

1. GİRİŞ

Proteinler organizmadaki bütün biyolojik olayların yapıtaşlarını oluşturması nedeniyle günlük diyetle alınması zorunlu besin maddeleri arasında yer almaktadır. Sosyo-ekonomik refah seviyesi yüksek toplumlarda insanlar tarafından günlük gereksinimin üzerinde bir protein tüketimi olmaktadır. Yüksek protein tüketimi aynı zamanda kilo kaybetmek amacıyla da kullanılmaktadır. Bunda günümüzde obesitenin bir sağlık sorunu olmasının etkisi de bulunmaktadır. Beslenme, osteoperoz ve obesite de dahil pek çok kronik hastalığın patogenezi ve önlenmesinde önemli bir rol oynamaktadır. Benzer şekilde, verim artışını sağlamak ve gelişmeyi hızlandırmak amacıyla ekonomik değeri olan hayvanların yemlerinde de yüksek protein kullanılmaktadır. Bununla birlikte, yüksek protein tüketimi organizmada fizyolojik fonksiyonların bozulmasına neden olmakta ve sağlığı olumsuz etkileyebilmektedir. Bunlar arasında, yüksek protein tüketimi nedeniyle vücut kalsiyum dengesinin bozulması ve idrarla atılan kalsiyum miktarının artması da bulunmaktadır. İdrarla kalsiyum atılımının artmasının osteoperoz riskini de artıracığı düşünülmekte ve bu nedenle yüksek protein tüketiminin osteoperoz için muhtemel bir risk faktörü olduğu kabul edilmektedir. Bunun yanında, yüksek kalsiyum tüketiminin obesiteyi önlediğine yönelik bildirimler dikkate alındığında, yüksek protein tüketimine bağlı kalsiyum metabolizmasındaki bozulma obesitenin hafifletilmesini olumsuz etkileyecektir.

Günümüzde sentetik ilaçların kullanımı sonucu meydana gelen ciddi yan etkiler, bunların yol açtığı medikal ve ekonomik sorunlar nedeniyle tıbbi bitkilerle tedavi tekrar popüler hale gelmiş bulunmaktadır. Bu nedenle, bilim adamları yüksek protein tüketiminin organizmada yol açtığı olumsuzlukların giderilebilmesi ya da en aza indirilebilmesi amacıyla doğal bitkisel kaynaklardan yararlanılması üzerinde durmakta ve bu alana yönelik önemli araştırmalar yapmaktadırlar. Bu bitkisel kaynaklar arasında, hem suda hem de yağda çözünebilmeleri ve yüzey aktif özellikler içermesi nedeniyle saponin içeren bitkiler de yer almaktadır. Sindirim olayı insan ve hayvanlarda değişmekle birlikte, sindirim kanalının değişik bölgelerine yerleşmiş mikroorganizmaların proteinleri parçalaması nedeniyle

amonyak oluşmakta ve oluşan amonyağın bir kısmı kana geçerek karaciğerde üreye dönüşürken bir kısmı da dışkıyla atılarak çevreyi olumsuz etkilemektedir. Saponinlerin; sindirim kanalı içerisinde hem proteinlerle sindirimi güç kompleksler oluşturması hem de amonyağı bağlayarak emilimini düşürdüğü belirlenmesinden sonra, yüksek protein diyetlerin organizmada yol açtığı olumsuzlukların önlenmesinde saponin içeren bitkilerin kullanılmasına yönelik bir ilginin oluşmasına yol açmıştır.

Saponin içeren bitkilerin özellikle hipokolesterolemik, antiinflamatuvar, oksidan-antioksidan denge ve hücre membranı üzerindeki etkilerini konu alan çok sayıda çalışma bulunmaktadır. Ancak diyetle birlikte yüksek oranda protein alımının kalsiyum metabolizması üzerindeki olumsuz etkileri önlemede saponin içerikli bitkilerin etkilerine yönelik araştırmalar oldukça yetersiz olup, bu konulara yönelik araştırmalara gereksinim bulunmaktadır. Bu nedenle, bu tez projesinde; dünyada ve ülkemizde yaygın olarak bulunan atkestanesi ağacının (*Aesculum hippocastanum L.*) tohumlarında bulunan ve etken maddesini triterpenik saponin karışımının oluşturduğu "aescin" in (essin), yüksek protein içeren diyetle ilavesinin özellikle kalsiyum ve kemik metabolizması üzerindeki etkileri araştırılmıştır. Bu sayede, yüksek protein tüketimine bağlı olarak kemik ve kalsiyum metabolizmasında meydana gelen fizyolojik ve biyokimyasal değişimler ile saponinlerin bu değişimler üzerine etkileri ve neden-sonuç ilişkisinde yer alan mekanizmaların açığa kavuşturulması bakımından yeni bilgiler elde edilmiş ve bu bilgilerin konuya yönelik bilimsel yorumlara katkı sağlayacağı kanaatine varılmıştır.

1.1. Proteinler Ve Protein Metabolizması

Yapılarında karbon, hidrojen, oksijen ve azot bulunan proteinler, yaşam için gerekli organik bileşikler olup, organizmanın genel yapı taşlarını teşkil etmektedirler. Canlıların büyümeleri, üremeleri, kalıtım özelliklerinin bir nesilden diğer bir nesile taşınması, canlı organizmadaki metabolizma olaylarını kataliz eden enzimler, fizyolojik etki gösteren hormonların bir kısmı ve organizmayı bazı hastalıklara

karşı koruyan antikorlar gibi önemli maddeler de protein yapısındadırlar. Proteinler hücre içinde hem çözülmüş halde sitozolde hem de çözünmemiş halde hücrenin iskeletinde bulunmaktadır. Organizmada proteinlerin çoğu devamlı olarak yıkılmakta ve yeniden sentezlenmektedir. Nitekim radyoaktif izotoplarla işaretlenmiş amino asitlerden yapılan protein sentezinden yararlanılarak, ortalama bir diyetle beslenen 70 kg ağırlığa sahip bir insanda günde takriben 400 g proteinin yıkıldığı ve yeniden sentez edildiği hesaplanmıştır (Ersoy ve Bayşu, 1986). Bu nedenle, proteinler bütün canlı organizmaların en önemli maddelerini oluşturmakta ve organizmadaki düzeylerinin korunması için düzenli diyetle alınması gerekmektedir.

Diyetle alınan proteinler hayvansal ve bitkisel kaynaklı olmaktadır. Günlük diyetle alınan proteinlerin kalite, çeşit ve miktarları birbirlerinden farklılık göstermektedir. Sindirilebilirlik açısından hayvansal proteinler bitkisel proteinlere göre daha fazla sindirilebilirliğe sahiptirler. Esansiyel amino asitler açısından ele alındığında ise hayvansal kaynaklı proteinler yeterli düzeyde iken, bitkisel kaynaklı proteinler yetersiz bulunmakta ve sindirimleri de güç olmaktadır. Bununla birlikte, bitkisel kaynaklı gıdalara göre ekonomik yönden daha pahalı olan hayvansal kaynaklı gıdalar içerdikleri doymuş yağ ve kolesterol nedeni ile aşırı tüketildiğinde kalp - damar hastalıklarına neden olabilmekte ve sağlığı olumsuz etkilemektedir. Buna ilave olarak, diyetdeki protein kaynağına bağlı olarak kan lipid profilleri değişebilmekte, bitkisel kaynaklı proteinler hipokolesterolemik etki gösterirken, hayvansal kaynaklı proteinler tam tersi hiperkolesterolemik etkiye sahip olmaktadır. Bunun nedeni olarak, bitkisel proteinlerde hayvansal proteinlerde olmayan fitokimyasalların bulunması gösterilmektedir (Potter ve ark., 1993).

İnsan ve hayvanlarda günlük protein gereksinimi vücut yapısına ve fizyolojik durumlara (büyüme, laktasyon, gebelik vb.) göre değişiklikler gösterebilmektedir. Vücudun ihtiyacından fazla alınan proteinler, enerji kaynağı olarak da kullanılmaktadır (Ersoy ve Bayşu, 1986). Son yıllarda, zayıflamak ve kilo kaybetmek amacıyla protein düzeyi yüksek diyetle beslenmeye yönelik bir ilgi bulunmaktadır. Yapılan araştırmalar, insanlarda iştah ve kalori tüketiminin

kontrolünde yüksek protein içeren diyetlerin yararı olduğuna işaret etmektedir (Johnstone ve ark., 2008).

1.1.1. Protein Tanımı

Yunanca'da "ilk ve önemli" anlamına gelen **proteios** sözcüğüne dayanarak **protein** adı verilmiş olan proteinlerin yapı taşlarını amino asitler oluşturmaktadır (Bayşu Sözbilir ve Bayşu, 2008). Bitkiler ve bazı mikroorganizmalar besin ortamlarında amino asit bulunmasına ihtiyaç göstermezler ve karbon kaynağı olarak CO₂, azot kaynağı olarak da amonyum tuzları veya nitrat sağlandığı sürece kendi sentezleri ile amino asit ihtiyaçlarını karşılayabilmektedir (Ersoy ve Bayşu, 1986). Gelişmiş yüksek organizmalar ise metabolizmada ihtiyaç duydukları amino asitlerin bir kısmını sentez edebilirlerken bir kısmını sentezleyememekte ve besinlerle dışarıdan almak zorundadırlar. Organizmanın normal metabolizması, gelişmesi ve çoğalması için mutlaka gerekli olan ve dışarıdan besinlerle alınması zorunlu olan amino asitlere "esansiyel amino asitler" denmektedir (Bayşu Sözbilir ve Bayşu, 2008).

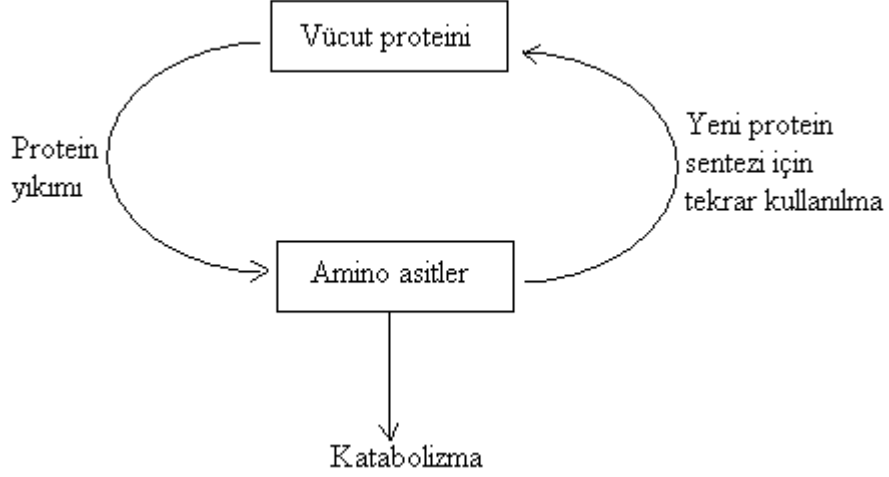
Proteinlerin proteolitik enzimler tarafından parçalanması sonucu 20 amino asit elde edilir. Buna karşın, doğada 20' den fazla amino asit bulunmakta ve bunların birçoğu sadece mikroorganizmalarda ve bitkilerde yer almaktadır. Prolin ve hidroksprolin istisna olmak üzere amino asitler α -amino karboksilli asitlerdir ve radikal köklerine göre birbirinden ayrılırlar. Amino asitler (glisin hariç) D- ve L- olmak üzere iki stereoizomere sahiptirler ve doğal aminoasitlerin çoğu L- serisine dahildirler (Kalaycıoğlu ve ark., 2006). R, H atomu veya bir alkil, aril, heterosiklik grup olabilir. Proteinlerde her biri farklı "R" -grupuna sahip yirmiden fazla α -amino asit bulunmaktadır. Her bir proteinde amino asitlerin dizilişi özgün olup, protein molekülünün bütün yapısında yer almaktadır (Montgomery ve ark., 2000). Karboksil (-COOH), AMİNO (-NH₂), imino (-NH), tiyo veya sülfhidril (-SH) ile fenil halkası gibi fonksiyonel gruplar bir araya gelerek amino asitleri oluşturmakta ve amino asitlerin peptid bağlarıyla bağlanmaları sonucu ise polipeptidler, polipeptidlerin (n) sayıda birleşmesiyle de proteinler oluşmaktadır (Bayşu Sözbilir ve Bayşu, 2008).

