su kuru ekstresi kromatogramları.

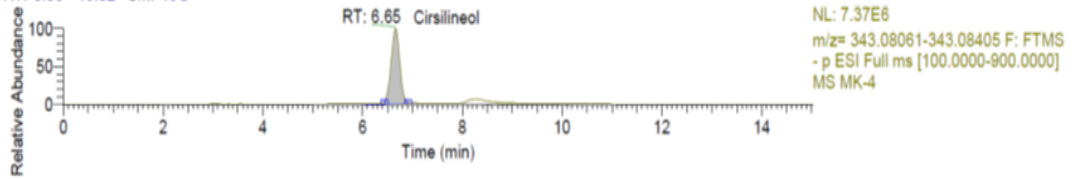
RT: 0.00 - 15.02 SM: 15G



F:\2023-04-04-DISK Cl...MK-4

12/11/23 14:03:22

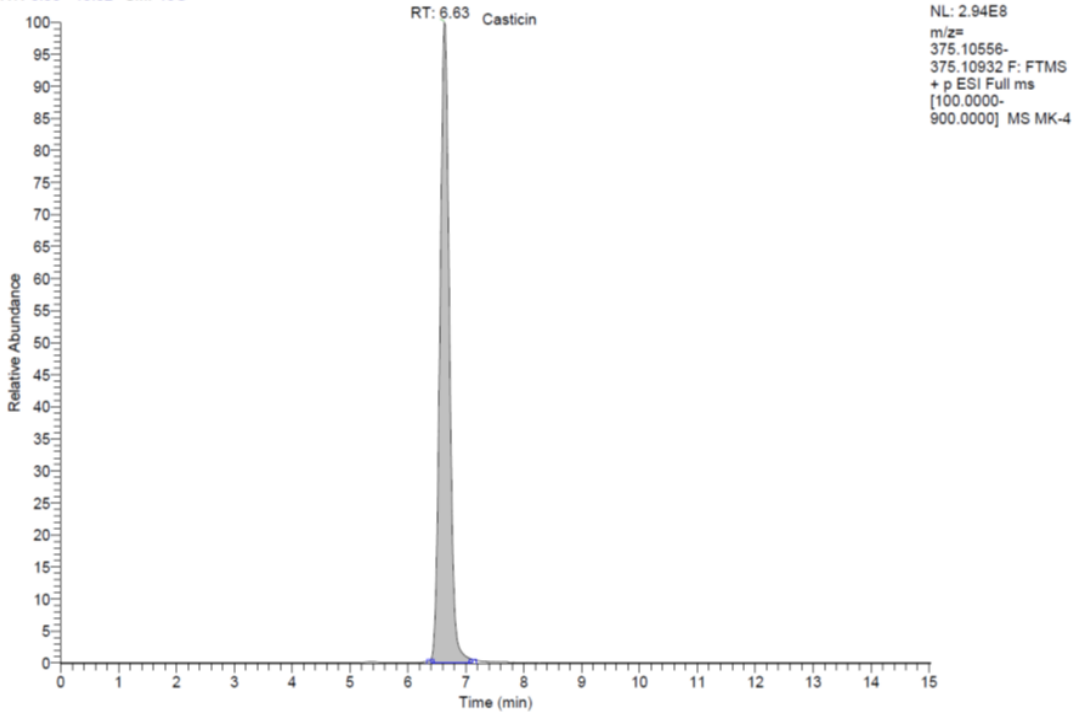
RT: 0.00 - 15.02 SM: 15G



F:\2023-04-04-DISK Cl...MK-4

12/11/23 14:03:22

RT: 0.00 - 15.02 SM: 15G



Şekil 6.26 (devam): Hayıt meyve su kuru ekstresi kromatogramları.

6.4.5 *In-vivo* anti-obezite aktivite çalışma bulguları

7 haftalık deney süresi sonunda elde edilen ağırlık ortalaması verilerine göre en yüksek antiobezite etki, referans madde grubu olan orlistat grubunda gözlemlenmiştir. Aynı zamanda negatif kontrol grubuyla karşılaştırıldığında hayıt yaprak %70 etanol (HYE), hayıt yaprak su (HYS) ve hayıt çiçek %70 etanol (HÇE) kodlu kuru ekstrelerin antiobezite etkisi görülmüş olup en yüksek antiobezite etkinin HYE kodlu test numunesi uygulaması gerçekleştirilen grupta olduğu belirlenmiştir.

Ağırlık ortalaması sonuçlarına göre 7 haftalık deney süresi sonunda kontrol grubu'nun ortalama ağırlığının 299,31 g, negatif kontrol grubunun 391,28 g ve referans madde grubunun 291,12 g olduğu belirlenmiştir. Test numunelerinden HYE, HYS ve HÇE gruplarının ortalama ağırlıklarının ise sırasıyla 297,43, 301,03 ve 305,14 g olduğu belirlenmiştir.

Deney tamamlandığında sıçanların almış olduğu almış olduğu toplam ağırlık miktarının ağırlık farkı sonuçlarına göre ortalamasının HYE kodlu test numunesi grubunda 81,64 g; HYS kodlu test numunesi grubunda 75,17 g; HÇE nolu test numunesi grubunda 92,67 g olduğu tespit edilmiştir. Buna paralel olarak deney süresi tamamlandığında, karın içi yağ dokusunun genel görüntüsünün değerlendirilmesi sonucunda obezite grubunun diğer gruplardan daha fazla oranda karın içi yağı içermekte olduğu görülmüştür.

Ağırlık açısından elde edilen bulgulara göre kontrol grubu ve negatif kontrol grubu ile karşılaştırıldıklarında HYE, HYS ve HÇE kodlu test numunelerine ait gruplarda vücut ağırlığında düşüş olduğu belirlenmiştir (Tablo 6.14).

Gerçekleştirilen tez çalışması ile elde edilen sonuçlar, literatürde bulunmakta olan yüksek yağlı diyetin visceral dokular içerisinde lipit birikmesine ve vücut ağırlığı ile leptin seviyelerinin yükselmesine yol açtığı görüşüne paraleldir [166-168]. Enerji homeostazı, vücut içerisinde gerçekleştirilen bir dizi kompleks ve dinamik süreçleri kapsamaktadır. Leptin hormonu bu süreçler içerisinde, santral sinir sistemi ile periferik dokulardaki spesifik reseptörler vasıtasıyla metabolik etkisini göstermekte olup, gıda alımı ve enerji homeostazında başlıca düzenleyici rolüne sahiptir [169].

Tablo 6.16: Deney gruplarının çalışma sürecindeki ağırlıkları.

Gruplar	Ortalama ağırlık (g) ± SS							
	0. Hafta	1. Hafta	2. Hafta	3. Hafta	4. Hafta	5. Hafta	6. Hafta	7. Hafta
Kontrol	221,40 ± 10,85	239,95 ± 12,94	249,44 ± 13,26	258,12 ± 14,61	265,34 ± 13,61	278,36 ± 12,54	289,46 ± 10,32	299,31 ± 12,44
Negatif kontrol	234,66 ± 12,08	251,13 ± 14,05	298,51 ± 12,19	319,26 ± 13,04	327,43 ± 11,36	366,55 ± 11,13	378,23 ± 11,01	391,28 ± 10,12
HYE	215,79 ± 8,64	223,64 ± 9,22	237,06 ± 10,27	246,32 ± 12,91	259,01 ± 13,34	274,34 ± 12,80	289,34 ± 11,18	297,43 ± 9,37
HYS	225,86 ± 9,15	230,12 ± 12,31	241,36 ± 11,07	262,11 ± 12,53	274,82 ± 12,64	289,26 ± 10,45	292,05 ± 9,76	301,03 ± 11,35
HÇE	212,47 ± 7,48	225,58 ± 9,09	239,14 ± 9,05	248,11 ± 11,09	261,95 ± 10,12	286,03 ± 9,34	294,32 ± 9,01	305,14 ± 10,22
HÇS	224,55 ± 9,94	242,52 ± 7,82	261,43 ± 9,52	278,47 ± 10,45	286,69 ± 11,27	291,16 ± 11,46	314,07 ± 12,33	329,27 ± 10,54
HME	233,47 ± 8,89	246,83 ± 14,13	261,24 ± 12,61	274,76 ± 13,91	288,11 ± 14,92	297,44 ± 11,92	312,64 ± 9,98	343,12 ± 9,26
HMS	236,17 ± 7,23	259,78 ± 10,14	274,52 ± 9,53	285,24 ± 10,67	297,27 ± 12,91	306,72 ± 14,21	313,52 ± 12,26	355,04 ± 10,13
Referans madde	221,27 ± 6,79	229,50 ± 7,06	237,61 ± 8,01	251,13 ± 8,26	262,13 ± 8,10	284,32 ± 8,02	290,31 ± 9,12	291,12 ± 8,61

HYE: Hayıt yaprak %70 etanol ekstresi; HYS: Hayıt yaprak su ekstresi; HÇE: Hayıt çiçek %70 etanol ekstresi; HÇS: Hayıt çiçek su ekstresi; HME: Hayıt meyve %70 etanol ekstresi; HMS: Hayıt meyve su ekstresi.

Leptin adiposit kökenli bir hormon olup enerjinin vücut içinde kullanılması için yağ dokusundan gelen sinyalleri uyarmaktadır [169, 170]. Leptin, hipotalamik reseptörler aracılığıyla vücutta başlıca iştah kontrolünün gerçekleştiği kısım olarak da adlandırılan yaysı çekirdeğinde nöropeptid Y'nin (NPY) salımını baskılayarak iştahın azalmasına yola açarken, sempatik sinir sistemini aktive eder ve metabolizmayı hızlandırarak enerji harcanmasını çoğaltır [171].

Tez kapsamında yürütülen çalışmada, deney gruplarından elde edilen serumların HDL-C, LDL-C ve trigliserit ile yağ dokularından salgılanan ve obeziteyle ilişkili olan adiponektin ve leptin düzeyleri dislipidemiye değerlendirmek üzere ölçülmüştür. Negatif kontrol grubu ile kıyaslandığında HYE, HYS ve HÇE kodlu test numuneleri ile referans madde grubunda serum LDL, trigliserit, leptin seviyelerinin azaldığı görülürken, HDL-C ve adiponektin seviyelerinin artmış olduğu tespit edilmiştir (Tablo 6.15). 12 hafta boyunca yüksek yağlı diyet ile beslenen farelerin serum LDL-C, TG ve kolesterol seviyelerinin önemli derecede yükseldiği Yang ve arkadaşları tarafından 2006 yılında yürütülmüş bir *in-vivo* çalışmada tespit edilmiştir. Tez kapsamında gerçekleştirilen çalışma ile elde edilen sonuçlar Yang ve arkadaşları tarafından yürütülmüş çalışma ile uyumludur [167].

T₄ tiroid bezi tarafından sentezlenmekte olan bir hormondur. T₄ enzimatik 5'-deiodinasyonuna uğrayarak metabolik olarak aktif formu olan T₃'e dönüştürülmektedir [172]. Kanda bulunan tiroid hormonları, plazma proteinlerine bağlanarak albümin, tiroksin bağlayıcı globülin (TBG) ve tiroksin bağlayıcı ön albümin (TBPA) ile hücre sel membranları geçebilen ve tiroid hormonlarının aktif formları olarak kabul edilen serbest formlarla denge halinde bulunurlar [172]. Tiroid hormonları, vücutta ATP tüketimini arttırmakta ve ATP sentezinin etkinliğini düşürerek termojenezi indüklemektedir [173]. Tiroid hormonları bu etkilerini, mitokondrinin iç zarındaki ayırıcı proteini (UCP) uyararak proton bağlanmasının önlenmesi ve ATP sentezi yerine ısı salımı sağlayarak daha çok enerji tüketilmesi mekanizmaları ile göstermektedir [174].

Tez kapsamında yürütülen çalışmada, çalışma gruplarında T₃ ve T₄ düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülemediği (Tablo 6.15). Literatürde bulunmakta olan araştırmalarla yüksek yağlı diyetin, T₄ deiyodasyonunun ve hedef hücreler tarafından T₄ alımının artması ile ilişkili olduğu ve yağ asitlerinin hipofiz T₃ ve T₄ alımlarını farklı şekilde düzenleyebildiği ortaya konulmuştur [175, 176]. Bu sebeple de yüksek yağ diyetinden kaynaklanan daha yüksek T₄ alımının, normal serum

T₄ konsantrasyonuna, yüksek serum T₃ düzeylerine ve yüksek tiroid hormon etkisine yol açması mümkün görünmektedir [177]. Tez kapsamında yürütülen çalışmadan elde edilen sonuçlarda, test numunelerinin T₃ ve T₄ düzeylerinde herhangi bir etkilerinin olmadığı görülmüştür.



Tablo 6.17: HDL-C, LDL-C, trigliserit, adinopektin, leptin, T₃ ve T₄ düzeyleri.

Gruplar	HDL (mg/dL)	LDL (mg/dL)	Trigliserit (mg/dL)	Adiponektin (ng/mL)	Leptin (ng/dL)	T ₃ (pg/mL) (%)	T ₄ (ng/mL) (%)
Kontrol	97,34 ± 6,72	37,09 ± 3,81	98,43 ± 5,34	12,03 ± 2,55	1,71 ± 0,83	1,42 ± 0,55	0,54 ± 0,29
Negatif kontrol	62,52 ± 4,17	45,40 ± 3,24	116,27 ± 6,51	9,34 ± 1,42	4,98 ± 1,56	1,30 ± 0,41	0,45 ± 0,34
HYE	94,45 ± 5,57	31,27 ± 4,26	72,14 ± 5,08	12,16 ± 1,05	1,51 ± 0,38	1,44 ± 0,91	0,54 ± 0,05
HYS	93,54 ± 5,65	32,71 ± 2,65	83,96 ± 4,37	12,41 ± 2,05	1,59 ± 0,71	1,31 ± 0,35	0,46 ± 0,03
HÇE	82,65 ± 3,27	31,90 ± 3,61	83,23 ± 4,14	10,67 ± 1,42	1,63 ± 0,51	1,27 ± 0,47	0,33 ± 0,02
HÇS	78,22 ± 6,51	32,46 ± 3,48	85,01 ± 4,53	10,63 ± 0,98	2,51 ± 0,98	1,53 ± 0,62	0,52 ± 0,05
HME	69,14 ± 5,93	33,15 ± 4,12	94,32 ± 6,96	11,32 ± 1,74	2,72 ± 0,56	1,34 ± 0,31	0,47 ± 0,06
HMS	71,61 ± 6,05	35,28 ± 3,29	96,77 ± 5,13	9,51 ± 1,44	2,19 ± 1,05	1,35 ± 0,54	0,31 ± 0,12
Referans madde	95,40 ± 4,19	29,53 ± 3,41	71,65 ± 4,82	13,05 ± 1,63	1,43 ± 0,82	1,31 ± 0,29	0,39 ± 0,08

HYE: Hayıt yaprak %70 etanol ekstresi; HYS: Hayıt yaprak su ekstresi; HÇE: Hayıt çiçek %70 etanol ekstresi; HÇS: Hayıt çiçek su ekstresi; HME: Hayıt meyve %70 etanol ekstresi; HÇS: Hayıt meyve su ekstresi

Obeziteyle bağlantılı görülen kronik enflamasyonun incelenmesi amacıyla sıçanların serum TNF- α ve IL-1 β seviyeleri de analiz edilmiştir. HYE, HYS ve HÇE kodlu test numunelerinin serum TNF- α ve IL-1 β düzeylerinin negatif kontrol grubuyla karşılaştırıldığında daha düşük oranda olduğu görülmüştür (Tablo 6.16).

Tablo 6.18: Hayıt ekstrelerinin obezite modelinde serum sitokin düzeyleri.

Gruplar	TNF- α seviyesi (pg/mL)	IL-1 β seviyesi (pg/mL)
Kontrol	703,12 \pm 15,84	914,82 \pm 10,67
Negatif kontrol	925,31 \pm 17,06	1271,94 \pm 11,83
HYE	613,33 \pm 10,08	722,08 \pm 13,48
HYS	731,19 \pm 8,56	746,12 \pm 11,37
HÇE	692,31 \pm 11,25	790,68 \pm 17,08
HÇS	705,74 \pm 10,61	810,25 \pm 11,92
HME	794,02 \pm 11,26	813,05 \pm 9,97
HMS	786,13 \pm 9,73	820,94 \pm 8,89
Referans madde	675,09 \pm 9,82	731,28 \pm 10,04

HYE: Hayıt yaprak %70 etanol kuru ekstresi; HYS: Hayıt yaprak su kuru ekstresi; HÇE: Hayıt çiçek %70 etanol kuru ekstresi; HÇS: Hayıt çiçek su kuru ekstresi; HME: Hayıt meyve %70 etanol kuru ekstresi; HMS: Hayıt meyve su kuru ekstresi.

Plazmada insülin düzeylerinin artması adipoz dokular ile karaciğerde lipogenezisin uyarılmasına ve plazma leptin ve ob gen mRNA düzeylerinin yükselmesine yol açmaktadır [178, 179]. İnsülin hormonu bilhassa da kalp ve iskelet kasları ile yağ dokularına glukoz girişini ve dokuların insüline olan duyarlılığını yükseltmektedir [180]. Bunun yanı sıra, serbest yağ asitleri ve amino asitler gibi diğer besin maddelerinin de hücreye alımını sağlamaktadır. Glikoz, glikolizis sırasında oksitlenmekte olup sitoplazmadaki ATP / ADP oranını arttırmaktadır, yükselen ATP / ADP oranı ise insülin içeren granüllerin ekzositozunu indüklemektedir. Ayrıca, yağ asitleri de yüksek ATP / ADP oranına yol açmakta olan yağ asitlerinin β -oksidasyonunu tetikleyerek veya bazı protein kinazların aktive olmasını sağlayarak insülin üretimini arttırmaktadır. Uzun süreyle yüksek yağlı diyet uygulamasına bağlı oluşan hiperinsülinemi vücutta; pankreas hiperplazisi, yağ asitleri alımı ve yükselen pankreas β -hücreli glukoz metabolizması faaliyetleri ile oluşmaktadır [179].

Obeziteyle ilişkili olan insülin direncinin belirlenebilmesi için sıçanların kan glukoz ve serum insülin seviyeleri ölçülmüştür. Glukoz ölçüm cihazıyla belirlenen kan glukoz düzeylerinde belirgin bir fark gözlenmezken; serum insülin düzeyleri değerlendirildiğinde, referans madde grubunda ve HYE, HYS ve HÇE kodlu test

numunesi uygulanan gruplarda negatif kontrol grubuna oranla daha düşük düzeyde olduğu görülmüştür (Tablo 6.17).

Tablo 6.19: Kan glukoz ve serum insülin seviyeleri.

Gruplar	Kan glukoz seviyesi (mg/dL)	Serum insülin düzeyi (mIU/l)
Kontrol	122,70 ± 4,18	8,16 ± 1,90
Negatif kontrol	134,03 ± 4,96	11,93 ± 2,24
HYE	135,08 ± 4,62	6,89 ± 0,83
HYS	149,17 ± 6,24	7,79 ± 0,37
HÇE	145,26 ± 9,59	6,41 ± 0,81
HÇS	133,07 ± 11,36	7,46 ± 1,22
HME	121,13 ± 8,68	9,49 ± 1,49
HMS	129,54 ± 7,16	10,37 ± 1,18
Referans madde	125,60 ± 8,25	5,19 ± 0,34

HYE: Hayıt yaprak %70 etanol kuru ekstresi; HYS: Hayıt yaprak su kuru ekstresi; HÇE: Hayıt çiçek %70 etanol kuru ekstresi; HÇS: Hayıt çiçek su kuru ekstresi; HME: Hayıt meyve %70 etanol kuru ekstresi; HMS: Hayıt meyve su kuru ekstresi.

Sıçanların serum lipaz seviyeleri kıyaslandığında, orlistat uygulaması gerçekleştirilen grupta daha fazla belirgin olmakla beraber HYE, HYS ve HÇE kodlu test numunelerinde negatif kontrol grubuna karşı daha düşük oranda olduğu tespit edilmiştir ($p<0,01$). *In vitro* lipaz enzim inhibisyon çalışmalarında HYE, HYS ve HÇE kodlu test numuneleri ve referans madde olarak kullanılan orlistat grubunda lipaz enzim inhibitör etki gözlenirken, diğer gruplarda istatistiksel açıdan anlamlı bir etki gözlemlenmemiştir (Tablo 6.18).

Tablo 6.20: Serum lipaz ve lipaz enzimi üzerine belirlenen IC50 seviyeleri.

Gruplar	Serum lipaz düzeyi (U/L)	Lipaz enzim inhibisyonu (IC ₅₀ (µg/mL) ± SS)
Kontrol	13,06 ± 1,94	-
Negatif kontrol	41,20 ± 5,12	-
HYE	18,23 ± 1,34	56,22 ± 4,94
HYS	21,12 ± 2,08	68,95 ± 4,13
HÇE	23,06 ± 1,08	72,84 ± 6,47
HÇS	29,14 ± 0,83	92,08 ± 8,15
HME	31,26 ± 0,54	111,49 ± 7,82
HMS	37,09 ± 0,92	135,48 ± 8,09
Referans madde	8,21 ± 0,46	20,53 ± 0,98

HYE: Hayıt yaprak %70 etanol kuru ekstresi; HYS: Hayıt yaprak su kuru ekstresi; HÇE: Hayıt çiçek %70 etanol kuru ekstresi; HÇS: Hayıt çiçek su kuru ekstresi; HME: Hayıt meyve %70 etanol kuru ekstresi; HMS: Hayıt meyve su kuru ekstresi, *: $p<0,01$.