1.1.2. Protein Metabolizması

Diyetle alınan proteinler sindirim kanalı içerisinde kendilerini oluşturan amino asitlere parçalanmakta ve oluşan amino asitler bağırsaklardan emilmektedir. Emilen amino asitler karaciğerde tekrar protein sentezinde kullanılmakta ve vücutta bir havuzda depolanmaktadır. Ancak proteinin vücutta depolanma oranı karbonhidrat ve yağlardan çok daha düşük olmaktadır. Diyetle alınan proteinler ihtiyaçtan fazla ise, fazla amino asitler karaciğerde glikoz sentezinde ya da enerji kaynağı olarak kullanılmaktadır. Amino asitler; amino gruplarını kaybettikten sonra kalan karbon iskeletleri ya glukoneogenesis olayı ile glikoza çevrilmekte veya trikarboksilik asit siklusu yolu ile CO₂'e oksitlenmektedir (Ersoy ve Bayşu, 1986). Enerji elde etmek için amino asit yıkımı artarsa vücut azot dengesi bozulmaktadır. Diyetle alınan protein yetersiz ise vücut amino asit havuzu için gerekli olan düzeyi, vücut proteinlerinin yıkımı ile yerine konmaktadır. Enerji alımının yetersiz olması halinde ise amino asit havuzu önemli bir enerji kaynağını oluşturmaktadır (Noyan, 1993).

Protein dönüşümü yani hücresel proteinlerin tümünün yıkım ve yeniden yapımı bütün yaşam biçimlerinde görülen kilit bir fizyolojik olaydır. Organizmada her protein oldukça farklı hızlarda yıkılıma uğramakta ve yıkılım sonucu oluşan amino asitlerin fazlası depo edilmemektedir (Murray ve ark., 2004). Amino asitler kanda taşınmakta ve perifer hücreler tarafından aktif transportla alınmaktadır. Hücre içi aminoasit havuzu; transportla gelen aminoasitlerin yanı sıra, hücre içi protein yıkılımlarıyla serbest kalan aminoasitler ve hücrede sentezlenen aminoasitlerden oluşmaktadır. Protein yıkılımı sonucu oluşan serbest amino asitlerin yaklaşık yarısı tekrar protein sentezinde kullanılmakta ve protein ihtiyacının karşılanamadığı durumlarda (örn. açlık) bu oran %90'lara kadar yükselebilmektedir (Kalaycıoğlu ve ark., 2006). Ekonomik koşulların yetersiz olması, dengesiz beslenme ve bazı hastalıklara (gastrointestinal hastalıklar, böbrek ve karaciğer hastalıkları gibi) bağlı nedenlerle günlük diyetle alınması gerekli protein miktarının düşük olması protein yetersizliğine yol açmaktadır. Uzun süreli yetersizliklerde organizma kendi dokularındaki proteini kullanmak zorunda kalmakta, bu durumda büyüme

yavaşlamakta, vücut ağırlığı azalmakta, hastalıklara karşı direnç azalmakta, iyileşme geç olmakta ve demir, kalsiyum ve A vitamini gibi besin öğelerinin kullanımı azalmaktadır (Yaman, 2009).



Şekil 1.1. Protein Ve Amino Asit Dönüşümü (Murray ve ark., 2004)

Vücut azot dengesi; günlük gıdalarla alınan toplam azot miktarı ile dışkı, idrar, süt ve ter ile atılan toplam azot miktarı arasındaki farkı göstermektedir. Alınan azotun, atılandan daha fazla olduğunu gösteren artı azot dengesi büyüme dönemini karakterize etmektedir (Murray ve ark., 2004). Gıdalarla alınan proteinler ve peptidler, olduğu gibi emilip kana verilmeyip gastrointestinal salgılar ve mukoza hücrelerinde bulunan proteolitik enzimler aracılığı ile yıkıma uğramakta ve bu yıkım sonucu oluşan amino asitler şeklinde emilmektedir. Gastrointestinal kanal içerisinde proteinler ilk olarak midede sindirime uğramakta ve ince bağırsaklarda tamamen yıkılarak buradan emilip kana geçmektedir.

Midede Protein Sindirimi: Protein sindirimi midede başlar ve pepsin tarafından gerçekleştirilir. Pepsin, mide mukozasının temel hücrelerinde inaktif formda bir proenzim olan pepsinojen halinde sentezlenir. Pepsinin optimal pH'sı 1.8 dolayındadır. Pepsin, endopeptidaz etkisine sahiptir ve protein zinciri içinde yer alan özellikle aromatik aminoasitlerden (fenilalanin ve tirozin) sonra gelen peptit bağlarını öncelikle koparır ve peptit sindirimi sonucu 600-3 000 molekül ağırlığına

sahip önceleri pepton adı verilen peptit zincirleri oluşur. Midede bu proteazlar aracılığı ile gerçekleştirilen sindirimden sonra peptit karışımı mide içeriği ile birlikte bağırsaklara gönderilir.

Bağırsaklarda Protein Sindirimi: Bağırsaklarda protein sindirimi öncelikle pankreas salgısı ile bağırsaklara ulaştırılan proteinazlar aracılığı ile sürdürülür. Bunlardan en önemlileri ise tripsin, kimotripsin, karboksi-peptidaz A ve B ile elastaz'dır. Pankreasta üretilen proteazlar da proenzimler halinde sentezlenmektedir. Tripsinojen barsaklarda bulunan enterokinaz ve daha önce varolan tripsinin otokatalitik etkisiyle aktif tripsine dönüştürülmekte ve kimotripsinojen ile karboksipeptidazlar da tripsinin etkisiyle aktif hale geçmektedirler. Tripsin ve kimotripsin endopeptidaz olup, peptit zincirinin iç kısımlarında yer alan peptit bağlarını koparmaktadırlar. Bununla birlikte, peptit bağlarına olan spesifitileri bakımından aralarında farklılıklar bulunmaktadır. Tripsin bazik aminoasitlerden (arjinin ve lizin) sonra gelen peptit bağlarını koparıken, kimotripsin daha çok geniş bir etki spektrumu göstermektedir. Bu iki enzimin etkisiyle mide içeriği ile bağırsaklara geçen 600- 3 000 molekül ağırlığına sahip peptit zincirleri daha küçük peptit zincirlerine parçalanmaktadır. Oluşan bu küçük peptit zincirleri de bir yandan pankreas sıvısı ile gelen karboksipeptidaz A ve B, diğer yandan barsak mukoza hücrelerince salınan aminopeptidazlar aracılığı ile dipeptit ve serbest aminoasit karışımlarına kadar yıkılmaktadır (Kalaycıoğlu ve ark., 2006). Hem peptidler hem de amino asitler, üç boyutlu yapılarına özgün taşınım sistemlerinin yardımı ile emilmektedir. Genelde peptidler, barsak epitelyum hücrelerinde bulunan peptidazlar tarafından hemen hidrolize edilmeleri nedeniyle portal kana yalnızca amino asitler geçmektedir (Montgomery ve ark., 2000).

1.1.3. Yüksek Proteinle Beslenmenin Organizmadaki Etkileri

Toplumların beslenme alışkanlıklarının değişmesiyle birlikte, özellikle Batılı tarzdaki diyetlerde et, doymuş yağ ve rafine edilmiş karbonhidrat miktarları artmakta ve alınan lif ve kalsiyum miktarları ise azalmaktadır. Bu tip bir beslenme tarzı da, başta osteoporoz olmak üzere insulin direnci ve obezite riskinin artmasına,

daha düşük hepatik glikoz çıkışına neden olmaktadır (Linn ve ark. 1996, Belobrajdic ve ark., 2004). Günlük olarak alınan protein miktarındaki bir artış, renal ve kardiyovasküler hastalıkların bir habercisi olan mikroalbuminuride artış için bir risk oluşturmasının yanında (Hoogeveen ve ark., 1998) insuline bağımlı olmayan diabet görülme sıklığında da bir artışa neden olduğu belirtilmektedir (Bankir ve Kriz, 1995; Brändle ve ark., 1996; Yanagisawa ve Wada 1998). Chow ve ark. (1994) yüksek protein tüketilmesi ile renal hücre kanseri riskindeki artış arasında bir ilişki olduğunu göstermişlerdir. Yüksek miktarda protein ve düşük miktarlarda meyve ve sebze içeren bu diyetlerin metabolizmaları sonucunda asidozis oluşabilmekte (Barzel ve Massey, 1998), özellikle saflaştırılmış protein alınması, üriner kalsiyumu artırmakta ve negatif bir kalsiyum dengesine neden olabilmektedir (Walker ve Linkswiller, 1972, Spencer ve ark., 1978). Yüksek protein tüketiminin yol açtığı bu hiperkalsirünün nedeni olarak, glomerular filtrasyon hızındaki (GFR) artış ile renal kalsiyum reabsorpsiyonundaki azalma gösterilmektedir (Kerstetter ve ark., 2003). Bazı araştırmacılar (Kerstetter ve ark., 2003), idrarla Ca atılımının düzenlenmesinde, günlük diyetle protein tüketiminin kalsiyum tüketiminden daha önemli olduğunu öne sürmektedirler.

Protein içeriği yüksek diyetlerle uzun süre beslenmenin sağlık üzerindeki yararlı ya da zararlı etkileri tam olarak aydınlatılamamıştır. Sıçanlarla yapılan araştırmalarda, yüksek protein tüketiminin hayvanlarda yem tüketimini düşürdüğü ve adipos dokuda azalmaya yol açtığı gösterilmiştir (McArthur ve ark., 1993, Bensaid ve ark., 2003). Peret ve ark. (1984) genetik olarak obez olan sıçanlarda yaptıkları araştırmada; yüksek protein tüketiminin yem tüketimi ve canlı ağırlığı azalttığı, karaciğerde üreogenezis ve glikoneogenezis ile yağ dokusunda lipolizisi uyardığını bulmuşlardır. Yüksek protein tüketimine bağlı yem tüketimindeki azalmanın tokluk duygusundan kaynaklanabileceği ileri sürülmektedir (Bensaid ve ark., 2003). Makro besinler arasında proteinlerin tokluk duygusunun oluşmasında karbonhidratlar ve yağlara göre daha etkin olduğu bildirilmektedir (Stubbs ve Whybrow, 2004).

Organizmada protein sentezi ve yıkılımı arasındaki dengeyi günlük protein tüketimindeki değişiklikler ile tüketilen proteinlerin kalitesi etkilemektedir (Philips ve ark., 2009). Bununla birlikte, değişik protein kaynakları içeren (soya proteini, ovalbumin, laktalbumin) yüksek proteinli diyet de yem tüketiminde azalmaya neden olmuştur (Semon ve ark., 1987). Enerji tüketiminin azalması protein tüketiminin artırılması canlı ağırlıkta azalmaya yol açmakta ve bu azalışta vücut yağ kitlesindeki azalmadan kaynaklanmaktadır (Bensaid ve ark., 2003). Bu tür bir beslemede amino asitlerin enerji kaynağı olarak kullanılmasına doğru yönlendirilmesinin etkisi ile protein tüketiminin düzenlenmesinde sıçanların metabolizmasında etkili sirkadiyen ritim hormonlarının da rol oynaması mümkündür. Nitekim yapılan bir araştırmada, 3 makrobesinin arasında serbest seçme imkanı verilen sıçanlarda gecenin ilk çeyreğinde proteinden en fazla sakındıkları ve son çeyreğinde ise proteini en fazla tükettikleri gözlenmiştir (Larue-Achagiotis ve ark., 1992).

1.2 . Kalsiyum Metabolizması

Vücutta iskelet sistemi başta olmak üzere yumuşak dokularda, hücre içi ve hücre dışı sıvılarda bulunan kalsiyum, organizmada meydana gelen biyolojik olayların pek çoğunda anahtar rol oynamaktadır (Kaneko, 1989). Kalsiyum; kas kasılması, kanın pıhtılaşması, enzim aktivitesi, sinirsel uyarım ve hormonların salınması ile hücre membranlarının geçirgenliği gibi biyolojik mekanizmalarda da önemli görev yapmaktadır. Bu nedenle, kalsiyum (Ca^{+2}) intrasellüler ve ekstrasellüler fizyolojik olaylarda oynadığı önemli rol ile omurgalı canlılarda homeostazisin devamını sağlamaktadır (Pineda, 2003).

Vücut kalsiyumunun çoğu kalsiyum fosfat tuzları hidroksi apatit [$Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$] şeklinde iskelet yapısında bulunmaktadır. Kalsiyum fosfat tuzlarının iki önemli fonksiyonundan birincisi, yaşamsal öneme sahip iç organların korunmasını ve hareket kolaylığını sağlayan iskelet yapısını oluşturmak, diğeri ise böbrek ve ince bağırsaklardan yeterli kalsiyum emiliminin olmadığı durumlarda ekstrasellüler sıvıya kalsiyum ve fosfor sağlamaktır (Şimşek ve Kocabay, 2002).

Serumda iyonize olmuş Ca^{+2} 'nin düzeyi birçok evcil hayvanda yaklaşık 1,25-1,6 mmol/L (6,0-10,6 mg/dL) değerleri arasında yer almaktadır (Kaneko, 1989).