Tez kapsamında yürütülen *in-vivo* anti-obezite aktivite çalışma bulguları, HYE, HYS ve HÇE kodlu test numunelerinin yüksek yapılı diyetle beslenerek obezite oluşturulan

sıçanların vücut ağırlığında azalmaya neden olduğunu göstermiştir. Negatif kontrol grubu ile karşılaştırıldığında HYE, HYS ve HÇE kodlu test numunelerinin serum LDL, trigliserit ve leptin seviyelerinde düşüşe; HDL ve adinopektin düzeylerinde ise artışa neden olduğu belirlenmiştir. Bununla birlikte serum lipaz, TNF- α ve IL-1 β seviyelerinde HYE, HYS ve HÇE kodlu test numunelerinin düşüşe neden olduğu tespit edilmiştir. Elde edilen sonuçlar doğrultusunda HYE, HYS ve HÇE kodlu test numunelerinin obezite tedavisinde yararlı etkilere sahip olabileceği düşünülmektedir. Total fenolik ve flavonoit madde miktarları bulguları incelendiğinde obezite aktivitesi yüksek olan HYE, HYS ve HÇE kodlu ekstrelerinin fenolik ve flavonoidler bakımından oldukça zengin olduğu gözlemlenmiştir. Toplam fenol içerik miktarı en yüksek olan ekstre HÇE ($68,42 \pm 1,20$) iken toplam flavonoit içeriği bakımından en yüksek ekstre HYE ($31,99 \pm 1,17$) 'dir. LC-HRMS analizi sonuçları incelendiğinde ise, total fenolik ve flavonoit madde miktarları sonuçlarına paralel olarak obezite aktivitesi en yüksek olan HYE, HYS ve HÇE kodlu ekstrelerinin kemferol ve luteolin-7-glukozit bileşiklerini nispeten yüksek seviyelerde içerdiği gözlenmiştir. Luteolin-7-glukozit miktarı sırasıyla 1720,26 mg/ 100 g, 690,49 mg/ 100 g ve 653,04 mg/ 100 g olarak belirlenirken, kemferol miktarı ise sırasıyla 95,85 mg/ 100 g, 194,41 mg/100 g ve 62,63 mg/100 g olarak belirlenmiştir. Luteolin ve bitkilerdeki en yaygın türevi olan luteolin-7-glukozitin yüksek yağlı diyete maruz bırakılmış fareler üzerinde yapılan bir *in vivo* çalışmada, vücut ve epididimal yağ ağırlığını azaltmanın yanı sıra vasküler disfonksiyon gibi metabolik obeziteyle ilişkili komplikasyonları azaltarak anti-obezite aktivite gösterdiği ortaya konulmuştur [181]. Torres-Villarreal ve arkadaşları tarafından 2019 yılında gerçekleştirilmiş bir çalışmada, kemferolün Cebpa geninin üretimini inhibe ettiği ve bunun da Pnpla2 ve Lipe mRNA seviyelerini artırarak adipoz dokularda birikmekte olan yağ miktarını azalttığı bildirilmiştir. Bu süreç adipojenik farklılaşma sırasında 3T3-L1 hücrelerinde meydana gelmektedir, çalışmanın sonucunda kemferolün anti-obezite aktivitesi gösteriyor olabileceğine ulaşılmıştır [182]. Bir başka çalışmada ise, kemferolün gösterdiği prebiyotik ve anti-enflamatuar etkileri ile farelerde yüksek yağlı diyetle indüklenmiş obeziteye karşı koruyucu özelliği bulunduğu görülmüştür [183]. Tez kapsamında yürütülen çalışmada gözlemlenen potansiyel anti-obezite etkiler HYE, HYS ve HÇE kodlu ekstrelerinin içerdiği luteolin-7-glukozit ve kemferol bileşikleriyle ilişkilendirilebilir.

7. SONUÇ ve ÖNERİLER

Bu tez kapsamında, Türkiye’de yaygın şekilde yabani olarak yetişen meyveleri toplanarak satılan ve binlerce yıldır geleneksel tedavide ve günümüzde de ilaç şeklinde PMS, menstrual siklus düzensizlikleri ve mastodinide kullanılan *Vitex agnus-castus* L. bitkisinin ülkemiz biyoçeşitliliği göz önüne alınarak T.C. Tarım ve Orman Bakanlığı Ege Tarımsal Araştırma Enstitüsü ile birlikte yerli ve kastsin bileşiğince zengin bir *V. agnus-castus* kültür çeşidi geliştirilmesine katkı sağlanmıştır.

Balıkesir, Burhaniye’den toplanmış beyaz ve mor çiçekli *Vitex agnus-castus* bitkisi ile İstanbul, Zeytinburnu Tıbbi Bitkiler Bahçesi’nden toplanan kültüre alınmış mor çiçekli *V. agnus-castus* bitkisinin çiçek, yaprak ve meyve kısımları ayrılarak uçucu yağları elde edilmiştir. Uçucu yağların kimyasal bileşenleri GC-FD/MS cihazı ile analiz edilerek aydınlatılmış, ardından da kemotipleri belirlenmiştir. Balıkesir bölgesinden elde edilen uçucu yağlar; " α -pinen-1,8-sineol" kemotipi olarak tanımlanırken, İstanbul’dan elde edilen uçucu yağlar "sabinen-1,8-sineol" kemotipi olarak tanımlanmıştır. Elde edilen sonuçlar sayesinde hayıt çiçek, yaprak ve meyve uçucu yağlarını; toplam monoterpen hidrokarbon, monoterpen oksit ve seskiterpen hidrokarbon bileşikleri miktarlarına göre ayırt etmenin mümkün olduğu görülmüştür. Seskiterpen hidrokarbonların, hem yaprak hem de meyve uçucu yağlarındaki bileşiklerin %20'sinden azını oluştururken, çiçeklerden elde edilen uçucu yağlardaki bileşiklerin %20'sinden fazlasını oluşturmakta olduğu tespit edilmiştir. Yapraklardan elde edilen uçucu yağların her ikisi de (BMY, İMY), en bol bileşen olarak 1,8-sineol bileşiğini içermektedir, bu da onları meyve ve çiçek uçucu yağlarından ayırmaktadır. Antik çağlardan beri kadınların saflıklarının ve iffetlerinin sembolü olarak bilinen hayıt bitkisinin, geçmişten günümüze kadar gelen geniş bir tıbbi kullanım alanı mevcuttur. Etnobotanik çalışmalar, bitkinin özellikle de kadın hastalıkları ve solunum yolları rahatsızlıklarında kullanıldığını göstermektedir [1, 27-32]. Bu sebeple, tez kapsamında yürütülen *in-vitro* sitotoksitesite çalışmalarında insan meme

adenokarsinomu hücresi (MCF-7, HTB-22) ve insan alveolar adenokarsinom hücresi (A549, CCL-185) hatları tercih edilmiştir. Tez çalışması ile, hayıt meyve uçucu yağının MCF-7 hücre hattı üzerindeki sitotoksitesisi ilk kez çalışılmış olup, Balıkesir bölgesinden elde edilen meyve uçucu yağının IC₅₀ değeri 32,43 µg/mL iken, İstanbul bölgesinden edilen meyve uçucu yağının IC₅₀ değeri 58,11 µg/mL olarak hesaplanmıştır. Tez kapsamında yürütülen çalışma, mor ve beyaz *V. agnus-castus* çiçek uçucu yağlarının *in vitro* sitotoksitesilerinin değerlendirildiği ilk çalışma olma özelliği ile de dikkat çekmektedir. MCF-7 hücrelerinde, Balıkesir'den elde edilen mor çiçek uçucu yağı, beyaz çiçek uçucu yağından yaklaşık 10 kat daha potent olup, IC₅₀ değeri 4,68 µg/mL'dir. BMÇ uçucu yağı, bu değer ile MCF-7 hücre hattında hem Balıkesir hem de İstanbul bölgelerinden elde edilen uçucu yağlar arasındaki en sitotoksik uçucu yağ olma özelliğine sahiptir. Ancak, beyaz çiçek uçucu yağının A549 hücre hattında, Balıkesir bölgesindeki diğer uçucu yağların etki gücünden (IC₅₀ değer aralığı 39,39-48,62 µg/mL) büyük bir fark olmaksızın daha çok sitotoksik etki gösterdiği görülmüştür. Elde edilen sonuçlar, *V. agnus-castus* uçucu yağlarının MCF-7 ve A549 hatları üzerinde yüksek sitotoksite potansiyeline sahip olduğunu göstermekte olup, bitkilerin toplanma bölgeleri ile kullanılan kısımlarının önemini vurgular nitelikte olmuştur. Balıkesir bölgesinden elde edilen uçucu yağların -özellikle mor çiçek uçucu yağı (BMÇ) IC₅₀ değeri MCF-7 hücre hattında 4,68 µg/ mL- İstanbul'dan elde edilen uçucu yağlara göre daha potent olduğu görülmüştür. Bu durum; bu uçucu yağların α-pinen, karyofilen ve limonen içeriklerinin daha yüksek olması ile ilişkilendirilmiştir.

Yine tez kapsamında, standardize *V. agnus-castus* çiçek, yaprak ve meyve ekstralarının MCF-7 ile A549 hatları üzerindeki *in-vitro* sitotoksitesisi de değerlendirilmiştir. *V. agnus-castus* çiçek ekstresinin sitotoksitesisinin ilk kez araştırıldığı çalışmada; MCF-7 hücrelerinde (IC₅₀ 62,12 µg/mL değeri ile) iyi sitotoksite gösterirken, A549 hücrelerinde düşük sitotoksite gösterdiği (100 µg/mL'de ölüm oranı %26,7) tespit edilmiştir. *V. agnus-castus* meyve ekstresinin her iki hücre hattı için de yaprak ve çiçek ekstralarından daha sitotoksik olduğu görülmüştür. Tez kapsamında elde edilen sitotoksite sonuçları, antik çağlardan günümüze kadar gelen kadim bilgilerin kıymetini vurgular niteliktedir. *V. agnus-castus* bitkisinin farklı kısımlarından elde edilen uçucu yağ ve ekstraları, geçmişteki kullanımlarına paralel olarak MCF-7 ile A549 hatları üzerinde etkili bulunmuştur.

Tez çalışmasında; T.C. Tarım ve Orman Bakanlığı Ege Tarımsal Araştırma Enstitüsü ile ortaklaşa çalışılarak 95 farklı bölgeden toplanmış *V. agnus-castus* meyve droglarının PDA dedektörlü HPLC cihazı ile Türk Farmakopesi “Hayıt, Meyve” monografındaki yöntem kullanılarak kastisin içerikleri değerlendirilmiştir. 95 farklı örnek içerisinde 48 tanesi Avrupa Farmakopesi kriterine uygun olarak %0,08’den yüksek miktarda kastisin içermektedir. 2021 yılında toplanmış 57, 111, 70, 13-40, 49, 60, 65, 47, 28 ve 69 kodlu örneklerin kastisin bileşiği açısından en zengin örnekler olduğu tespit edilmiştir. Bu örneklerin kastisin miktarları sırasıyla $0,216 \pm 0,002$; $0,202 \pm 0,002$; $0,191 \pm 0,003$; $0,183 \pm 0,002$; $0,180 \pm 0,002$; $0,180 \pm 0,001$; $0,179 \pm 0,004$; $0,171 \pm 0,002$; $0,159 \pm 0,001$; $0,155 \pm 0,002$ ’dir. En yüksek miktarda kastisin bileşiği içeren bu ilk 10 adet *V. agnus-castus* meyve drogu, 2022 yılında tekrar toplanarak aynı şekilde analiz edilmiş, ve sonuçların paralel olduğu gözlemlenmiştir. Bu örneklerin total fenolik ve flavonoit miktarları da analiz edilerek, bu bileşiklerce zengin oldukları görülmüştür. 2015 yılında yürütülmüş bir araştırmada dünyadaki farklı lokasyonlardan toplanmış *V. agnus-castus* meyve örnekleri kastisin bakımından değerlendirilmiştir. Sonuçlar meyve örneklerinin kastisin içeriklerinin Krishnagiri (Hindistan) 0,03; Mettur (Hindistan) 0,11; Kaliforniya (Amerika) 0,09; Florida (Amerika) 0,16; Viyana (Avusturya) 0,13 ve Torino (İtalya) 0,09 olduğunu göstermiştir [184]. Bir başka çalışmada ise Arnavutluk’tan toplanmış *V. agnus-castus* meyve örneklerinden %80 etanol ile hazırlanmış ekstraların %0,13-0,15 aralığında kastisin içerdiği saptanmıştır [185]. Hoberg ve arkadaşları tarafından 1999 yılında yürütülmüş çalışmada ise, *V. agnus-castus* meyvelerinden %60 etanol kullanılarak hazırlanmış ekstraların kastisin içerikleri %0,025-0,207 aralığında olduğu anlaşılmıştır. Çalışmada kullanılan meyvelerin temin kaynakları net olarak belli değildir [186]. Ülkemizdeki *V. agnus-castus* meyvelerinin içerdiği kastisin miktarı diğer ülkelerle kıyaslandığında çok daha yüksektir. Hatta yalnızca meyvelerin içerdiği kastisin miktarı, ekstralardan bile yüksek olarak saptanmıştır. Bu sonuçlar doğrultusunda ülkemizin sahip olduğu potansiyel değerlendirilecek; T.C. Tarım ve Orman Bakanlığı Ege Tarımsal Araştırma Enstitüsü ortaklığında yerli ve kastisin bileşiğince zengin bir *V. agnus-castus* kültür çeşidi geliştirilecektir. Ülkemizde yetişen *V. agnus-castus* meyveleri kastisin içeriği değerlendirildiğinde diğer ülkelere göre daha yüksek olmasının avantajları kullanılarak hem ham madde hem de ürün eldesinde kullanılması ülkemiz ekonomisine katma değer sağlayacaktır.

Tez kapsamında elde edilen standardize hayıt ekstrelerinin; yüksek yağlı diyetle indüklenmiş obeziteye sahip erkek Wistar albino sıçanlarında bazı hormonların (leptin, insülin, T3 ve T4), lipidlerin (trigliserit, HDL ve LDL) ve lipaz enziminin plazma seviyeleri üzerindeki *in vivo* etkisi incelenmiştir. 7 haftalık çalışmanın sonucunda, HYE, HYS ve HÇE ekstrelerinin obezite oluşturulmuş sıçanların vücut ağırlığında azalmaya neden olduğu anlaşılmıştır. Negatif kontrol grubu ile karşılaştırıldığında HYE, HYS ve HÇE kodlu test numunelerinin serum LDL, trigliserit, leptin, lipaz, TNF- α ve IL-1 β seviyelerinde düşüşe; HDL ve adinopektin düzeylerinde ise artışa neden olduğu tespit edilmiştir. Elde edilen sonuçlar doğrultusunda, *V. agnus-castus* yaprak ve çiçeklerinin luteolin-7-glukozid ve kemferol içerikleri nedeniyle obezite üzerinde yararlı etkilere sahip olabileceği düşünülmektedir. Mevcut çalışmanın bulguları ışığında obezite tedavisinde yararlı etkileri olabileceği düşünülen *V. agnus-castus* yaprak ve çiçeklerinin klinik uygulamalarının, kontrollü klinik çalışmalarla değerlendirilmesi gerekmektedir. Her ne kadar hayıt meyveleri çay şeklinde kadın hastalıklarında geleneksel olarak kullanılsa da tez çalışmasında gerçekleştirilen *in-vivo* çalışma göz önüne alındığında kadınlarda obezite için bir öneri olarak hayıt yapraklarının günde 3 kez tek başına veya kombine çay karışımlarında (her seferinde yaklaşık 2 g *V. agnus-castus* yapraklarından hazırlanmış çayın) demlenerek içilmesi önerilebilir. Bu şekilde zayıflama çaylarının bileşiminde yer alabilir, bu öneri yaptığımız *in-vivo* çalışmamıza dayalı olarak yapılmaktadır. Literatürde bulunan çalışmalarda, *V. agnus-castus* yapraklarının herhangi bir toksik etkisine rastlanmamıştır dolayısıyla güvenle kullanılabilir [187, 188].

V. agnus-castus meyvesinden elde edilen ekstreler, sıvı veya katı dozaj formları şeklinde ilaç ve gıda takviyesi ürünleri olarak başta Almanya ve Avusturya olmak üzere tüm dünyada kadın hastalıklarında yaygın şekilde kullanılmaktadır. Ülkemizde hayıt bitkisinin Agnucaston® haricinde, bir takım gıda takviyesi ürünleri bulunmaktadır. Ancak bu gıda takviyesi ürünlerinin standardizasyonu yapılmamaktadır. Tüm dünyada yaygın olarak yetişmekte olan *V. agnus-castus* bitkisi yalnızca kadın hastalıkları ile kalmayıp daha pek çok biyolojik aktivite de göstermektedir. *V. agnus-castus* ülkemizde doğal olarak yetişmekte olup yerel halk tarafından bitkinin adına ithafen Karahayıt, Karacahayıt, Hayıtlı isimleriyle anılmakta olan yerleşim yerleri bulunmaktadır [1]. Tez çalışması ile bitkinin çiçek ve yapraklarının MCF-7 ve A-549 hücre hatları üzerinde sitotoksikite ve anti-obezite

aktivite gösterdiği anlaşılmıştır. Bu durum, *V. agnus-castus*'un yalnızca meyvesinin değil diğer kısımlarının da kullanılabilceğini kanıtlar niteliktedir. Bu alanda yapılacak daha çok sayıda çalışmaya ihtiyaç duyulmaktadır. Ülkemizde pek çok bölgede yaygın olarak bulunmasına karşın *V. agnus-castus* bitkisinin sahip olduğu potansiyel değerlendirilememektedir. Türkiye'de kaliteli, kastisin kriterine uygun, fenolik ve flavanoit bileşiklerce zengin *V. agnus-castus* bahçelerinin oluşturulması ve buralardan elde edilen ekstraların değerlendirilmesi gerekmektedir. Ülkemiz ancak bu şekilde hayıt ham madde üretiminde söz sahibi olabilir. Bunun yanı sıra, yerli ham maddelerden gıda takviyesi ve ilaç formunda yeni ve yaratıcı ürünlerin geliştirilerek dünya pazarında yer alınması ve ülke ekonomisine katkıda bulunulması gerekmektedir. Bu tez kapsamında, yürütülen çalışmaların bu alanda yapılacak yeni araştırmalara ve hayıt ürünleri ile ilgilenen kurum ve kuruluşlara destek olacağı düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

- [1] **Yılmaz Kolancı, B.** (2017). Karahayıt'ta (Denizli) Hayıt Ağacının (*Vitex agnus castus* L.) Geleneksel Kullanımı. *Phaselis Disiplin Akdeniz Araşt Derg*, 3, 49-60.
- [2] **Souto, E. B., Durazzo, A., Nazhand, A., Lucarini, M., Zaccardelli, M., Souto, S. B., ve ark.** (2020). *Vitex agnus-castus* L.: main features and nutraceutical perspectives. *Forests*, 11(7), 761.
- [3] EMA/HMPC. **Assessment report on *Vitex agnus-castus* L., fructus.** (2018). 23/09/2024, https://www.fitoterapia.net/archivos/201810/final-assessment-report-vitex-agnus-castus-l-fructus-revision-1_en.pdf?1
- [4] **Heskes, A. M., Sundram, T. C., Boughton, B. A., Jensen, N. B., Hansen, N. L., Crocoll, C., ve ark.** (2018). Biosynthesis of bioactive diterpenoids in the medicinal plant *Vitex agnus-castus*. *The Plant Journal*, 93(5), 943-958.
- [5] **Bello, M. O., Zaki, A. A., Aloko, S., Fasinu, P. S., Bello, E. O., Ajao, U. L., ve ark.** (2018). The genus *Vitex*: An overview of iridoids as chemotaxonomic marker. *Beni-Suef University journal of basic and applied sciences*, 7(4), 414-419.
- [6] **Gulsoy Toplan, G., Kurkcuoğlu, M., Husnu Can Baser, K. ve Sariyar, G.** (2015). Composition of the essential oils from samples of *Vitex agnus-castus* L. growing in Turkey. *Journal of Essential Oil Research*, 27(4), 337-342.
- [7] **Rani, A. ve Sharma, A.** (2013). The genus *Vitex*: A review. *Pharmacognosy reviews*, 7(14), 188.
- [8] Doğan, H. ***Vitex agnus-castus* (Hayıt).** (2024). 28/09/2024, <https://kocaelibitkileri.com/vitex-agnus-castus/>
- [9] **Selvi, S., Polat, R., Çakilioğlu, U., Celep, F., Dirmenci, T. ve Ertuğ, Z. F.** (2022). An ethnobotanical review on medicinal plants of the Lamiaceae family in Turkey. *Turkish Journal of Botany*, 46(4), 283-332.
- [10] WFO. **Lamiaceae Martinov.** (2024). 28/09/2024, <https://www.worldfloraonline.org/taxon/wfo-7000000318>
- [11] **Zhao, F., Chen, Y.-P., Salmaki, Y., Drew, B. T., Wilson, T. C., Scheen, A.-C., ve ark.** (2021). An updated tribal classification of Lamiaceae based on plastome phylogenomics. *BMC biology*, 19, 1-27.
- [12] **Marx, H. E., O'Leary, N., Yuan, Y. W., Lu-Irving, P., Tank, D. C., Múlgura, M. E., ve ark.** (2010). A molecular phylogeny and classification of Verbenaceae. *American journal of Botany*, 97(10), 1647-1663.
- [13] WFO. ***Vitex* L.** (2024). 29/09/2024, <https://www.worldfloraonline.org/taxon/wfo-4000040364;jsessionid=E14F811A5210A8FF3BA8ECC4F20078AE>
- [14] **Kamal, N., Mio Asni, N. S., Rozlan, I. N. A., Mohd Azmi, M. A. H., Mazlan, N. W., Mediani, A., ve ark.** (2022). Traditional medicinal uses, phytochemistry, biological properties, and health applications of *Vitex* sp. *Plants*, 11(15), 1944.

- [15] Bizimbitkiler. *Vitex agnus castus*. (2012). 29/09/2024, <https://bizimbitkiler.org.tr/yeni/demos/technical/>
- [16] Adamov, G. V., Rendyuk, T. D., Saybel, O. L., Dargaeva, T. D., Tsitsilin, A. N. ve Bokov, D. O. (2022). *Vitex agnus-castus*: Botanical features and area, chemical composition of fruit, pharmacological properties, and medicinal uses. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 12(3), 034-044.
- [17] Kew Royal Botanic Gardens Plants of the World Online. *Vitex agnus-castus* L. (2024). 29/09/2420, 2024, <https://powo.science.kew.org/taxon/urn:lsid:ipni.org:names:865568-1>
- [18] North Carolina Extension Gardener Plant Toolbox. *Vitex agnus-castus*. (2024). <https://plants.ces.ncsu.edu/plants/vitex-agnus-castus/>
- [19] Fakir, H., Erbaş, S., Özen, M. ve Dönmez, İ. E. (2014). Hayıt (*Vitex agnus-castus* L.)’da farklı toplama zamanlarının uçucu yağ oranı ve bileşenleri üzerine etkisi. *Avrupa Bilim ve Teknoloji Dergisi*, 1(2), 25-28.
- [20] WFO. *Vitex agnus castus* L. (2024). 29/09/2024, <https://www.worldfloraonline.org/taxon/wfo-0000332916#distributionMap>
- [21] Kolancı, B. Y. (2017). Antik Dönem’den Günümüze Hayıt Ağacı’nın (*Vitex agnus-castus* L./Lamiaceae) Kullanımı. İçinde G. Coşkun (Editör). *Dumlupınar Üniversitesi V Arkeoloji Sempozyumu*, (s. 271-287). Kütahya: Bilgin Kültür Sanat Yayıncılık.
- [22] Güner, A., Kandemir, A., Menemen, Y., Yıldırım, H., Aslan, S., Ekşi, G., ve ark. (2014). *Resimli Türkiye Florası*. Alinihat Gökyiğit Vakfı.
- [23] Pedley, J. (2005). *Sanctuaries and the sacred in the ancient Greek world*. Cambridge University Press.
- [24] Bilgin, M. *Dioscorides ve De Materia Medica*. (2024). 29/09/2024, <https://www.zdergisi.istanbul/makale/dioscorides-ve-de-materia-medica-21>
- [25] Nasri, S., Oryan, S., Rohani, A. H. ve Amin, G. R. (2007). The effects of *Vitex agnus castus* extract and its interaction with dopaminergic system on LH and testosterone in male mice. *Pakistan Journal of Biological Sciences: PJBS*, 10(14), 2300-2307.
- [26] Saberi, M., Rezvanizadeh, A. ve Bakhtiarian, A. (2008). The antiepileptic activity of *Vitex agnus castus* extract on amygdala kindled seizures in male rats. *Neuroscience letters*, 441(2), 193-196.
- [27] Baytop, T. (1999). *Türkiye’de bitkiler ile tedavi: geçmişte ve bugün*. Nobel Tıp Kitabevleri.
- [28] Sargın, S. A., Akçicek, E. ve Selvi, S. (2013). An ethnobotanical study of medicinal plants used by the local people of Alaşehir (Manisa) in Turkey. *Journal of ethnopharmacology*, 150(3), 860-874.
- [29] Sargın, S. A. (2015). Ethnobotanical survey of medicinal plants in Bozyazı district of Mersin, Turkey. *Journal of Ethnopharmacology*, 173, 105-126.
- [30] Akbulut, S. ve Yılmaz, D. (2022). Ethnobotanical knowledge on the plants used by people on the Datça Peninsula (Muğla, Turkey). *Applied Ecology and Environmental Research*, 20(2).
- [31] Ugulu, I., Baslar, S., Yorek, N. ve Dogan, Y. (2009). The investigation and quantitative ethnobotanical evaluation of medicinal plants used around Izmir province, Turkey. *Journal of Medicinal plants research*, 3(5), 345-367.
- [32] Gürdal, B. ve Kültür, Ş. (2013). An ethnobotanical study of medicinal plants in Marmaris (Muğla, Turkey). *Journal of ethnopharmacology*, 146(1), 113-126.
- [33] Zhelev, I., Petkova, Z., Kostova, I., Damyanova, S., Stoyanova, A., Dimitrova-Dyulgerova, I., ve ark. (2022). Chemical composition and