Yapısında esansiyel bir element olarak kalsiyumu içermesi nedeniyle iskelet sistemi, hücre içi ve hücre dışı sıvılara kalsiyum sağlayan ana depo olarak fonksiyon görmektedir. Kandaki kalsiyum dengesinin sağlanması için iskelette bulunan toplam kalsiyum deposundan sadece %1 oranında kalsiyum hücre dışı sıvıya geçmektedir (Kaneko, 1989). Kan kalsiyum düzeyinin devamlılığının sağlanması için hormonal kontrol mekanizmaları bulunmaktadır. Bu mekanizmalar paratiroid hormon (PTH), kalsitonin ve vitamin D (1,25-dihidroksikolekalsiferol) olmak üzere üç hormondan oluşmaktadır (Oleszek ve Marston, 2000; Fidan ve Dündar, 2002; Niranjana ve ark., 2002). Kemik sürekli olarak iki zıt aktivite tarafından yenilenmektedir. Bu aktiviteler (rezorpsiyon ve formasyon) “kemik remodelling unit” denen geçici anatomik yapıda gerçekleşmektedir. Remodelling iskelet homeostazını devam ettirmek, kemik elastisitesini sağlamak ve ekstrasellüler kalsiyumun düzenli kaynağını sağlamak için gereklidir (Elçi, 2004). Kanda kalsiyum azalınca, kemik dokusu daha fazla kalsiyumu kana mobilize eder. Bu mekanizma kan kalsiyumunun %7 mg’lık kısmını sabit tutar. Kan kalsiyumunun yaklaşık %3 mg’lık kısmını ise paratiroid bezi kontrol eder (Bayşu Sözbilir ve Bayşu, 2008).

Plazmada kalsiyumunun yaklaşık olarak %50 kadarı serbest halde, %40 kadarı proteine bağlı, %10 kadarı ise bikarbonat, laktat, fosfat ve sitrat gibi diffüze olabilen küçük anyonlarla kompleks oluşturmuş halde bulunmaktadır (Kaneko, 1989; Bayşu Sözbilir ve Bayşu, 2008). İnsan ve hayvanların sağlığı için, hücre dışı sıvılarda kalsiyum iyonunun kontrolü hayati önem taşımaktadır. Hücre dışı sıvılarda kalsiyumun fizyolojik olarak aktif olan kısmını iyonize formu oluşturmaktadır. Hücre içi Ca^{+2} ; kas kontraksiyonu, hormonal sekresyon, glikojen metabolizması ve hücre bölünmesi gibi çeşitli hücre fonksiyonlarının önemli düzenleyicisi olarak işlev yapmakta ve toplam vücut kalsiyumunun %1’lik kısmını oluşturmaktadır (Şimşek ve Kocabey, 2002).

Ca^{+2} 'nin proteine bağılı fraksiyonu serum pH'ına bağılıdır ve genel olarak albuminin negatif yüklü tarafı ile daha az miktarı globulinlere bağılıdır. İyonize ve kompleks halde bulunan Ca^{+2} , Ca^{+2} 'nin ultrafiltre edilebilen fraksiyonunu oluşturur ve glomerular filtratta bulunur. Filtre edilen kalsiyumun %98'inden fazlası böbrekler tarafından geri emilmektedir. Geri emilmenin yüksek olması, vücuttaki kalsiyum dengesinin sürdürülmesi için önemli bir mekanizma olup, gerekli durumlarda böbrekler büyük miktarda kalsiyumu idrarla atabilmektedir. Filtre edilen kalsiyumun yaklaşık %70'i proksimal tubüllerde, %20'si Henle kulbunda, %10'u ise distal tubüllerde reabsorbe edilir. Distal tubüllerdeki kalsiyum reabsorbsiyonunun başlıca uyararı PTH'dır. Kalsiyum emiliminin gerçekleştiği diğir bir yer de bağırsaklardır. Bağırsaklardan kalsiyum emiliminin, transsellüler taşınım ve intersellüler taşınım olmak üzere iki bileşeni vardır. İntestinal absorbsiyon, diyetle birlikte alınan kalsiyum ile ilgili olup alınan kalsiyum miktarı azaldıkça absorbsiyon hızı artmaktadır (Pineda, 2003).

Hücre dışı sıvılardaki iyonize kalsiyum düzeyinin plazma membranındaki Ca^{+2} 'ye duyarlı reseptörlerle etkileşimi hücresel fonksiyonu düzenler. Hücre membranı Ca^{+2} reseptörü G-proteini ile birleşir ve bu 7-transmembran reseptör çok özeldir çünkü bu reseptör için ligand bir iyondur. Bu Ca^{+2} reseptörü, ekstrasellüler Ca^{+2} homeostazının düzenlenmesinde önemli bir rol oynamakta ve paratiroid ana hücreleri ile beyin ve plesentada bulunmaktadır. Ca^{+2} reseptörü, serum Ca^{+2} konsantrasyonunu algılamada, paratiroid hormon ve kalsitonin sekresyonu ile kalsiyum transportundan sorumludur (Pineda, 2003).

Kalsiyum ile yakından ilgili olması nedeniyle birlikte ele alınan bir diğir inorganik element fosfordur (P). Ancak inorganik fosfor (Pi), serumda HPO_4^{-2} ve $H_2PO_4^{-}$ şeklinde "fosfat" olarak bulunur (Ersoy ve Bayşu, 1986; Pineda, 2003). Ca^{+2} 'nin alışıl gelmiş karşıt iyonu olan fosfat, kemikteki hidroksiapatit kristali, kalsiyum fosfattan oluşur (Murray ve ark., 2004).

Vücutta bulunan fosfatın yaklaşık %90'ı mineralize olmuş kemik matriksinde $[Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2]$ şeklinde bulunurken %10'u yumuşak dokularda intrasellüler olarak bulunur. Vücuttaki inorganik fosfat ölçülmesine rağmen bulunan sonuç

“elementel fosfor” olarak ifade edilir (P_i). Fosfat; enerji metabolizması, O_2 'nin hücrelere dağılımı, kas kontraksiyonu ve iskeletal bütünlüğü gibi metabolik olaylarda önemli rol oynamaktadır (Pineda, 2003).

Diyetle birlikte alınan fosfatın yaklaşık %60-70'i bir Na/fosfat kotransporter kullanılarak aktif transport ve pasif difüzyon ile barsaklardan absorbe edilir. Diyetle yetersiz fosfat bulunması, net fosfat absorpsiyonunu artırır. Ayrıca 1,25-dihidroksi vitamin D'nin renal üretimindeki artış ve böbreğin adaptasyonu, düşük miktardaki fosfat düzeyini dengeler. Fosfatın renal ekskresyonu, glomerular filtrasyon hızı ve tubular reabsorpsiyonun maksimum hızı ile düzenlenir. Renal fosfat reabsorpsiyonunun büyük bir bölümü böbreğin proksimal kıvrımlı tubüllerinde, az bir kısmı da nefronların distal bölümlerinde gerçekleşir. Renal fosfatın reabsorpsiyon hızı Na^+ 'in olup olmamasına bağlı olup ve ihtiyaca göre düzenlenir. Reabsorpsiyon; büyüme, laktasyon, gebelik ve düşük fosfat içeren diyetlerle artarken, aşırı fosfat alımında reabsorpsiyon azalır. Fosfat reabsorpsiyonu; tubular reabsorpsiyonu azaltarak ya da renal ekskresyonu artırarak düzenleyen başlıca hormon paratiroid hormonudur (Pineda, 2003).

1.2.1. Mineral Ve Kemik Metabolizmasını Düzenleyen Hormonlar

Mineral ve kemik metabolizmasını düzenleyen temel hormonlar; parathormon, kalsitonin ve 1,25-dihidroksivitamin D_3 (veya D_2) dir (Kalaycıoğlu ve ark., 2006).

1.2.1.1. Paratiroid Hormon (PTH)

Paratiroid Hormon (PTH); disülfid bağı içermeyen 84 amino asitlik tek bir polipeptid zinciri olarak salgılanmakta ve pek çok peptid hormon gibi prehormon olarak sentezlenmektedir. Pro-PTH'nin altı aminoasidinin koparılmasıyla PTH oluşur. PTH 1-84 en aktif formudur. Ancak bu hormon periferik dokularda 34. aminoasitten kırılır ve amino ucundan ilk 34 aminoasidi içeren parça biyolojik aktivitenin %75-90'mı korur. Karboksil ucundaki 35-84 parçası ise böbreklerden atılır (Montgomery ve ark., 2000).

Tablo 1.1. Kalsiyum Metabolizmasını Düzenleyen Hormonların Sınıflandırması, Yerleşimi Ve Etkileri (Montgomery ve ark., 2000)

HORMON	HEDEF	ETKİLER	ÖZELLİKLER	İKİNCİL HABERCİ
Paratiroid hormon (PTH)	Böbrek, kemik	Plazma Ca^{+2} unu artırır; PO_4^{-2} nı düşürür	Tek zincirli polipeptit, 84 aminoasit	
Kalsitonin	Kemik osteoklastları	Plazma Ca^{+2} unu düşürür	Tek zincirli polipeptit, 32 aminoasit	↑ cAMP
D vitamin	Gastrointestinal sistem, kemik	Plazma Ca^{+2} unu ve PO_4^{-2} nı artırır;	Steroid benzeri	↑ cAMP nükleer reseptör

Paratiroid hormon memelilerde kan kalsiyumunun en iyi şekilde düzenlenmesinde gerekli başlıca hormondur. Bu hormon biyolojik etkilerini öncelikle kemikte ve böbreklerde hedef hücrelerin plazma membranında lokalize olan reseptörlerle hormon-reseptör kompleksi oluşturarak, ikincil olarak da farklı hücrelerin optimal fonksiyonlarını sürdürmeleri için yeterli düzeyde plazma kalsiyumunun sağlanması için dolaylı olarak bağırsakta etkisini göstermektedir (Pineda, 2003). PTH'un ana hedef dokuları olan böbrek ve kemik dışında pek çok dokuda da PTH için reseptör üretildiği ve etkilerinin dokudan dokuya değişebileceği öne sürülmektedir (McCarty ve Thomas, 2003). Plazma membranında lokalize olan reseptörlerle hormon-reseptör kompleksi oluşturarak etkilerini gösterir (Pineda, 2003; Kalaycıoğlu ve ark., 2006). PTH; plazma kalsiyum düzeylerini artırdığı için, düşük kalsiyum düzeyi (hipokalsemi) ile sentezi uyarılır, yüksek kalsiyum düzeyi (hiperkalsemi) ile inhibe olur. Ayrıca 1,25-dihidroksikolekalsiferol, PTH sentezini inhibe eder. PTH, kemiğe doğrudan etki

ederek rezorpsiyonu ve kemiğin yeniden şekillenmesini artırır (Montgomery ve ark., 2000).

Genel olarak PTH'nun önemli biyolojik etkileri şöyle sıralanabilir:

1. Kanın kalsiyum konsantrasyonunu artırmak
2. Kanın fosfor konsantrasyonunu azaltmak
3. Tubular resorpsiyon hızını azaltarak fosforun üriner ekskresyonunu artırmak
4. Kalsiyumun tubular resorpsiyonunu artırmak
5. Kemik yüzeyinde osteoklastların sayısını ve kemik resorpsiyon net hızını artırmak
6. Hidroksirolinin üriner ekskresyonunu artırmak
7. Hedef hücrelerdeki adenilil siklazı aktive etmek
8. Başlıca aktif vitamin D metabolitin (1,25-dihidroksikolekalsiferol; 1,25-dihidroksivitamin D) oluşumunu hızlandırmak.

PTH, kalsiyumu iskelet rezervlerinden ekstrasellüler sıvıya mobilize eder. Kemiğin paratiroid hormona yanıtı iki fazlıdır. İlk etkiler var olan osteositlerin ve osteoklastların aktivitelerinin artışıyla sonuçlanır. Bu osteosit ve osteoklast hareketliliği kanda kalsiyum konsantrasyonunu iyi bir şekilde ayarlamak için kemikten ekstrasellüler sıvıya hareketini kolaylaştırır (Pineda, 2003). Yağ doku hücrelerinde hücre içi kalsiyum düzeyi yükseldiğinde, hücreye insulinin uyardığı glikoz girişi baskılanmakta ve bu durum hiperparatiroidizmde insuline direnç oluşmasına yol açmaktadır (McCarty ve Thomas, 2003). Bununla birlikte, PTH'un insulinin lipolizisi baskılamadaki etkinliğini engellediğine yönelik yeterli veri bulunmamaktadır. Plazma kalsiyum ve vitamin D düzeyi yükseldiğinde PTH sekresyonu azalmaktadır (Kinyamu ve ark., 1998).

1.2.1.2. Kalsitonin

Kalsitonin hormonu, tiroid bezinin crista neuralis kökenli C hücreleri tarafından üretilir. Kalsitonin 32 aminoasitlik tek bir poli peptid zincirinden oluşmaktadır. Karboksil ucundaki prolin bir amid grubu ile bloke edilmiştir ve biyolojik aktivite

için mutlaka gereklidir. Kemiklerde ve böbreklerde kalsitonine duyarlı özel reseptörler vardır (Montgomery ve ark., 2000).

Kemiklerdeki reseptörlere bağlanan kalsitonin, osteoblast ve osteoklastların kalsiyuma olan geçirgenliğini azaltarak plazma kalsiyum düzeyinin artmasını önler (Yaman, 1999). Kalsitonin sekresyonu özellikle plazma iyonize kalsiyum düzeyleri ile regüle edilir. Artan serum Ca^{+2} düzeyleri ve hiperkalsemi kalsitonin sekresyonunu stimüle ederken, azalan Ca^{+2} düzeyleri ve hipokalsemi redükler. Farmakolojik dozlarda kalsitonin, kalsiyum, fosfat, sodyum, potasyum ve magnezyum renal tubuler reabsorbsiyonunu da azaltarak, serum kalsiyum ve fosfat konsantrasyonunu düşürür (Kalaycıoğlu ve ark., 2006).

Kemik yapımı ve yıkımının hızlı olduğu durumlarda kalsitonin, plazma kalsiyumunu hızla düşürür. Kalsitonin primer hipokalsemik etkisini, osteoklast aktivitesini inhibe ederek ve kemik rezorbsiyonunu önleyerek gösterir. Büyüme ve laktasyon gibi stres durumlarında kalsitoninin kemiği koruduğu düşünülmektedir. Kalsitonin düzeyleri menapozdan sonra düşer ve osteoporoz açığa çıkar. Kalsitoninin osteoklastlar üzerinde olan etkisi, 80 000 dalton ağırlığında bir glikoprotein olan spesifik reseptörü aracılığıyla oluşur. Reseptör adenilat siklaz üzerinden hücre içi cAMP düzeylerini artırarak etki gösterir (Montgomery ve ark., 2000).

PTH ve kalsitoninin (CT) kemik üzerindeki etkileri antagonistiktir fakat fosforun renal tubular reabsorbsiyonunun azaltılmasında aynı yönde etki gösterirler. Kalsitoninin hipokalsemik etkisi; PTH'ın uyardığı kemik reabsorbsiyonunun geçici olarak önlenmesine bağlı olarak iskeletten plazmaya kalsiyum girişinin azalmasının bir sonucudur. Hipofosfatemi; osteoklastik osteolizisin bloke edilmesiyle kemik resorbsiyonunun önlenmesiyle olduğu kadar fosfatın plazmadan yumuşak doku ve kemiğe taşınma hızının artması üzerinde kalsitoninin doğrudan etkisinden kaynaklanmaktadır. Kalsitoninin etkisi vitamin D'ye bağlı olmayıp osteoklastlar kalsitonin için reseptörlere sahiptirler. Kalsitonin ve paratiroid hormon, ekstrasellüler sıvıda kalsiyum konsantrasyonunu belirli sınırlar içerisinde kalmasını

sağlamak için bir negatif feedback mekanizması ile etki gösterirler. Normal şartlar altında paratiroid hormon, kalsiyum kan düzeyini sürekli olarak düzenleyen ve hipokalseminin gelişmesine karşı koruyucu görevleri olan başlıca faktördür.

Kalsitoninin fonksiyonları:

1. “Fizyolojik” hiperkalseminin önlenmesi
2. Hamilelik döneminde anne iskeletinden kalsiyum ve fosforun aşırı kaybını önlemek (Pineda, 2003).

1.2.1.3. Vitamin D

Vitamin D; tarihte raşitizmi önleyen madde olarak bilinir. D vitamininin iki formu vardır; bazı bitkilerde ve ışına maruz bırakılmış mayalarda bulunan D₂ vitamini veya ergokalsiferol ve hayvanlarda ve balık yağında doğal olarak bulunan D₃ vitamini veya kolekalsiferol. Bu iki molekül birbirinden ergokalsiferoldeki 22 ile 23. karbonlar arasındaki çift bağ ile ayrılır. D₂ ve D₃ vitamini inaktiftirler ve karaciğer ve böbrekte meydana gelen iki hidroksilasyonla aktive edilmeleri gerekir. Kolekalsiferolün ilk hidroksilasyonu (25. karbondan) karaciğerde olur ve kolekalsiferol 25-hidroksilaz tarafından katalizlenir. 25-hidroksikalsiferol (25-hidroksivitamin D) kolekalsiferolün sabit bir fraksiyonu gibi durmaktadır. 25-hidroksivitamin D'nin yarı ömrü yaklaşık 15 gündür. Dolayısıyla biyolojik olarak daha aktif olan ancak yarı ömrü yaklaşık 15 saat olan 1,25-dihidroksivitamin D'nin depo formu gibidir. (Montgomery ve ark., 2000).

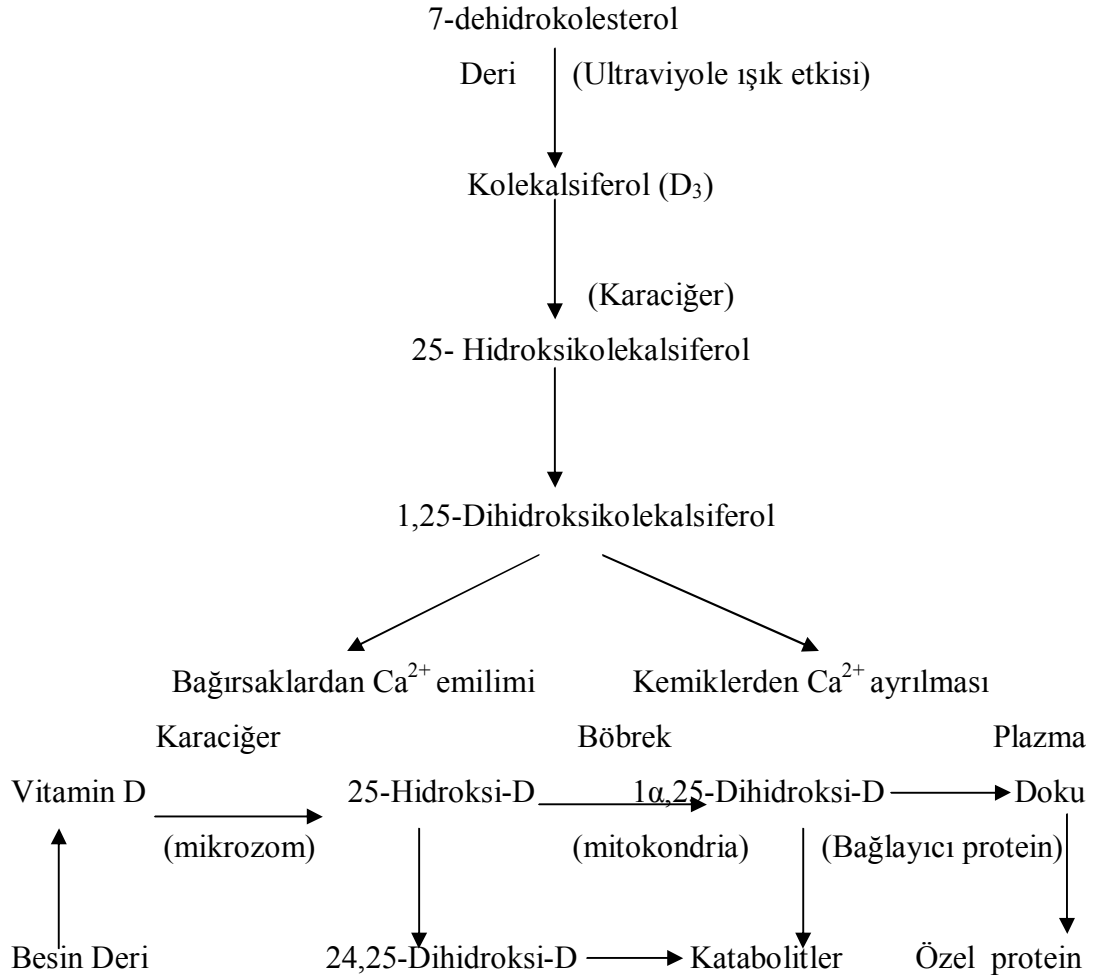
D vitamini metabolizmasının esas aktivasyon basamağı böbreklerde yer alır ve 25-hidroksikalsiferol-1 α -hidroksilaz tarafından katalizlenir. Bu hidroksilasyon sonucu oluşan 1,25-dihidroksikolekalsiferol (1,25-dihidroksivitamin D) D vitamininin en aktif formudur ve bütün etkilerinden sorumludur. Enzim aynı zamanda plazma inorganik fosfat düzeyleri ile de kontrol edilir. Yüksek inorganik fosfat düzeyleri enzim aktivitesini azaltır, düşük fosfat düzeyleri ise uyarır. Plazma kalsiyum düzeyleri bu enzimin aktivitesini doğrudan etkilemez. Ancak diyetdeki kalsiyumun azaltılması veya çoğaltılması 24 saatte dolaylı olarak PTH üzerinden

plazma 1,25-dihidroksivitamin D düzeylerini birkaç kat değiştirir (Montgomery ve ark., 2000).

D vitamini kalsiyum homeostazında majör rol oynar. Vitamin D'nin aktif formu; kemik metabolizmasında, kemik yapısında ve nöyral fonksiyonlarda gerekli olan kalsiyum iyonlarının hücre membranından geçmesinde esas görev alır. Bağırsak mukoza hücrelerinde aktif olan dihidroksi vitamin D nükleusa girip kromatin reseptör ile birleşmeden önce sitozolik reseptör proteine bağlanır ve esas etki DNA polimeraz II enziminin etkilenerek spesifik kalsiyum bağlayıcı proteinin (CaBP) sentez edilmesidir. Vitamin D, Ca^{2+} 'un bağırsaklardan emilmesinde kemiklerden mobilizasyonunda aracılık eder (Kalaycıoğlu ve ark., 2006).

Vitamin D sadece omurgalı hayvanlar için esansiyeldir. Serum ve vücut sıvılarında kalsiyum ve fosfor miktarının artması kemik büyümesine ve kemikleşmeye yardım eder. Bu etki sadece resorpsiyonun iyileştirilmesiyle değil muhtemelen sellüler (mitokondriye bağlı) kalsiyumun serbest hale geçirilmesiyle olur (Bayşu Sözbilir ve Bayşu, 2008). D vitamini ayrıca böbrek tübüler epitelyum hücrelerinden de kalsiyum emilimini artırır ve bu durum böbreklerde fosfor tutulumunu da etkiler. D vitamin PTH ile birlikte kemiğin yeniden şekillendirilmesinde önemli rol oynar. D vitamini olmadığında, plazma kalsiyum düzeyinin düşmesiyle normal kemik mineralizasyonu bozular (Montgomery ve ark., 2000).

Kemikte 1,25 (OH)₂ D ve PTH farmakolojik konsantrasyonlarda kemik reabsorpsiyonunda, Ca^{+2} ve PO_4^{-3} 'ü mobilize ederek kanda bu iyonların artmasına sebep olur. Belki de osteoklastların sayısı ve aktivitesini artırarak kemikte, 25(OH)₂D osteoblastlar tarafından yapılan osteokalsin, bone gla protein (BGP), noncollagenous protein ve dolaşımdaki osteokalsin konsantrasyonunu artırır. Böbreklerde 1,25 (OH)₂ D Ca^{+2} ve PO_4^{-3} reabsorpsiyonunu artırır. Ayrıca 1,25 (OH)₂ D PTH için mRNA sentezini ve PTH sekresyonunu inhibe ederek paratiroidler üzerinde direkt bir etkiye de sahiptir (Kalaycıoğlu ve ark., 2006).



Şekil 1.2. Vitamin D₃'ün Metabolizması ve Fonksiyonu (Kalaycıoğlu ve ark., 2006)

1.2.1.4. Osteokalsin

Kemik oluşumunun biyokimyasal belirteçlerinden birisi de “osteokalsin”dir. Osteokalsin; olgun osteoblastlar, odontoblastlar ve hipertrofik kondrositler tarafından sentezlenen 49 aminoasitten oluşan küçük yapıli kalsiyum bağlayıcı matriks bir protein olup kemik metabolizması sürecinin nispi olarak tayininde kullanılan oldukça spesifik bir kemik belirleyicisidir (Eastell ve ark., 2001; Vigorita ve ark., 2007). Deneysel çalışmalarda osteokalsinin kemik metabolizmasının düzenlenmesinde rol oynadığını görülmüştür. Bu protein γ -karboksiglutamik asidin

(Gla) üç kalıntısı ile karakterize edilir (Eastell ve ark., 2001). Osteokalsinin %20'sini kemik matriksinin kollagen olmayan proteinler oluşturur. Osteokalsin, serbest kalsiyum iyonlarına zayıf bir şekilde bağlanırken kalsiyum ve hidroksiapatit kristallerine güçlü bir şekilde bağlanır (Vigorita ve ark., 2007).