- antimicrobial activity of essential oil of fruits from *Vitex agnus-castus* L., growing in two regions in Bulgaria. *Plants*, 11(7), 896.
- [34] **Chen, S.-N., Friesen, J. B., Webster, D., Nikolic, D., van Breemen, R. B., Wang, Z. J., ve ark.** (2011). Phytoconstituents from *Vitex agnus-castus* fruits. *Fitoterapia*, 82(4), 528-533.
- [35] **Berrani, A., Marmouzi, I., Bouyahya, A., Kharbach, M., El Hamdani, M., El Jemli, M., ve ark.** (2021). Phenolic compound analysis and pharmacological screening of *Vitex agnus-castus* functional parts. *BioMed Research International*, 2021(1), 6695311.
- [36] MedChemExpress. **Casticin.** (2024). 01/10/2024, <https://www.medchemexpress.com/Casticin.html>
- [37] MedChemExpress. **Penduletin.** (2024). 01/10/2024, <https://www.medchemexpress.com/penduletin.html>
- [38] MedChemExpress. **Orientin.** (2024). 01/10/2024, <https://www.medchemexpress.com/orientin.html>
- [39] MedChemExpress. **Vitexin.** (2024). 01/10/2024, <https://www.medchemexpress.com/vitexin.html>
- [40] MedChemExpress. **Kaempferol.** (2024). 01/10/2024, <https://www.medchemexpress.com/Kaempferol.html>
- [41] MedChemExpress. **Luteolin.** (2024). 01/10/2024, <https://www.medchemexpress.com/Luteolin.html>
- [42] Extrasynthese. **Luteolin-7-O-glucoside.** (2024). 01/10/2024, <https://www.extrasynthese.com/flavone/645-luteolin-7-o-glucoside.html>
- [43] Extrasynthese. **Apigenin.** (2024). 01/10/2024, <https://www.extrasynthese.com/flavone/58-apigenin.html>
- [44] MedChemExpress. **Ferulic acid.** (2024). 01/10/2024, https://www.medchemexpress.com/Ferulic_acid.html
- [45] MedChemExpress. **p-Coumaric acid.** (2024). 01/10/2024, https://www.medchemexpress.com/p-Coumaric_acid.html
- [46] MedChemExpress. **Chlorogenic acid.** (2024). 01/10/2024, <https://www.medchemexpress.com/Chlorogenic-acid.html>
- [47] MedChemExpress. **Agnuside.** (2024). 01/10/2024, <https://www.medchemexpress.com/agnuside.html>
- [48] MedChemExpress. **Aucubin.** (2024). 01/10/2024, <https://www.medchemexpress.com/Aucubin.html>
- [49] **Kuruüzüm-Uz, A., Ströch, K., Demirezer, L. Ö. ve Zeeck, A.** (2003). Glucosides from *Vitex agnus-castus*. *Phytochemistry*, 63(8), 959-964.
- [50] **Ono, M., Yamasaki, T., Konoshita, M., Ikeda, T., Okawa, M., Kinjo, J., ve ark.** (2008). Five New Diterpenoids, viteagnusins A—E, from the fruit of *Vitex agnus-castus*. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 56(11), 1621-1624.
- [51] **Yao, J.-L., Fang, S.-M., Liu, R., Oppong, M. B., Liu, E.-W., Fan, G.-W., ve ark.** (2016). A review on the terpenes from genus *Vitex*. *Molecules*, 21(9), 1179.
- [52] Christoffel, V., Spengler, B., Jarry, H. ve Wuttke, W., Year editör^editörler. Prolactin inhibiting dopaminergic activity of diterpenes from *Vitex agnus castus*. *Phytopharmaka V: Forschung und klinische Anwendung; 1999: Springer; Published.*
- [53] MedChemExpress. **Rotundifuran.** (2024). 01/10/2024, <https://www.medchemexpress.com/rotundifuran.html>
- [54] MedChemExpress. **Vitexilactone.** (2024). 01/10/2024, <https://www.medchemexpress.com/vitexilactone.html>

- [55] **Senatore, F., Napolitano, F. ve Dung, M. O.** (2003). Chemical composition and antibacterial activity of essential oil from fruits of *Vitex agnus-castus* L. (Verbenaceae) growing in Turkey. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 6(3), 185-190.
- [56] **Bakr, R. O., Zaghoul, S. S., Hassan, R. A., Sonousi, A., Wasfi, R. ve Fayed, M. A.** (2020). Antimicrobial activity of *Vitex agnus-castus* essential oil and molecular docking study of its major constituents. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 23(1), 184-193.
- [57] **Neves, R. C. ve Camara, C. A. D.** (2016). Chemical composition and acaricidal activity of the essential oils from *Vitex agnus-castus* L. (Verbenaceae) and selected monoterpenes. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 88(03), 1221-1233.
- [58] **Habbab, A., Sekkoum, K., Belboukhari, N., Cheriti, A. ve Y Aboul-Enein, H.** (2016). Essential oil chemical composition of *Vitex agnus-castus* L. from Southern-West Algeria and its antimicrobial activity. *Current Bioactive Compounds*, 12(1), 51-60.
- [59] **Novak, J., Draxler, L., Göhler, I. ve Franz, C. M.** (2005). Essential oil composition of *Vitex agnus-castus*—comparison of accessions and different plant organs. *Flavour and fragrance journal*, 20(2), 186-192.
- [60] MedChemExpress. **(-)- α -Pinene** (2024). 02/10/2024, <https://www.medchemexpress.com/alpha-pinene.html>
- [61] Extrasynthese. **Eucalyptol** (2024). 02/10/2024, <https://www.extrasynthese.com/monoterpene/361-eucalyptol.html>
- [62] Cymitquimica. **(Z)- β -Farnesene.** (2024). 02/10/2024, <https://cymitquimica.com/products/TR-F102410/28973-97-9/z-farnesene/>
- [63] Cymitquimica. **Bicyclogermacrene.** (2024). 02/10/2024, <https://cymitquimica.com/products/4Z-G-164002/bicyclogermacrene/>
- [64] MedChemExpress. **Sabinene.** (2024). 02/10/2024, <https://www.medchemexpress.com/Sabinene.html>
- [65] MedChemExpress. **α -Terpinyl acetate.** (2024). 02/10/2024, <https://www.medchemexpress.com/%CE%B1-terpinyl-acetate.html>
- [66] MedChemExpress. **β -Caryophyllene.** (2024). 02/10/2024, https://www.medchemexpress.com/_beta_-Caryophyllene.html
- [67] MedChemExpress. **Limonene.** (2024). 02/10/2024, https://www.medchemexpress.com/_S_-__-_Limonene.html
- [68] Cymitquimica. **β -selinene.** (2024). 02/10/2024, <https://cymitquimica.com/cas/17066-67-0/?items=100>
- [69] MedChemExpress. **α -Terpineol.** (2024). 02/10/2024, <https://www.medchemexpress.com/alpha-terpineol.html>
- [70] MedChemExpress. **β -Phellandrene** (2024). 02/10/2024, <https://www.medchemexpress.com/%CE%B2-phellandrene.html>
- [71] **Ozkaya, A., Ciftci, H., Yilmaz, O., Zafer Tel, A., Cil, E. ve Cevrimli, B. S.** (2013). Vitamin, trace element, and fatty acid levels of *Vitex agnus-castus* L., *Juniperus oxycedrus* L., and *Papaver somniferum* L. plant seeds. *Journal of Chemistry*, 2013(1), 845743.
- [72] **Asdadi, A., Idrissi Hassani, L., Chebli, B., Moutaj, R., Gharby, S., Harhar, H., ve ark.** (2014). Chemical composition and antifungal activity of *Vitex agnus-castus* L. seeds oil growing in Morocco. *J Mater Environ Sci*, 5(3), 823-830.
- [73] MedChemExpress. **Oleic acid.** (2024). 02/10/2024, https://www.medchemexpress.com/Oleic_acid.html

- [74] MedChemExpress. **Palmitic acid**. (2024). 02/10/2024, https://www.medchemexpress.com/Palmitic_acid.html
- [75] Wikipedia. **Stearic acid**. (2024). https://en.wikipedia.org/wiki/Stearic_acid
- [76] MedChemExpress. **β -sitosterol** (2024). 02/10/2024, <https://www.medchemexpress.com/beta-sitosterol-purity-98.html>
- [77] MedChemExpress. **Stigmasterol**. (2024). 02/10/2024, <https://www.medchemexpress.com/Stigmasterol.html>
- [78] MedChemExpress. **Campesterol**. (2024). 02/10/2024, <https://www.medchemexpress.com/Campesterol.html>
- [79] **Gülsoy, G.** (2011) *Vitex agnus-castus (Hayıt) Meyvelerinin Fitoterapi Açısından Değerlendirilmesi*: İstanbul Üniversitesi.
- [80] Fullscript. **Vitex agnus-castus Reference Sheet** (2024). 02/10/2024, <https://fullscript.com/wp-content/uploads/2017/08/Vitex-agnus-castus-Med-Ed-Reference-Sheet.pdf>
- [81] Bionorica. **Agnucaston®**. (2024). 02/10/2024, <https://www.bionorica.com.tr/urunler/kadin-sagligi/agnucaston.html>
- [82] Shop apotheke. **Castufemin Kapseln**. (2024). 04/10/2024, <https://www.shop-apotheke.com/arzneimittel/1324466/castufemin-kapseln.htm>
- [83] Zeller. **Prefemin®** (2024). 02/10/2024, <https://zellerag.ch/en/products/otc/prefemin/>
- [84] Abilis. **Oprane**. (2024). 04/10/2024, <https://fr.abilis.ch/p/oprane-comprimes-pellicules-20-mg-90-pieces-000-000000-14314869>
- [85] Pharmacie de Steinfurt. **Cefanorm**. (2024). <https://www.pharmaciedesteinfurt.com/fr/cefanorm-100-caps.html>
- [86] Arzneimittel-datenbank.de. **Agno Sabona**. (2024). 04/10/2024, <https://www.arzneimittel-datenbank.de/produkt/agno-sabona-100-st-00287906>
- [87] Schaper-bruemmer. **Femicur® N Capsules**. (2024). 04/10/2024, https://www.schaper-bruemmer.com/fileadmin/docs/leaflets/Information_Femicur_N_Kapseln.pdf
- [88] Apotheke, S. **Feminon A**. (2024). 04/10/2024, <https://www.sonnen-apotheke-herdecke.de/produkt/00453842/feminon-a>
- [89] Agencia española de medicamentos y productos sanitarios. **Dismegyn**. (2024). 04/10/2024, https://cima.aemps.es/cima/dohtml/p/65744/Prospecto_65744.html
- [90] Comenzi.farmaciatei. **Femiplante**. (2024). 04/10/2024, <https://comenzi.farmaciatei.ro/medicamente-otc/aparatul-genital-feminin/tratamente/femiplante-30-capsule-schaper-brummer-p321445>
- [91] Gall Pharma. **Agnumens® Drops**. (2024). 02/10/2024, <https://www.gall-shop.com/en/proprietary-products/plant-based-products/agnumens-drops-5474949>
- [92] My Dr. XM. **Agnofem drops 50ml**. (2024). 02/10/2024, <https://mydrxm.com/products/agnofem-drops-50ml?srsltid=AfmBOop75rQl0OdRPUB5PTkuDuwIqJOfas8A7hrGGqXpXf4XrFYmjAg>
- [93] Soeckinger apotheke. **Gynocastus Loesung**. (2024). <https://www.soeckinger-apotheke.de/produkt/04591363/gynocastus-loesung>
- [94] **Sağlam, H., Pabuçcuoğlu, A. ve Kivçak, B.** (2007). Antioxidant activity of *Vitex agnus-castus* L. extracts. *Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives*, 21(11), 1059-1060.

- [95] **Sahib, H. B., Al-Zubaidy, A. A., Hussein, S. M., Dahham, S. S., Al-Suede, F. S. ve Shah, A. M.** (2015). The Anti-proliferative Activity of *Vitex agnus-castus* Leaves Methanol Extract against Breast and Prostate Cancer Cell Line. *Am J Phyto Clin Ther*, 3, 2321-2748.
- [96] **Ilhan, S.** (2020). Essential oils from *Vitex agnus castus* L. leaves induces caspase-dependent apoptosis of human multidrug-resistant lung carcinoma cells through intrinsic and extrinsic pathways. *Nutrition and cancer*, 73(4), 694-702.
- [97] **Sarikurkcu, C., Arisoy, K., Tepe, B., Cakir, A., Abali, G. ve Mete, E.** (2009). Studies on the antioxidant activity of essential oil and different solvent extracts of *Vitex agnus castus* L. fruits from Turkey. *Food and chemical toxicology*, 47(10), 2479-2483.
- [98] **Ahmad, B., Hafeez, N., Ara, G., Azam, S., Bashir, S. ve Khan, I.** (2016). Antibacterial activity of crude methanolic extract and various fractions of *Vitex agnus castus* and *Myrsine africana* against clinical isolates of Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus*. *Pakistan journal of pharmaceutical sciences*, 29(6).
- [99] **Eryigit, T., Çig, A., Okut, N., Yildirim, B. ve Ekici, K.** (2015). Evaluation of chemical composition and antimicrobial activity of *Vitex agnus castus* L. fruits' essential oils from West Anatolia, Turkey. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 18(1), 208-214.
- [100] **Ulukanli, Z., Çenet, M., Öztürk, B., Bozok, F., Karabörklü, S. ve Demirci, S. C.** (2015). Chemical characterization, phytotoxic, antimicrobial and insecticidal activities of *Vitex agnus-castus*' essential oil from East Mediterranean region. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 18(6), 1500-1507.
- [101] **Choudhary, M. I., Azizuddin, Jalil, S., Nawaz, S. A., Khan, K. M. ve Tareen, R. B.** (2009). Antiinflammatory and lipoxygenase inhibitory compounds from *Vitex agnus-castus*. *Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives*, 23(9), 1336-1339.
- [102] **Röhrli, J., Werz, O., Ammendola, A. ve Künstle, G.** (2017). *Vitex agnus-castus* dry extract BNO 1095 (Agnucaston®) inhibits uterine hyper-contractions and inflammation in experimental models for primary dysmenorrhea. *Clinical Phytoscience*, 2, 1-12.
- [103] **Chhabra, G. ve Kulkarni, K.** (2014). Evaluation of anti-inflammatory activity of *Vitex agnus castus* leaves. Quantitative analysis of flavonoids as possible active constituents. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 3(1), 183-189.
- [104] **Alimohamadi, R., Fatemi, I., Naderi, S., Hakimizadeh, E., Rahmani, M.-R. ve Allahtavakoli, M.** (2019). Protective effects of *Vitex agnus-castus* in ovariectomy mice following permanent middle cerebral artery occlusion. *Iranian Journal of Basic Medical Sciences*, 22(9), 1097.
- [105] **Abu-Raghif, A. R., Sahib, H. B. ve Abbas, S. N.** (2015). Anti-hyperlipidemic effect of *Vitex agnus castus* Extracts in Mice. *Int J Pharm Sci Rev Res*, 35, 120-125.
- [106] **Hamza, A. H., AlBishri, W. M. ve Alfaris, M. H.** (2019). Effect of *Vitex agnus-castus* plant extract on polycystic ovary syndrome complications in experimental rat model. *Asian Pacific Journal of Reproduction*, 8(2), 63-69.
- [107] **Moreno, F. N., Campos-Shimada, L. B., Costa, S. C. d., Garcia, R. F., Cecchini, A. L., Natali, M. R. M., ve ark.** (2015). *Vitex agnus-castus*

- L.(Verbenaceae) improves the liver lipid metabolism and redox state of ovariectomized rats. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2015(1), 212378.
- [108] Pires, V. A., Cardozo-Junior, E. L., Ortmann, C. F., Maraschin, J. C., Favreto, W. A. J., Donaduzzi, C. M., ve ark. (2018). Lipid-lowering and antiatherogenic effects of *Vitex megapotamica* (Spreng.) Moldenke in a mice experimental model. *Journal of ethnopharmacology*, 215, 14-20.
- [109] Faruqui, A. A. Non Hormonal Management of Menstrual Cylce Irregularities. *Journal of Gynecology and Womens Health Department of Pharmacology, Clinical Pharmacologist, A*, 504.
- [110] Walker, A. (2008). *The menstrual cycle*. Routledge.
- [111] Jarry, H., Spengler, B., Porzel, A., Schmidt, J., Wuttke, W. ve Christoffel, V. (2003). Evidence for estrogen receptor β -selective activity of *Vitex agnus-castus* and isolated flavones. *Planta medica*, 69(10), 945-947.
- [112] Jarry, H., Spengler, B., Wuttke, W. ve Christoffel, V. (2006). *In vitro* assays for bioactivity-guided isolation of endocrine active compounds in *Vitex agnus-castus*. *Maturitas*, 55, S26-S36.
- [113] Ye, Q., Zhang, Q.-y., Zheng, C.-j., Wang, Y. ve Qin, L.-p. (2010). Casticin, a flavonoid isolated from *Vitex rotundifolia*, inhibits prolactin release *in vivo* and *in vitro*. *Acta Pharmacologica Sinica*, 31(12), 1564-1568.
- [114] Hu, Y., Xin, H.-L., Zhang, Q.-Y., Zheng, H.-C., Rahman, K. ve Qin, L.-P. (2007). Anti-nociceptive and anti-hyperprolactinemia activities of Fructus Viticis and its effective fractions and chemical constituents. *Phytomedicine*, 14(10), 668-674.
- [115] Webster, D. E., He, Y., Chen, S.-N., Pauli, G. F., Farnsworth, N. R. ve Wang, Z. J. (2011). Opioidergic mechanisms underlying the actions of *Vitex agnus-castus* L. *Biochemical pharmacology*, 81(1), 170-177.
- [116] Altınterim, B. Hayıt Meyvesi *Vitex Agnus Castus* ve Prolaktin. *Jinekoloji-Obstetrik ve Neonatoloji Tıp Dergisi*, 9(34), 1421-1424.
- [117] Mendes, C., Fonseca, A. M. d., Alves, M. S., Bayer, L. H. C. M., Veiga, E. C. d. A., Sorpreso, I. C. E., ve ark. (2022). Narrative review of *Vitex agnus-castus* in symptoms in Gynecology. *Revista da Associação Médica Brasileira*, 68, 716-719.
- [118] Gudipally, P. R. ve Sharma, G. K. (2020). Premenstrual syndrome.
- [119] Momoeda, M., Sasaki, H., Tagashira, E., Ogishima, M., Takano, Y. ve Ochiai, K. (2014). Efficacy and safety of *Vitex agnus-castus* extract for treatment of premenstrual syndrome in Japanese patients: a prospective, open-label study. *Advances in therapy*, 31, 362-373.
- [120] Prilepskaya, V., Ledina, A., Tagiyeva, A. ve Revazova, F. (2006). *Vitex agnus castus*: Successful treatment of moderate to severe premenstrual syndrome. *Maturitas*, 55, S55-S63.
- [121] Aksoy, A. N., Gözükar, I. ve Kabil Kucur, S. (2014). Evaluation of the efficacy of Fructus agni casti in women with severe primary dysmenorrhea: A prospective comparative Doppler study. *Journal of Obstetrics and Gynaecology Research*, 40(3), 779-784.
- [122] Eltbogen, R., Litschgi, M., Gasser, U., Nebel, S. ve Zahner, C. (2014). *Vitex agnus-castus* extract (Ze 440) improves symptoms in women with menstrual cycle irregularities. *Planta Medica*, 80(16), SL19.
- [123] Grullon, S. ve Bechmann, S. (2023). Mastodynia. *StatPearls [Internet]*: StatPearls Publishing.