Osteokalsin sentezi mineralizasyon ve osteoblastik farklılaşım ile artarken dolaşımdaki osteoklasinin, kemik matriksinin parçalanmasından değil yeni kemik sentezinden kaynaklanmaktadır. Osteokalsinin glomerular filtrasyon hızı ya da renal katabolizması dolaşımdaki osteokalsin düzeyini etkilemektedir (Eastell ve ark., 2001). Osteokalsin genellikle yaşa bağlı olarak artan kemik değişimi ile artar (Kaneka, 1989).

Osteokalsinin kandaki düzeyinin belirlenmesi;

1. Kadınlarda osteoporoz riskinin belirlenmesi
2. Perimenapoz, postmenapoz dönemlerinde kemik metabolizmasının görüntülenmesi
3. Büyüme eksikliği, hipotiroidizm, hipertiroidizm ve kronik renal yetmezliği olan hastalarda kemik metabolizmasının görüntülenmesi açısından önemlidir (Host- EASIA KAP 1381, Biosource).

1.3. Proteinlerin Kemik Metabolizmasına Etkileri

Kemik hacminin yaklaşık yarısının ve kütlesinin de yaklaşık dörtte birinin proteinden oluşması nedeniyle protein, kemiğin en önemli yapısal bileşenidir. Protein, kemikle ilgili proteinlerin fonksiyonelliği ve iskeletel bütünlük için oldukça önemlidir. Diyetle birlikte alınan protein aynı zamanda iskelet üzerinde birçok olumlu etkiye sahip olan insulin like growth faktör- I (IGF-I) üretimini de etkiler (Promislow ve ark., 2002).

Yapılan araştırmalar fazla miktarda protein tüketildiğinde üriner kalsiyum (Ca) ekskresyonunu arttığı ve fazla miktarda protein alımı ile kırık riski artışı arasında bir ilişki olduğunu göstermektedir. Diğer taraftan özellikle ileri yaşlarda

daha fazla protein tüketiminin kemik kaybını ve kırık riskini azaltarak kemik sağlığına katkı sağlanabileceğini gösteren çalışmalar da bulunmaktadır (Ginty, 2003).

Sülfür içerikli amino asitler, glutasyon sentezi başta olmak üzere infeksiyon, malnütrisyon, kalp hastalıkları veya kanser gibi strese karşı ve peroksidatif korunma için gereklidir. Bu yüzden kalsiyum ekonomisi ve kemik metabolizması üzerinde olumsuz etkileri de olduğu düşünülen sülfür içerikli amino asitler hem genel olarak sağlığın korunmasında hem de bazı patolojik durumlarda olumlu fonksiyonlara sahiptir (Bonjour, 2005). Hegsted ve ark. (1986) farklı kültürler üzerinde yapılan çalışmada diyetle alınan protein miktarındaki artış, kalça kırığı oranında da artışa neden olduğunu belirtirken, Munger ve ark. (1999) düşük miktarda protein alınmasının da yüksek oranda kalça kırığına neden olduğunu gözlemlemiştir (Kerstetter ve ark., 2003).

Sülfür; kalsiyum ve fosfordan sonra vücutta en fazla bulunan elementtir. Bu element özellikle protein içeren diyetlerden sağlanabilir ve proteinlerde bulunan 20 aminoasitten sadece iki tanesi sülfür içerir. Bu aminoasitlerden biri olan methionin vücut tarafından sentez edilemez ve mutlaka diyetle birlikte alınmalıdır. Sülfür içeren diğer aminoasit ise sisteindir. Sülfür içeren amino asit ve organik asitlerin oksidasyonundan sonra açığa çıkan proton ve alkali iyonlar total asit-baz havuzuna katılırlar ve sonuçta böbrek tarafından ekskrete edilirler. Asit ya da alkali üretimi, başta karaciğer olmak üzere diğer metabolik olarak aktif olan hücrelerde oluşur. Örneğin sülfür içeren amino asitlerin üre ya da karbondioksite oksidasyonu sülfürik asidi vermektedir. Diğer taraftan diyetle birlikte alınan sodyum sitrat gibi organik asitlerin alkali tuzları karbondioksit ve suya metabolize olur ve bikarbonatla birlikte katyona dönüşürler. Kandaki sülfürik asit bikarbonat tarafından tamponlanırken sodyum sülfat ve karbonik asit oluşturulur. Karbonik asit akciğer tarafından karbondioksit şeklinde elimine edilir. Nötral bir tuz olan sodyum sülfat böbreğe iletilir ve sodyum, dolaşımdaki bikarbonat havuzunun yenilenmesi için reabsorbe edilir. Bu süreç, distal renal tubular kanaldaki aktif bir hidrojen iyonu sekresyonu tarafından kontrol edilir. Ancak böbrek pH 4.4'den daha asidik bir idrar

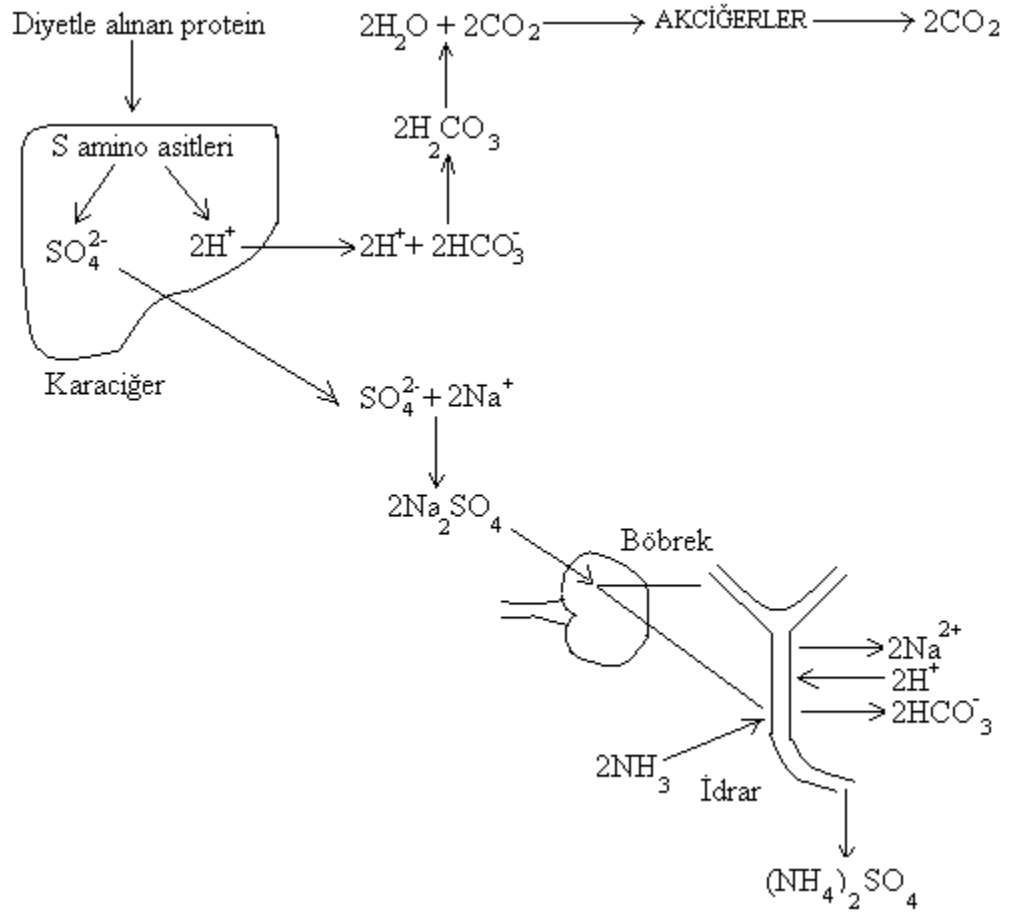
hazırlayamayacağı için hidrojen iyonlarının büyük bir kısmı tamponlanmalıdır. En önemli hidrojen iyonu akseptörü NH_3 'dür (Remer, 2001).

Hücre, yapısı gereği H^+ konsantrasyonundaki değişimlere oldukça duyarlı olup kan ve ekstrasellüler sıvının pH'ı belli sınırlar içerisinde olmalıdır. Kan pH'ı; plazma proteinleri, hemoglobinin histidin kalıntıları ve en önemlisi $\text{CO}_2\text{-HCO}_3^-$ sistemi ile tamponlanır. (Arnett, 2003).

Oksijenlenmiş arteriyel kanın uygun pH aralığı 7.35 ile 7.45 aralığıdır ve karbondioksit yüklü venöz kanın pH aralığı ise 7.31 ile 7.41 aralığındadır. Buna göre kan pH aralığı yaklaşık 7.4 ± 0.5 birimdir. Bu değerlerden küçük bir sapma bile biyolojik olarak önemli değişimlere neden olur. İntrasellüler sitoplazmik pH için uygun aralık 7.4 ± 0.1 'dir. sellüler pH'daki asidik bir eğilim ;

1. Kemik resorpsiyonunu ile bağlantılıdır
2. Kemik oluşumunda azalma
3. Nitrojen atığı (hızlanan katabolizma)
4. Büyüme hormonu ve diğer hipofiz hormonlarının baskılanması gibi etkilerle hücrel metabolizmayı olumsuz etkiler.

Tasarımı ile alkalın olan metabolik proses hergün 70,000 mmol H^+ üretir. (Brown ve Jaffe, 2000). H^+ konsantrasyonunun bu kadar sınırlı bir aralıkta sürdürülmesi için üç özel mekanizma gereklidir: (1) tampon sistemler; (2) CO_2 'in nefesle birlikte verilmesi; (3) böbrek ekskresyonu. Alınan asit miktarı yaşam biçimine bağlı olarak asit içerikli besinlerin tüketilmesiyle değişiklik gösterir. Özellikle hayvansal proteinler ve baklagiller H_3PO_4 ve H_2SO_4 'ün önemli birer kaynağıdır ve "asit-ash" yiyecekler olarak adlandırılırlar (New, 2002).

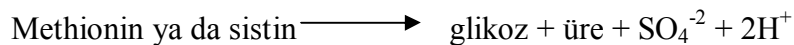


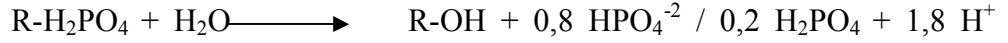
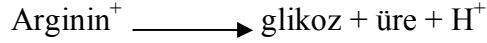
Şekil 1.3. Asitin Hepatik Üretimi, Fiziyojik Tamponlanması ve Renal Ekskresyonu (Ginty, 2003)

Metabolik asidozis; intestinal kalsiyum absorpsiyonunda bir değişim olmaksızın idrar kalsiyum ekskresyonunda önemli bir artışla sonuçlanan ve temel ekstrasellüler tampon bikarbonatın konsantrasyonunda düşmeye neden olan hidrojen iyonundaki bir artıştır (Litzow ve ark., 1967; Lemann ve ark., 1979).

Yüksek oranda protein tüketimine bağlı olarak oluşan metabolik asidozis, aşırı miktarda sülfür amino asitlerinin parçalanmasına bağlı olarak gelişmektedir. Sisteinin katabolizması sonunda her bir mol sülfür içeren amino asitten bir mol SO_4^{2-} ve iki mol H^+ oluşmaktadır (Kalaycıoğlu ve ark., 2006).

Asit oluşumu aşağıdaki reaksiyonlarla gösterilebilir:





(Bushinsky, 2001).

Yüksek düzeydeki endojen asidin tamponlanmasında böbrekler yetersiz kalırsa bu durumu telafi edebilecek “kemik” gibi diğer fizyolojik sistemlere ihtiyaç duyulabilir. Bu durumda kemik, mineral içeriği ve kütlesinde azalmaya neden olan kemik resorpsiyonu ile kalsiyum salınır. Kemik resorpsiyonu, kemik kırığı ve osteoporoz riskini artıran bir faktördür (Hoffman, 2004). Kemik, sodyum ve potasyum için bir rezervuar olup yüzeyi sodyum ve potasyumun hidrojen iyonları ile kompleks oluşturduğu negatif bir yüzeye sahiptir (Bushinsky ve Frick, 2000).