- [124] **Kilicdag, E., Tarim, E., Bagis, T., Erkanli, S., Aslan, E., Ozsahin, K., ve ark.** (2004). Fructus agni casti and bromocriptine for treatment of hyperprolactinemia and mastalgia. *International Journal of Gynecology & Obstetrics*, 85(3), 292-293.
- [125] **Dinç, T. ve Coşkun, F.** (2014). Comparison of fructus agni casti and flurbiprofen in the treatment of cyclic mastalgia in premenopausal women. *Turkish Journal of Surgery/Ulusal cerrahi dergisi*, 30(1), 34.
- [126] **Höller, M., Steindl, H., Abramov-Sommariva, D., Kleemann, J., Loleit, A., Abels, C., ve ark.** (2024). Use of *Vitex agnus-castus* in patients with menstrual cycle disorders: a single-center retrospective longitudinal cohort study. *Archives of gynecology and obstetrics*, 309(5), 2089-2098.
- [127] **Santoro, N., Epperson, C. N. ve Mathews, S. B.** (2015). Menopausal symptoms and their management. *Endocrinology and Metabolism Clinics*, 44(3), 497-515.
- [128] **Naseri, R., Farnia, V., Yazdchi, K., Alikhani, M., Basanj, B. ve Salemi, S.** (2019). Comparison of *Vitex agnus-castus* extracts with placebo in reducing menopausal symptoms: a randomized double-blind study. *Korean journal of family medicine*, 40(6), 362.
- [129] **Abbaspoor, Z., Hajikhani, N. A. ve Afshari, P.** (2011). Effect of *Vitex agnus-castus* on menopausal early symptoms in postmenopausal women: a randomized, double blind, placebo-controlled study. *Br J Med Med Res*, 1(1), 132-140.
- [130] **Singh, S., Pal, N., Shubham, S., Sarma, D. K., Verma, V., Marotta, F., ve ark.** (2023). Polycystic ovary syndrome: etiology, current management, and future therapeutics. *Journal of Clinical Medicine*, 12(4), 1454.
- [131] **Saul, S.** (2017). Effects of vitex agnes castus on hormonal imbalances in Polycystic Ovary Syndrome. *International Journal of Basic & Clinical Pharmacology*, 6(8), 2051-2056.
- [132] **Feyzollahi, Z., Kouchesfehiani, H. M., Jalali, H., Eslimi-Esfahani, D. ve Hosseini, A. S.** (2021). Effect of *Vitex agnus-castus* ethanolic extract on hypothalamic KISS-1 gene expression in a rat model of polycystic ovary syndrome. *Avicenna journal of phytomedicine*, 11(3), 292.
- [133] **Hosseini-Rashidi, B. ve Nemati, M.** (2017). Effects of *Vitex agnus-castus* extract on the secretory function of pituitary-gonadal axis and pregnancy rate in patients with premature ovarian aging (POA). *Journal of herbal medicine*, 10, 24-30.
- [134] **Westphal, L. M., Polan, M. L. ve Trant, A. S.** (2006). Double-blind, placebo-controlled study of Fertilityblend: a nutritional supplement for improving fertility in women. *Clinical and experimental obstetrics & gynecology*, 33(4), 205-208.
- [135] **Antoine, E., Chirila, S. ve Teodorescu, C.** (2019). A patented blend consisting of a combination of *Vitex agnus-castus* extract, *Lepidium meyenii* (Maca) extract and active folate, a nutritional supplement for improving fertility in women. *Maedica*, 14(3), 274.
- [136] **Davis, P.** (1982). *Flora of Turkey, and the East Aegean Islands, Volume 7, Vitex L.*: Edinburgh University Press.
- [137] **European Pharmacopoeia 7.0.** (2022).
- [138] **Demirbolat, I., Inal, E., Ulusoy, S. ve Kartal, M.** (2022). Variations in chemical compositions and biological activities of *Artemisia vulgaris* L.

- (common mugwort) essential oils at different growth stages. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 25(2), 393-402.
- [139] İnal, E., Nath, E. O., Abudayyak, M., Ulusoy, Ş., İnan, H. A., Çiçek, M., ve ark. (2023). Chemical composition of different parts of the *Vitex agnus-castus* L. essential oils and their *in-vitro* cytotoxic activities. *Records of Natural Products*, 17(5).
- [140] Shang, Z., Fang, Y., Yang, Z., Luo, W., Li, X. ve Xiao, S. (2022). A New Diterpenoid with Antitumor Cytotoxicity from Millipede. *Records of Natural Products*, 16(3), 259-263.
- [141] Kızıltaş, H., GÖREN, A. C., Bingol, Z., Alwasel, S. H. ve Gülçin, İ. (2021). Anticholinergic, antidiabetic and antioxidant activities of *Ferula orientalis* L. determination of its polyphenol contents by LC-HRMS.
- [142] Türk Farmakopesi - II Avrupa Adaptasyonu. (2016). *Hayıt, Meyve*.
- [143] Singleton, V. L. ve Rossi, J. A. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American journal of Enology and Viticulture*, 16(3), 144-158.
- [144] Woisky, R. G. ve Salatino, A. (1998). Analysis of propolis: some parameters and procedures for chemical quality control. *Journal of apicultural research*, 37(2), 99-105.
- [145] Süntar, İ. (2011) *Türkiye'de halk arasında yara iyileştirici amaçla kullanılan bazı bitkilerin aktiviteleri üzerinde araştırmalar*: Gazi Üniversitesi.
- [146] Turgut, R., Kartal, M., Akkol, E. K., Demirbolat, İ. ve Taştan, H. (2021). Development of cholesterol-lowering and detox formulations using bentonite and herbal ingredients. *Frontiers in pharmacology*, 12, 775789.
- [147] Bacak, E. (2010) *Yağlı diyet ile beslenen sıçanlarda timokinon'un plazma leptin, karnitin, paraoksanaz, tiroid hormonları, insülin ve glikoz ile lipid profiline etkilerinin araştırılması*: Afyon Kocatepe University.
- [148] Bustanji, Y., Mohammad, M., Hudaib, M., Tawaha, K., Al-Masri, I. M., AlKhatib, H. S., ve ark. (2011). Screening of some medicinal plants for their pancreatic lipase inhibitory potential. *Jordan Journal of Pharmaceutical Sciences*, 4(2), 81-88.
- [149] Jo, Y. H., Kim, S. B., Liu, Q., Do, S.-G., Hwang, B. Y. ve Lee, M. K. (2017). Comparison of pancreatic lipase inhibitory isoflavonoids from unripe and ripe fruits of *Cudrania tricuspidata*. *PLoS One*, 12(3), e0172069.
- [150] Zhang, J., Kang, M.-J., Kim, M.-J., Kim, M.-E., Song, J.-H., Lee, Y.-M., ve ark. (2008). Pancreatic lipase inhibitory activity of *Taraxacum officinale* *in vitro* and *in vivo*. *Nutrition Research and Practice*, 2(4), 200-203.
- [151] Babushok, V., Linstrom, P. ve Zenkevich, I. (2011). Retention indices for frequently reported compounds of plant essential oils. *Journal of Physical and Chemical Reference Data*, 40(4).
- [152] Hanoğlu, D. Y., Hanoğlu, A., Demirci, B. ve Başer, K. H. C. (2023). The essential oil compositions of *Teucrium* spp. belonging to the section *Polium* Schreb.(Lamiaceae) growing in Cyprus. *Rec Nat Prod*, 17, 113-124.
- [153] NISTWebbook Home Page. **1-Pentanol, 3-methyl-**. (2023). <https://webbook.nist.gov/cgi/cbook.cgi?ID=C589355&Mask=2000#Gas-Chrom>
- [154] Ricarte, L. P., Bezerra, G. P., Romero, N. R., Silva, H. C., Lemos, T. L., Arriaga, A., ve ark. (2020). Chemical composition and biological activities of the essential oils from *Vitex-agnus castus*, *Ocimum campechianum* and *Ocimum carnosum*. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 92, e20180569.

- [155] Duymuş, H., Çiftçi, G. A., Yıldırım, Ş. U., Demirci, B. ve Kırimer, N. (2014). The cytotoxic activity of *Vitex agnus castus* L. essential oils and their biochemical mechanisms. *Industrial Crops and Products*, 55, 33-42.
- [156] Jin, K.-S., Bak, M.-J., Jun, M., Lim, H.-J., Jo, W.-K. ve Jeong, W.-S. (2010). α -Pinene triggers oxidative stress and related signaling pathways in A549 and HepG2 cells. *Food Science and Biotechnology*, 19, 1325-1332.
- [157] Jo, H., Cha, B., Kim, H., Brito, S., Kwak, B. M., Kim, S. T., ve ark. (2021). α -Pinene enhances the anticancer activity of natural killer cells via ERK/AKT pathway. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(2), 656.
- [158] Kang, E., Lee, D. H., Jung, Y. J., Shin, S. Y., Koh, D. ve Lee, Y. H. (2016). α -Pinene inhibits tumor invasion through downregulation of nuclear factor (NF)- κ B-regulated matrix metalloproteinase-9 gene expression in MDA-MB-231 human breast cancer cells. *Applied Biological Chemistry*, 59, 511-516.
- [159] Ahmed, E. A., Abu Zahra, H., Ammar, R. B., Mohamed, M. E. ve Ibrahim, H.-I. M. (2022). Beta-caryophyllene enhances the anti-tumor activity of cisplatin in lung cancer cell lines through regulating cell cycle and apoptosis signaling molecules. *Molecules*, 27(23), 8354.
- [160] Lei, J., Wang, Q., Li, G., Li, Y., Zhang, P. ve Xu, G. (2021). β -Caryophyllene from Chilli pepper inhibits the proliferation of non-small cell lung cancer cells by affecting miR-659-3p-targeted sphingosine kinase 1 (SphK1). *International Journal of General Medicine*, 9599-9613.
- [161] Chebet, J. J., Ehiri, J. E., McClelland, D. J., Taren, D. ve Hakim, I. A. (2021). Effect of d-limonene and its derivatives on breast cancer in human trials: a scoping review and narrative synthesis. *BMC cancer*, 21, 1-11.
- [162] Yu, X., Lin, H., Wang, Y., Lv, W., Zhang, S., Qian, Y., ve ark. (2018). D-limonene exhibits antitumor activity by inducing autophagy and apoptosis in lung cancer. *OncoTargets and therapy*, 1833-1847.
- [163] Mandal, D., Patel, P., Verma, S. K., Sahu, B. R. ve Parija, T. (2022). Proximal discrepancy in intrinsic atomic interaction arrests G2/M phase by inhibiting Cyclin B1/CDK1 to infer molecular and cellular biocompatibility of d-limonene. *Scientific Reports*, 12(1), 18184.
- [164] Naghibi, F., Khalaj, A., Mosaddegh, M., Malekmohamadi, M. ve Hamzeloo-Moghadam, M. (2014). Cytotoxic activity evaluation of some medicinal plants, selected from Iranian traditional medicine Pharmacopoeia to treat cancer and related disorders. *Journal of ethnopharmacology*, 155(1), 230-239.
- [165] Ohyama, K., Akaike, T., Hirobe, C. ve Yamakawa, T. (2003). Cytotoxicity and apoptotic inducibility of *Vitex agnus-castus* fruit extract in cultured human normal and cancer cells and effect on growth. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 26(1), 10-18.
- [166] Milagro, F. I., Campi3n, J. ve Mart3nez, J. A. (2006). Weight gain induced by high-fat feeding involves increased liver oxidative stress. *Obesity*, 14(7), 1118-1123.
- [167] Yang, J.-Y., Lee, S.-J., Park, H.-W. ve Cha, Y.-S. (2006). Effect of genistein with carnitine administration on lipid parameters and obesity in C57Bl/6J mice fed a high-fat diet. *Journal of Medicinal Food*, 9(4), 459-467.
- [168] Chilliard, Y., Bonnet, M., Delavaud, C., Faulconnier, Y., Leroux, C., Djiane, J., ve ark. (2001). Leptin in ruminants. Gene expression in adipose tissue and mammary gland, and regulation of plasma concentration. *Domestic Animal Endocrinology*, 21(4), 271-295.