Arnett (2003) tarafında yapılan deneysel çalışmalarda bu hücrelerin pH yaklaşık 7.3 ve üzerinde inaktif, pH yaklaşık 6.9’da maksimum düzeyde stimule oldukları gözlenmiştir. Kemik resorpsiyonu pH yaklaşık 7.1’deyken H^+ konsantrasyonu değişimlerine oldukça hassastır. Bu bölgede 0.05 birimden daha küçük bir değişiklik kemik yüzeyinde boşlukların oluşumunu iki katına çıkarabilir ya da yarıya indirebilir.

S- içeren aminoasitler methionin ve sisteinin H_2SO_4 ’e hepatik oksidasyonu ve buna bağlı olarak kan pH’ının azalması, kemik rezorpsiyonunun artması ve üriner kalsiyum kaybının oluşması yüksek oranda protein tüketimine verilen yanıtta temel mekanizmadır. H^+ ’nin NH_3 ile NH_4^+ oluşturması gibi renal düzeyde proksimal tubular hücreler tarafından NH_3 üretimi asit yüküne karşı önemli bir savunma mekanizmasıdır. Bu katyon daha sonra sülfatla birleşerek $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ oluşturur ve idrarla atılır. Bu şekilde bütün iyonların eliminasyonu sağlanır (Ginty, 2003).

Diyetsel proteinin kemik kalsiyumu üzerinde negatif etki ile ilgili hipotez ilk kez Wachman ve Bernstein (1968) tarafından ortaya atılmıştır Hafif bir asidozisin bile kemik metabolizmasında derin etkileri vardır. Örneğin kemikten günlük olarak sadece 1 mEq asidin eşdeğeri tamponlamaya mobilize olursa, ortalama bir kişide on

yılda toplam vücut kalsiyumunun %15'i kaybolur (Sellmeyer ve ark., 2001). Kerstetter ve ark. (2003), diyetle birlikte alınan protein ve üriner kalsiyum arasında pozitif bir ilişki olduğunu ve diyetle alınan proteindeki her 50 gr'lık artışın 24 saatlik üriner kalsiyum ekskresyonunda yaklaşık 1,6 mmol'lük bir artışa neden olduğunu belirtmişlerdir.

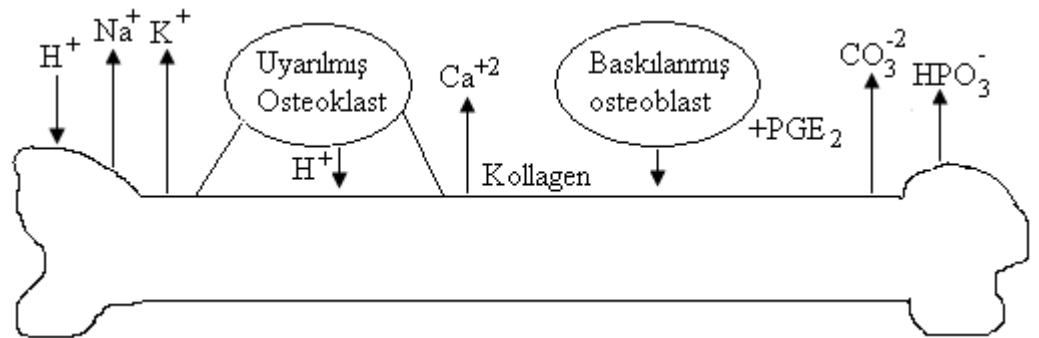
Allen ve ark. (1979) Ca'un tubular reabsorpsiyonundaki azalmanın, renal transport prosesinin doygunluğuna (saturation) dayandığını belirtmişlerdir. Diyetle birlikte alınan proteindeki iki ya da üç katlık bir artış, plazmadaki ultrafiltre olabilen Ca düzeyinde önemli bir değişiklik olmaksızın glomerular filtrasyon hızında (GFR) önemli bir artışa neden olurken fraksiyonel renal tubular reabsorpsiyonunda önemli bir azalma meydana gelir. Alınan protein miktarındaki bir artışa bağlı olarak Ca'un fraksiyonel tubular reabsorpsiyonunda azalmanın mekanizması, diyetteki proteinin "asit-ash" içeriği ile ilgilidir. Proteindeki sülfür içerikli amino asitlerin katabolizmasının bir sonucu olarak oluşan ve çok az absorblanan SO_4^{2-} anyonu ekskresyonundaki artış, kalsiyumun renal tubular reabsorpsiyonunu da azaltır. SO_4^{2-} anyonunun çok az absorblanması nedeniyle Ca'un renal tubular absorblanması da azalır; sonuç olarak Ca'un reabsorpsiyonu, tubuler lumenin elektronegativitesindeki artış ya da filtre edilen filtre edilen Ca yükünün kompleksleşmiş fraksiyonundaki artışla azalabilir (Zemel, 1988).

pH'daki bir azalma sonucu oluşan hidrojen iyonlarının sodyum ve potasyum ile yer değiştirmesiyle sistemik asiditenin indirgenmesi (tamponlanması) sağlanmaktadır. Ekstrasellüler sıvıya baz katılımıyla kemik karbonatı, fosfat ile yer değiştirir. Akut metabolik asidoziste pH'daki bir azalmaya bağlı olarak kemik tarafından hem kalsiyum salınımının hem de protonların tamponlanmasının ve sistemik pH'ın normal sınırlara dönmesinin bir işareti olarak mineral fosfat ve bikarbonatın azaldığı belirtilmektedir. Daha sonrasında da osteoklastik kemik resorpsiyonu uyarılır ve osteoblastik kemik oluşumu baskılanır (Bushinsky, 2001).

Metabolik asidoziste, protonlar tamponlanırken kalsiyum salınımı meydana gelmektedir. Bushinsky ve ark. (1987) kemik mineralinin çözünmesinin incelendiği

deneysel çalışmada oluşumun Gibbs serbest enerjisinin (DG) hesaplanmasıyla kristalizasyon için itici güç hesaplanmıştır. Doğunluğu, pH ya da kalsiyum ve fosfat konsantrasyonu ile değişen ortamda, pH'ın değişmesiyle kemiğe kalsiyum karbonat girişi ya da kemikten kalsiyum çıkışının başlangıçtaki DG ile lineer olarak değiştiği belirlenmiştir. Kalsiyum karbonat, kalsiyum karbonat bakımından doyun olmayan ortamda çözünürken doyunlukta net geçiş durur ve aşırı doyun ortamda kemiğe geçiş yapar. Burada önemli olan ortamın, kemik mineralinin kalsiyum karbonat ile dengede olmasıdır. Asidoziste ne mineral faz bruşiti ne de apatiti ortam ile dengede halindedir. Yapılan bu in vitro gözlemler, akut proton kaynaklı kalsiyum çıkışı ve kemik kalsiyum karbonatının çözünmesine dayanmaktadır (Bushinsky ve ark., 1987).

Yapılan hücre kültürü çalışmalarında asidozisin, mineralize olan hücre yüzeyinde resorpsiyon oluşabilmesi için osteoklastları uyardığı gözlenmiştir ki bu proses hem mineral hem de kollajen organik matriksin taşınımını da içermektedir. Bushinsky ve ark. (1983, 1985, 1987) tarafından yapılan çalışmalarda asidozisin, kemiğe H^+ girişi için kemikten Ca^{+2} 'nin fizyolojik kimyasal bir salınımının gerçekleştiğini gözlemlenmiştir. Asidozis, in vitro olarak ilk aşamada osteoklast membranlarında vaküolar tip H^+ -ATPase'in aktivitesine neden olduğu belirtilmektedir ki bu enzim hidroksiapatitin çözünmesi için osteoklast dışından ekstrasellüler resorpsiyon bölümüne H^+ pompalanmasından sorumludur (Arnett, 2003).



Şekil 1.4. Metabolik Asidozis (Bushinsky, 2001)

Bushinsky ve ark. (1985) tarafından sıçanlar üzerinde yapılan çalışmalarda, osteoblastlar tarafından üretilen kollajen ve diğer matriks bileşenlerinin üretiminin metabolik asidozis tarafından inhibe edildiği belirtilmektedir. Ramp ve ark.(1994) ise düşük pH'da glikolizis, alkalin fosfataz (ALP) aktivitesi ve kollajen üretiminin azaldığı ve osteoblast fonksiyonu için en uygun pH'ın 7.2 olabileceğini belirtmişlerdir. Yapılan bu çalışmada pH'ın düşmesiyle, kemik mineralizasyonundaki bir enzim olan osteoblast ALP aktivitesi de düşmüştür. Asidozisin ilk evrelerinde asidozise karşı oldukça hassas olan ALP için mRNA'yı down-regüle etmiştir. Düşük pH'da, mineralizasyonu önleyici fonksiyonu olan Matrix Gla Protein (MGP) için mRNA up-regüle, olmuştur. Sonuç olarak pH azaldığı zaman hidroksiapatit çözünürlüğünün oldukça arttığı görülmüş ve pH'daki 0.1 birimlik azalma kalsiyum-fosfat çözünürlüğünü 10 kat artırdığı belirlenmiştir (Brandao ve ark. 2005).

Kronik metabolik asidoziste protein sentezi azalır, protein parçalanması artar ve bu durum negatif nitrojen dengesi oluşumuna neden olabilir (Balmer ve ark., 1995). Sıçanlar üzerinde yapılan deneylerde asidozisin yetersiz büyümeye neden olduğu ve iskelet kasında protein parçalanmasında artış meydana getirdiği gözlenmiştir. Metabolik asidozisin proteinleri parçalamasının yanı sıra dallanmış zincir amino asit oksidasyonunu da artırmıştır. Asidozis, hem protein sentezini azaltarak hem de proteolizis ve amino asit oksidasyonunu hızlandırarak azot dengesi üzerinde de etkilidir (Wiederkehr ve Krapf, 2001).

Yüksek düzeyde protein alınmasının, endokrin metabolizması üzerinde insulin ve insulin-like growth factor-1 düzeylerini yükseltmek gibi etkilere sahiptir (Axellsson, 2006).

1.4. Atkestanesi Ağacının Tanıtımı

Atkestanesi olarak bilinen *Aesculum hippocastanum* tüm dünyada görkemli güzelliği ile bilinen bir ağaçtır. Biyolojik adı olan Aesculus, Latince besin anlamına gelen "esca" kelimesinden türemiştir. Ağacın tohumları atın gözlerine benzetildiği

ve atların kırık tedavisinde kullanıldığı için bitkinin genel adı atkestanesidir. Atkestanesinin Latince adı *Aesculum hippocastanum* L. (Hippocastanaceae) dir. Bilimsel literatürdeki diğer taksonomik isimleri; *Aesculus castaneo* Gilib., *A. Procera* Salisb., *Castanea equino*, *Hippocastanum vulgare* Gaertner'dir. (Mahaday, 2001) Atkestanesi Batı Asya'da doğal olarak yetişirken Avrupa ve Amerika Birleşik Devletleri'nde pek çok ülkede park, bahçe ve yol kenarlarında kültürel olarak yetiştirilmektedir (WHO, 2002).

1.4.1. Atkestanesinde Bulunan Bileşikler

Atkestanesi kök, tohum, yaprak ve çiçeklerinin önemli bioaktif kimyasallar içerdiği bilinmektedir. Bunlar başta "aescin" olmak üzere ağaç kabuğunda; kumarin glikoziti olan esculin ve bunu aglikonu olan aesculetin, oksikumarinik glikoziti olan fraksin ve skopolin bunların aglikonu fraksetin ve skopoletin, allantoin ve kuersetin, çiçeklerinde; flavonoid türevleri rutin ve kuersitrin, aescin, kolin ve purin, tohumlarında; nişasta, aescin, protein, yağlar, şeker ve kateşik tanenler yapraklarda; kuersitrin, izokuersitrin, kuersetin adlı flavonoidler ve karotenoidler bulunur (Koçkar, 1989; Sağdıçoğlu, 2000).

Atkestanesi tohumlarından izole edilen, en önemli triterpenoid saponin bileşenlerinden biri olan ve başlıca kimyasal bileşenleri oluşturan "aescin" içermektedir (Mahaday ve ark., 2001). Aescin, atkestanesi ağacı *Aesculus hippocastanum* L. (Hippocastanaceae) ağacının kurutulmuş olgun tohumlarının su ve etil alkol karışımı ile ekstraksiyonundan elde edilir. Aescin, triterpen ester saponinlerinin (30'dan fazla farklı saponinin) kompleks bir karışımından oluşur (Hosstettman ve Marston, 1995). Antienflamatuar, antiödematöz ve kapillar koruyucu özelliğinden dolayı aescin, periferel vasküler bozuklukların tedavisi ile sellülitisten korunma ve tedavisi için kozmetik sahada yaygın olarak kullanılmaktadır (Yoshikawa ve ark., 1994).