- [169] Houseknecht, K. L., Baile, C. A., Matteri, R. L. ve Spurlock, M. E. (1998). The biology of leptin: a review. *Journal of animal science*, 76(5), 1405-1420.
- [170] Trayhurn, P., Hoggard, N., Mercer, J. ve Rayner, D. (1999). Leptin: fundamental aspects. *International Journal of Obesity*, 23(1), S22-S28.
- [171] Schwartz, M. W. ve Seeley, R. J. (1997). Neuroendocrine responses to starvation and weight loss. *New England Journal of Medicine*, 336(25), 1802-1811.
- [172] Kelly, G. (2000). Peripheral metabolism of thyroid hormones: a review. *Alternative medicine review*, 5(4), 306-306.
- [173] Kaneko, J. (2008). *Clinical biochemistry of domestic animals*. Academic press.
- [174] Aslan, K., Serdar, Z. ve Tokullugil, H. A. (2004). Multifonksiyonel hormon: leptin. *Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*, 30(2), 113-118.
- [175] Benvenga, S. ve Robbins, J. (1998). Thyroid hormone efflux from monolayer cultures of human fibroblasts and hepatocytes. Effect of lipoproteins and other thyroxine transport proteins. *Endocrinology*, 139(10), 4311-4318.
- [176] Everts, M., Lim, C., Moerings, E., Docter, R., Visser, T., De Jong, M., ve ark. (1995). Effects of a furan fatty acid and indoxyl sulfate on thyroid hormone uptake in cultured anterior pituitary cells. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 268(5), E974-E979.
- [177] Brito, P., Ramos, C., Passos, M. ve Moura, E. (2006). Adaptive changes in thyroid function of female rats fed a high-fat and low-protein diet during gestation and lactation. *Brazilian journal of medical and biological research*, 39, 809-816.
- [178] Maffei, á., Halaas, J., Ravussin, E., Pratley, R., Lee, G., Zhang, Y., ve ark. (1995). Leptin levels in human and rodent: measurement of plasma leptin and ob RNA in obese and weight-reduced subjects. *Nature medicine*, 1(11), 1155-1161.
- [179] Noriega-Lopez, L., Tovar, A. R., Gonzalez-Granillo, M., Hernandez-Pando, R., Escalante, B., Santillan-Doherty, P., ve ark. (2007). Pancreatic insulin secretion in rats fed a soy protein high fat diet depends on the interaction between the amino acid pattern and isoflavones. *Journal of biological chemistry*, 282(28), 20657-20666.
- [180] Noyan, A. (2004). *Yaşamda ve hekimlikte fizyoloji*. Meteksan.
- [181] Caporali, S., De Stefano, A., Calabrese, C., Giovannelli, A., Pieri, M., Savini, I., ve ark. (2022). Anti-inflammatory and active biological properties of the plant-derived bioactive compounds luteolin and luteolin 7-glucoside. *Nutrients*, 14(6), 1155.
- [182] Torres-Villarreal, D., Camacho, A., Castro, H., Ortiz-Lopez, R. ve de la Garza, A. L. (2019). Anti-obesity effects of kaempferol by inhibiting adipogenesis and increasing lipolysis in 3T3-L1 cells. *Journal of physiology and biochemistry*, 75, 83-88.
- [183] Bian, Y., Lei, J., Zhong, J., Wang, B., Wan, Y., Li, J., ve ark. (2022). Kaempferol reduces obesity, prevents intestinal inflammation, and modulates gut microbiota in high-fat diet mice. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 99, 108840.
- [184] Rajanna, L., Raghavan, P. V. ve Sharma, G. S. (2015). Phytochemical evaluation of *Vitex agnus-castus* L seeds collected from different geographical regions of the world. *Res Rev*, 4, 21-28.
- [185] Thaçi, S., Krasniqi, B., Dërmaku-Sopjani, M., Rifati-Nixha, A., Abazi, S. ve Sopjani, M. (2022). Vasorelaxant effects of the *Vitex agnus-castus* extract. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2022(1), 7708781.

- [186] **Hoberg, E., Meier, B. ve Sticher, O.** (2000). Quantitative high performance liquid chromatographic analysis of diterpenoids in agni-casti fructus. *Planta medica*, 66(04), 352-355.
- [187] **Sahib, H. B., AL-Zubaudy, A. A., Hussain, S. M., Banj Qasim, G. ve ALRawi, S.** (2014). Acute toxicity of *Vitex agnus castus* methanol extract. *Int J Pharmacol Sci Rev Res*, 26, 123-128.
- [188] **Khalilzadeh, E., Saiah, G. V., Hasannejad, H., Ghaderi, A., Ghaderi, S., Hamidian, G., ve ark.** (2015). Antinociceptive effects, acute toxicity and chemical composition of *Vitex agnus-castus* essential oil. *Avicenna journal of phytomedicine*, 5(3), 218.



EKLER

EK A: Etik kurul onayı



EK A



ÖZGEÇMİŞ

Ad-Soyad : Ebrar İNAL

Doğum Tarihi ve Yeri :

E-posta :

ÖĞRENİM DURUMU:

- **Lisans** : 2021, Bezmialem Vakıf Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi

MESLEKİ DENEYİM VE ÖDÜLLER:

- 2021-(Devam ediyor) Araştırma Görevlisi, Bezmialem Vakıf Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmakognozi Anabilim Dalı

DOKTORA TEZİNDEN TÜRETİLEN YAYINLAR VE SUNUMLAR:

- **Ulusoy, Ş., İnal, E., Küpeli Akkol, E., Çiçek, M., Kartal, M., & Sobarzo-Sánchez, E.** (2024). Evaluation of the anti-obesity effect of *Sambucus nigra* L. (elderberry) and *Vitex agnus-castus* L. (chasteberry) extracts in high-fat diet-induced obese rats. *Frontiers in Pharmacology*, 15, 1410854, doi: <https://doi.org/10.3389/fphar.2024.1410854>
- **İnal, E., Nath, E. O., Abudayyak, M., Ulusoy, Ş., İnan, H. A., Çiçek, M., & Kartal, M.** (2023). Chemical composition of different parts of the *Vitex agnus-castus* L. essential oils and their *in-vitro* cytotoxic activities. *Records of Natural Products*, 17(5), 904-917.
- **İnal, E., Ulusoy, Ş., Özdemir Nath, E., Abudayyak, M., & Kartal, M.** (2023). Phenolic content determination by LC-HRMS and cytotoxicity assesment of *Vitex agnus-castus* fruit, flower and leaf extracts. *Trends in Natural Product Research - Phytochemical Society of Europe (PSE) Young Scientists' Meeting*, June 28-30, Paris, France.
- **Kartal, M., İnal, E., Ulusoy, Ş., Özdemir Nath, E., & Abudayyak, M.** (2023). Chemical content determination by GC-FD/MS and cytotoxicity assesment of *Vitex agnus-castus* fruit, flower and leaf essential oils. *Trends in Natural Product Research - Phytochemical Society of Europe (PSE) Young Scientists' Meeting*, June 28-30, Paris, France.

DİĞER YAYINLAR VE SUNUMLAR:

- **Algın Yapar E., İnal E., Kara B. A., Yıldırım T. S., Yılmaz F. N., Özkanca C., Erdal M. S., Döşler S., Kartal M.** (2025). "Herbal Mucoadhesive Gels for Canker Sores: Analysis of Physicochemical Properties, Efficacy, and Safety", *Comb Chem High Throughput Screen*.
- **Cicek, M., Aydılek, N., Ulusoy, S., Inal, E., Akbal Inan, H., Dag, A., Cagman, Z., Ozsoy, Y., & Kartal, M.** (2024). Cytotoxic activity and evaluation of *in vitro* release of apigenin 7-O-Glucoside from the Topical pharmaceutical formulation containing *Matricaria Recutita* L. flower extract. *Acta Poloniae Pharmaceutica*, 81(3).
- **Algın Yapar, E., Gökçe, E. H., Şahiner, A., İnal, E., Ulusoy, Ş., Souto, E. B., Akañoğlu, B., & Kartal, M.** (2024). Phytoactive essential oils-composed water-free organogels: development, characterization and proof of antibacterial activity. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 105811.
- **Algın Yapar, E., Gökçe, E. H., Şahiner, A., İnal, E., Ulusoy, Ş., Souto, E. B., Akañoğlu, B., & Kartal M.** (2024). Development of phytoactive essential oils-composed organogels against oral pathogens. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 97, 105778.
- **Esentürk-Güzel, I., Algın Yapar, E., Cavalu, S., Şeker, İ. T., İnal, E., Kartal, M., Çakır Koç, R., Yılmaz Öztürk, R., Göksu, F., Bölek, S., & Türkmen, A.** (2024). Design and evaluation of propolis-HPC/PVP electrospun nanofibers for possible cutaneous applications. *Farmacia*, 72(1).
- **Demirbolat, I., Ulusoy, Ş., İnal, E., & Kartal, M.** (2023). Variations in essential oil compositions and biological activities of *Artemisia annua* L. (sweet wormwood) at different growth periods. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 26(4), 1008-1017.
- **Demirbolat, I., Inal, E., Ulusoy, Ş., & Kartal, M.** (2022). Variations in chemical compositions and biological activities of *Artemisia vulgaris* L. (common mugwort) essential oils at different growth stages. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 25(2), 393-402.
- **Inal, E., Ulusoy, Ş., Yapar, E. A., Gürer, E. S., Yalçın, Ş., & Kartal, M.** (2022). Investigation of resveratrol and phenolic compounds of ethnomedicinal plant *Polygonum cognatum* Meissn. collected from Sivas. *Journal of Research in Pharmacy*, 26(6), 1752-1757.
- **Kartal, M., Ulusoy, Ş., & İnal, E.** (2022). Bitkisel Droglarda Kalite Kontrol. Rüveyde Tunçtürk (Ed.), *Tıbbi ve Aromatik Bitkilerin Fonksiyonel Kullanım Alanları Ticareti ve Sürdürülebilirliği* (s. 183-219), Ankara: İksad Yayınevi.
- **İnal, E., Kartal, M., & Ulusoy, Ş.,** (2021). Pektinin Kimyasal Yapısı, Özellikleri ve Ekonomik Önemi: Eczacılık ve Kozmetikte Kullanımı. *Türk Farmakope Dergisi*, 6(3), 29-44.
- **Ulusoy, Ş., Kartal, M., & İnal, E.** (2021). Alzheimer Hastalığı ve Doğal Kaynaklı Bileşikler. *Türk Farmakope Dergisi*, 6(2), 56-74.
- **Özdemir M. N., Algın Yapar E., Esentürk Güzel İ., Gürbüz Yurtsever A., İnal E., Kartal M.** (2024). Design and Characterization of Herbal Actives Included Topical Nanoemulgels for Varicose Disease. *11th International European*

Congress on Advanced Studies in Basic Sciences (pp.381-382), November 11-13, Rome, Italy.

- **Algın Yapar, E., İnal, E., Kara, B. A., Yıldırım, T. S., Yılmaz, F. N., Özkanca, C., Erdal, M.S., Döşler, S., & Kartal, M.** (2024). Mucoadhesive Herbal Gel Formulations for Canker Sores. *Tashkent International Congress on Modern Sciences-III* (pp.247), April 22-23, Tashkent, Uzbekistan.
- **Algın Yapar, E., Gökçe, E. H., İnal, E., Ulusoy, Ş., Çankaya, İ. İ., & Kartal, M.** (2024). Design of a Burn Treatment Ointment Containing Herbal Bioactives. *Tashkent International Congress on Modern Sciences-III* (pp.245), April 22-23, Tashkent, Uzbekistan.
- **İnal, E., Algın Yapar, E., Kara, B. A., Özkanca, C., Döşler, S., & Kartal, M.** (2023). Antimicrobial Mouthwash Formulations for Dry Mouth and Removal of Bad Odour. *4th International Cancer Days*, (pp.53), September 28-30, Sivas, Türkiye.
- **Ulusoy, Ş., İnal, E., Özdemir Nath, E., Abudayyak, M., & Kartal, M.** (2023). Phenolic content determination by LC-HRMS and cytotoxicity assessment of *Sambucus nigra* leaf, flower and fruit extracts. *Trends in Natural Product Research - Phytochemical Society of Europe (PSE) Young Scientists' Meeting*, June 28-30, Paris, France.