1.4.2. Saponinler

Genelde amorf ve renksiz olan, fakat kristal yapıda ve beyaz renkte türleri bulunan saponinler; su, etil alkol, metil alkol gibi polar çözücülerde çözünen moleküllerdir (Fidan ve Dündar, 2007). Saponinler, bir triterpen veya steroid aglikona bir şeker bölümünün eklenmesiyle oluşan yüksek moleküler ağırlıklı “glikozitler” dir (Hosstettman, Marston, 1995). Başka bir deyişle saponinler, asit hidrolizinde bir karbonhidrat kısmı ve bir aglikona parçalanabilen yüzey aktif bileşenlerdir (Belitz ve ark., 2004).



Saponin molekülünün aglikon ya da şeker olmayan kısmı genin ya da sapogenin olarak adlandırılır (Hosstettman, Marston, 1995). Saponinler, polar olmayan aglikonun polar yapıdaki bir ya da daha fazla monosakkaridin birleşmesinden oluşurlar. Bu polar olan ve polar olmayan yapısal elementlerin birleşmesi sulu çözeltide molekülün sabun benzeri davranışını açıklamaktadır (Vincken, 2007). Aglikonun doğasına bağlı olarak saponinleri triterpen saponinler ve steroid saponinler olmak üzere başlıca iki bölüme ayrılır (Oleszek, 2002). Steroidal yapıdaki saponinler, tıbbi bitkilerde ya da sağlık koruma özelliğinden dolayı kullanılan bitkilerde yaygın olarak bulunurken kültürel tarımı yapılan bitkilerde triterpen saponinler daha çoğunluktadır (Francis ve ark, 2002). Triterpenler 30 karbona sahiplerken steroidler ortadaki 30. karbondan üç metil grubunun oksidatif olarak ayrılması sonucu 27 karbondan oluşurlar (Hosstettman ve Marston, 1995).

Bitkisel kaynaklardaki saponinlerin belirlenmesi önceleri gravimetri ya da saponinlerin köpürme ve hemolitik aktivite gibi bazı kimyasal veya biyolojik özelliklerine dayanmaktaydı. Saponinler, kompleks moleküller oldukları için içerisindeki her bir bileşenin izolasyonunda kullanılan en genel yöntemlerden kolon kromatografisi veya TLC'dir. Modern ayırma yöntemlerinden özellikle HPLC,

kapiler elektroforez izomerlerin ayırt edilmesini sağlar (Sahu ve Achari, 2001; Oleszek, 2002). Saponinlerin; alkolsüz içeceklerde emülsifier, şampuan, yangın söndürücü, sabun ve steroid hormonların sentezini içine alan birçok endüstriyel ve ticari alanda kullanılmaktadır (Deshpande, 2002).

Saponinler, hem doğal olarak yetişen hem de kültürel olarak yetiştirilen birçok bitkinin yapısında bulunmaktasır(Naidu, 2000; Yücekutlu ve Bildacı, 2008). Saponin, bitkinin kök, filiz, çiçek ve tohum gibi bitkinin farklı kısımlarında bulunabilir. Saponinler, bitki türlerinde yaklaşık 100 familya ile yaygın olarak bulunmaktadır ancak bunlardan bir kısmının insan ve hayvanlar tarafından besin maddesi olarak kullanıldığı bilinmektedir. Asya bitki familyasının %76'sı saponin içermektedir (Gubanov et al., 1970). Bitkideki saponin konsantrasyonu eser miktardan, *Yucca schidigera* gövdesinde olduğu gibi %10 kuru maddeye kadar değişmektedir. Konsantrasyon bitkinin yetiştiriliş, yaş, fizyolojik durum ve coğrafi konumuna bağlı olarak değişir (Naidu, 2000; Güçlü ve Uyanık, 2004).

Tablo 1.2. Bazı Yiyeceklerdeki Saponin Miktarları (Belitz ve ark. 2004; Güçlü ve Uyanık, 2004; Fidan ve Küçükkurt, 2008)

Yiyecek	Saponin Miktarı (g/kg katı madde)
Bezelye (<i>Pisum sativum</i> spp)	11
Soya fasulyesi (<i>Glycine Max</i> L. Merrill)	43
Yer fıstığı (<i>Arachis hypogaena</i> L.)	6,3
Mercimek (<i>Lens Culinaris</i>)	3,7-4,6
Ispanak (<i>Spinacea oleracea</i> L.)	47
Kuşkonmaz (<i>Asparagus officinalis</i> L.)	15
Yulaf (<i>Avena sativa</i> L.)	1,0
Sarımsak (<i>Allium satium</i> L.)	2,9
Susam Tohumu (<i>Sesamun inducum</i> L.)	3,0
Yeşil fasulye (<i>P. Vulgaris</i>)	13
Nohut (<i>Cicer arietinum</i> L.)	56
Bakla (<i>Vicia faba</i>)	3,5
Pancar (<i>Beta vulgaris</i>)	58

1.4.3. Saponinlerin Biyolojik Etkileri

Son yıllarda saponinler ile saponin bakımından zengin bitkilerin insan sağlığının korunması ile hayvanlarda verim artışının sağlanması üzerine etkilerinin tespit edilmesine yönelik önemli araştırmalar yapılmaktadır. Bu çalışmaların çoğu geleneksel bitkisel ilaçların içerisinde saponinin araştırılmasını kapsamakta ve farmasötik ajanlar olarak saponinlerin potansiyel rolü üzerine odaklanmaktadır (Oleszek ve Marston, 2000). Saponinler biyolojik olarak bütün saponinlerin az veya çok gösterdiği genel etkiler yanında sadece bazı saponinler tarafından gösterilen özel etkilere de sahiptirler. Sahip oldukları bu etkiler nedeniyle saponinler, birçok farmakolojik özelliklere sahip olup fitoterapi ve kozmetik sanyinde kullanılmaktadır. Örneğin ginseng kökü (*Panax ginseng* C. A. Meyer, Araliaceae) eskiden beri geleneksel doğu ilaçlarının en önemlileri arasında yer alırken günümüzde tüm dünyada kullanılmaktadır (Sparg ve ark., 2004).

Saponinlerin önemli biyolojik aktiviteleri arasında hücre membran geçirgenliğini etkilemesi ve lipidler özellikle de kolesterolle etkileşimlerinin bir sonucu olarak hemolitik özellik göstermesi belirtilmektedir (Fidan ve Dündar, 2007). Saponinlerin hemolitik etkisi uzun süredir bilinmekte ve bitkilerin içerdiği saponin miktarının belirlenmesinde kullanılmaktadır (Sugano, 2005). Saponinlerin biyolojik aktivitelerini etkileyen faktörlerden birisi şeker yan zinciri olup yan zincirin sayısı hem hemolitik hem de membran geçirgenliğini etkilemektedir. Bugüne kadar 400'den fazla yapısı belirlenmiş saponinin hem aglikan hem de glikan kısımlarındaki farklılıklar nedeniyle hücre membranı ile etkileşimler de farklıdır. Saponinlerin, membranın yapısal bütünlüğünü bozucu etkisi bunların kolesterolle kompleks oluşturma özelliğinden kaynaklanmaktadır. Saponinlerdeki şeker yan zinciri sayısı hem hemolitik aktiviteyi hem de geçirgenliği etkilemektedir. Saponinlerde şeker yan zincirlerinin sayısının artmasıyla kalsiyum iyonları için membran geçirgenliğinin arttığı gözlemlenmiştir (Bachran ve ark., 2006).

Saponin içeren bitkiler ilave edilmiş diyetlerle beslenmeye bağlı olarak, plazma kolesterol düzeyinin azaldığı ve sonuç olarak daha düşük kardiyovasküler hastalık riskine dikkat çekilmektedir (Fidan ve Dündar, 2007). Bu etki, saponinlerin kolesterol ya da safra asitlerinin ince bağırsaktan emilimlerinin azaltılmasına bağlanmaktadır (Deshpande, 2002). Saponinler; kolesterol ve safra asitleri ile bir misel oluşturarak sindirim kanalından emilimi düşürmektedir. Nitekim diyete ilave edilen saponinin tavuk, tavşan, sıçan, fare ve maymunlarda plazma kolesterol düzeyini düşürdüğü ifade edilmektedir (Fidan ve Dündar, 2007). Ayrıca saponinlerin bağırsak hücrelerinin dökülmesine yol açan membranolitik etkisi nedeniyle hücre membranlarının ve kolesterol kaybının artmasına sebep olduğu da ifade edilmektedir. Sitotoksik etkiye sahip olan sekonder safra asitleri, primer safra asitlerinin mikrobiyel metabolizması sonucu oluşmaktadır. Saponinler, primer safra asitlerini bağlayarak sekonder safra asitlerinin oluşumunu engelleyerek kolon kanseri riskinin önlenmesinde saponinlerin önem taşıyabileceği ileri sürülmektedir (Güçlü ve Uyanık, 2004).

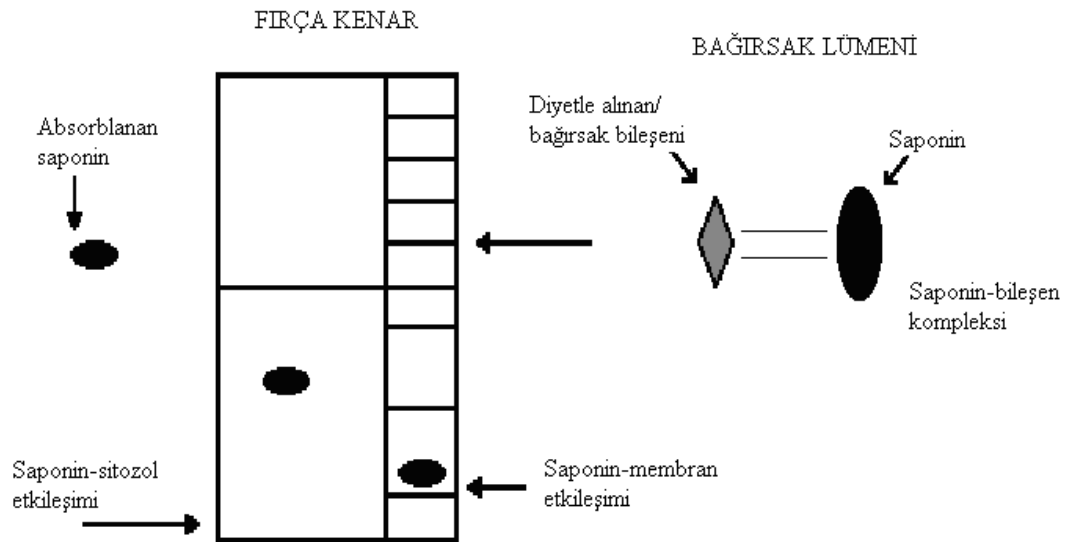
Saponinlerin antimikrobiyel özelliğe de sahip olduğu ve bitkilerde var olan saponinlerin bitkiyi fungal ataklara karşı koruduğu kaydedilmektedir (Hosstettman ve Marston, 1995). Nitekim *Panax notoginseng* (Burk.) F. H. Chen (Araliaceae)'den izole edilen saponinler *Aphanomyces cochlioides zoospor*'un motilitesi üzerinde önleyici etki göstermiştir (Sparg ve ark. 2004). Benzer şekilde, sarmaşıktan elde edilen Hederecoside saponinlerinin bir karışımı Gram-pozitif bakterilere karşı (*Basillus* spp., *Staphylococcus* spp., *Enterococcus* spp., *Streptococcus* spp.) ve Gram-negatif bakterilere karşı (*Salmonella* spp., *Shigella* spp., *Pseudomonas* spp., *Esherichia coli*, *Proteus vulgaris*) antibakteriyel aktivite gösterdiği tespit edilmiştir (Escop, 2003).

Saponinlerin antienflamatuvar ve antiödemik etkilerinin olduğu ileri sürülmektedir (Fidan ve Dündar, 2007). Atkestanesinde elde edilen saponin karışımı aescin parenteral uygulandığında, sıçanların pençesindeki ödemin azalmasında rutin olarak kullanılan ilaçlardan 600 kat daha etkili olduğu gözlenmiştir (Hosstettman ve Marston, 1995). Çeşitli bitkilerden elde edilen

saponin ekstraktlarının hipertansif sıçanlarda kalp atım sayısını ve arteriyel kan basıncını önemli düzeyde azalttığı gözlenmiştir. Saponinlerin kan basıncını düşürücü bu etkisinin diürece yol açması, NO üretimini stimüle edilmesi ve anjiyotensin converting enzimini inhibisyonu ile açıklanmaktadır (Küçükkurt ve Fidan, 2008).

Saponinlerin emilimleri düşük olması nedeniyle etkilerini daha çok sindirim kanalında göstermekte ve diyetle alınan besin maddelerinin sindirimini ve emilimini değişik yollarla etkilemektedir. Saponinlerin biyolojik aktiviteleri:

1. Sindirilen diğer bileşenlerle kimyasal ve fiziksel olarak etkileşime girebilme,
2. Sindirim kanalı mukozal hücre membranında geçirgenliğin değişmesine ya da membrana bağlı enzimlerin aktivitesinin ortadan kalkmasına yol açabilme,
3. Uzun süre alınmasına bağlı olarak gastrointestinal sistemin fizyolojisi üzerinde trofik etkilere neden olabilme gibi etkilerine atfedilmektedir (Cheeke, 1998).



Şekil 1.5. Saponin Etkileri (Hosstettman ve Marston, 1995)

Saponinlerin, ince bağırsakta büyük ölçüde emilmediği ancak kolonik mikroflora tarafından değişikliğe uğratıldığı ve bu değişiklik sonucu meydana gelen metabolitlerin bioaktivitesinin orijinal saponinlerinkinden daha yüksek olduğu ifade edilmektedir (Gurfinkel ve Rao, 2003). Nitekim Ginseng saponinlerinin intestinal metabolitinde gözlenen antikarsinojenik etkinin, orijinal saponinlerde gözlenmediği belirtilmektedir (Oleszek ve Marston, 2000).

1.4.4. Saponinlerin Protein Metabolizmasına Etkisi

Çok sayıda gıda ve beslenme materyali hem saponinleri hem de proteinleri içermekte ve bunlar arasında meydana gelen etkileşimler nedeniyle bir diyetin besin değeri etkilenebilmektedir. Saponinler proteinlerin sindirilebilirliğini, kısmen sindirilebilen saponin-protein kompleksleri oluşturarak değiştirebilmektedir (Francis ve ark., 2002). Soya ve Quillaja saponinlerinin proteinlerle birleştiği ve yüksek sıcaklıklarda (78 °C) yüksek molekül ağırlıklı kompleksler oluşturduğu *in vitro* olarak gözlemlenmiştir (Oleszek ve Marston, 2000; Francis ve ark., 2002). Proteinin serbest amino grupları ile saponin arasında görülen reaksiyonun bir şeker ve bir protein arasındaki reaksiyondan (Millard reaksiyonu gibi) çok daha kompleks olduğu öne sürülmektedir (Oleszek ve Marston, 2000).

Sığır serum albuminin ısı stabilitesi soya saponinin ilavesiyle elektrostatik ve hidrofobik etkileşimlere bağlı olarak arttığı, sığır serum albumin-soyasaponin kompleksinin sindirilebilirliğinin serbest serum albumininkinden daha düşük olduğu ve dolayısıyla saponinli kompleksin proteinin hidrolizini azaltıcı bir etkiye sahip olduğu ifade edilmektedir (Francis ve ark., 2002). Kazein içeren diyetle saponin eklendiğinde görülen hipokolesterolemik etkinin bu durumun bir sonucu olduğu ileri sürülmektedir (Oleszek ve Marston, 2000). Shimoyamada ve ark. (2000)'nın soya saponinlerinin süt proteinlerinin triptik ve kimotriptik hidrolizleri üzerindeki etkilerini inceledikleri çalışmalarında; soya saponinlerinin, sığır serum albumini (BSA) ile etkileşerek hem tripsin hem de kimotripsine daha duyarlı hale getirdiğini buna karşın, BSA-soyasaponin kompleksinin hidrolizatından oluşan N-

terminal 26 kDA peptid kısmının α -kimotripsine hassasiyetinin düşük olduğunu tespit etmişlerdir.

Saponinlerin amonyak bağlama özelliğinden dolayı (Wallace ve ark., 1994), çiftlik hayvanlarında çevreye verilen amonyağın ve kokunun kontrolü amacıyla kullanılmaktadır. Yapılan deneysel çalışmaların sonuçlarına göre; *Yucca schidigera* (YE) ekstraktının amonyak bağlama kapasitesinin her bir ml ekstrakt için 2 μ mol amonyak şeklinde olduğu belirlenmiştir (Cheeke, 2000). *In vitro* 60 ppm saponin içeren inkübasyon ortamında amonyak konsantrasyonunun %15 azaldığı tespit edilmiştir (Hussain ve Cheeke, 1995). Benzer şekilde, kedi ve köpeklerin diyetine yucca ekstraktı (YE) ilave edildiğinde, dışkı ile yayılan kokunun azaldığı kaydedilmektedir (Fidan ve Dündar, 2007). Killen et al. (1998), YE sığanlara verildiğinde saponinlerin proteinlerin mikrobiyal fermentasyonunu önlemesi nedeniyle bağırsaklardaki indol (protein bozunmasından açığa çıkan koku) düzeyini önemli ölçüde azalttığını belirtmişlerdir.

Geviş getiren hayvanların rumeninde meydana gelen azot metabolizmasından daha fazla yararlanmak için saponinler ve saponin içeren bitkilerden yararlanılması üzerine çalışmalar yapılmaktadır (Hristov ve ark., 1998; Eryavuz ve Dehority, 2004; Selçuk, 2005). Nitekim saponin içeren *Yucca* ekstraktının (YE) serum üre ve amonyağı azalttığı gösterilmiştir (Hussain ve Cheeke, 1995, Hussain ve ark., 1996).

2. GEREÇ ve YÖNTEM

2.1. Gereç

2.1.1. Bitki Ekstresinin Hazırlanması

Çalışmada kullanılan Atkestanesi (*Aesculus hippocastanum L.*), Uşak Orman İşletme Müdürlüğü bahçesinden temin edilmiş ve Uşak Üniversitesi Eğitim Fakültesi Öğretim Üyesi biyolog Yard. Doç Dr. Mehtap Dönmez Şahin tarafından teşhis edildi. Gölge ortamda kurutulan bitkinin ekstraksiyon işlemi, “United States Patent- 3,609,137” numaralı “Process for the production of an aescin rich concentrate of active material from Horse-chestnut seeds” patente göre yapıldı. Bitkinin ekstraksiyonunda küçük parçalar haline getirilen atkestanesi meyvelerinin içermiş olduğu yağ gidermek amacıyla önce %2’lik asetik asit çözeltisi ile 1,5 saat daha sonra süzülerek ayrılan bitki kısmı %50 etil alkol – su çözücü sistemi kullanılarak oda sıcaklığında ve karıştırmalı ekstre edildi. Elde edilen sulu ekstrakt vakum altında konsantre edilerek toz hale getirilmiştir. Elde edilen bu ekstraktın içermiş olduğu etken madde miktarı Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalı tarafından HPLC yöntemiyle belirlendi.

2.1. 2. Deney Hayvanı

Araştırmada Isparta Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Laboratuvarı’ndan temin edilen deneysel amaçlı 2-3 aylık 173-287 g ağırlığında 50 adet erkek Sprague-Dawley sıçan kullanıldı. Hayvanların seçiminde sağlıklı ve başka bir çalışmada kullanılmamış olmalarına özen gösterildi. Araştırma Afyon Kocatepe Üniversitesi Hayvan Etik Kurulunun 15.04.2008 tarih, B.30.2.AKÜ.0.8Z.00.00/182 sayı ve AKÜHEK-26-08 referans numaralı onayı doğrultusunda gerçekleştirildi. Sıçanlar Deney Hayvanları Araştırma ve Uygulama Merkezinde barındırıldı. Her bir grupta 10 adet sıçan bulunacak şekilde biri kontrol, dördü deneme olmak üzere toplam 5 gruba ayrıldı. Gruplar birbirleriyle temas kuramayacak şekilde altı adet bölmeye her bir bölmede 10 adet sıçan olmak üzere

yerleştirildi. Deney hayvanları 7 günlük diyete alıştırma dönemini takiben, 30 gün kendilerine tahsis edilen yemle beslendiler. Yemleme gün içinde saat 09:00 ile 19:00 da olmak üzere iki kez yapıldı. Sıçanlar deneme boyunca normal oda sıcaklığında ve 12 saat aydınlık, 12 saat karanlık olacak Şekilde barındırıldı.

Araştırmada kullanılacak kontrol ve deneme grubunu oluşturan hayvanlar araştırma süresince içeriği Afyon Kocatepe Üniversitesi Veteriner Fakültesi Hayvan Besleme Anabilim Dalı tarafından belirlenen ve içerikleri Tablo 2.1’de verilen standart sıçan yemi ve standart yeme göre daha yüksek oranda kazein içeren (Tatar, 2003) yüksek protein diyeti ile beslendiler. Deneme boyunca sıçanlara atkestanesi ekstresi, 100 mg/kg/gün esas alınarak 20 ml %50 etil alkol-su çözücü sisteminde çözülerek gastrik gavaj yolu ile verildi.

I. Kontrol Grubu (K): Standart sıçan yemi + içme suyu

II. Yüksek Protein Grubu (YP): Yüksek protein içeren sıçan yemi + içme suyu

III. Yüksek Protein ve Atkestanesi Ekstresi Grubu (YP + AK): Yüksek protein içeren sıçan yemi + 20 ml %50 etil alkol-su çözücü sisteminde zlen atkestanesi ekstresi (gastrik gavajla) + içme suyu

IV. Atkestanesi Ekstresi Grubu (AK): Standart sıçan yemi + 20 ml %50 etil alkol-su çözücü sisteminde zlen atkestanesi ekstresi (gastrik gavajla)+ içme suyu

V. Etil Alkol Grubu (EA): Standart sıçan yemi + 20 ml %50 etil alkol-su çözücü sistemi (gastrik gavajla) + içme suyu

Tablo 2.1. Araştırmada Kullanılan Standart ve Yüksek Protein İçeren Sıçan Yeminin Analiz Sonuçları ve Katkı Maddeleri ((%)

	Standart Sıçan Yemi	Yüksek Protein İçeren Sıçan Yemi
Bitkisel yağ	3	3
Melas	1,5	1,5
Mısır, sarı	55	34
Et-kemik unu, %34 Ham Protein	2	0
Soya küspesi, %46	19,19	26,95
Soya tam yağlı	17,64	10
Dikalsiyum fosfat	1,3	0,4
DL- Methionin	0,26	0
Kireç taşı	0,75	1,5
L-Lizin hidroklorid	0,26	0
Sodyumbikarbonat	0,20	0,25
Tuz	0,1	0,1
Vitamin-mineral karması	0,3	0,3
Kimyasal analiz		
Kuru Madde,%	89,3	90
Ham Protein,%	20,0	40,2
Metabolik Enerji, kcal/kg	3062	3062
Kalsiyum, %	0,93	0,90
Kul. P, %	0,45	0,43

2.1.3. Teknik Aletler

HPLC (Agilent 1100 Serisi)

Mikropleyt okuyucu (Multiscan Spectrum. Thermo Labssystem.),

Spektrofotometre (Shimadzu. UV-1601), Roche / Hitachi 917/ ACN 714

Soğutmalı santrifuj (Nüve. NF 1000 R.)

Hassas Terazı (Precisa. 205 ASC. 0,0001 g'a duyarlı)

Vorteks (Nüve. NM 110)

pH Metre (WTW. pH 330)

Manyetik Karıştırıcı (Nüve. HP 221)

Shaker (Nüve. SC 350)

Buz Dolabı/Derin Dondurucu (Siemens)

Multi Kanallı Otomatik Pipet (Socorex)
 Ayarlanabilir Otomotik Pipetler 0,5-10µl, 10-100µl, 100-1000µl (Socorex)
 Lityum-Heparinli Tüp
 Farklı boyutlarda deney tüpü, balon joje ve beher glas (Isolab)
 Mikropleyt (96 kuyucuklu)
 Steril Polietilen Enjektör (5-10 cc.'lik)
 Cerrahi makas, pens, doku tutucular
 Cerrahi eldiven

2.1.4. Kimyasal Maddeler

Osteokalsin kiti (Biosource, Kat. No: Kap.1381)
 Kalsitonin kiti (Biosource, Kat. No: Kap.0421)
 Paratiroid hormon kiti (DRG- PTH Intact, EIA-3645)
 Vitamin D kiti (Immun Diagnostik, 25-OH Vitamin EIA)
 Total protein kiti (Chema Diagnostica, Italy. Kat. No: TP500CH),
 Üre-N kiti (BioSystems, Spain. Kat. No: 11536),
 Glikoz kiti (Chema Diagnostica, Italy. Kat. No: GLF400CH),

2.2. Yöntem

2.2.1. Kan Örneklerinin Alınması

Bir aylık deneme süresi sonunda, bir gece öncesinden yem verilmeyen hayvanlar 10 mg/kg ksilazin ve 50 mg/kg Ketamin HCl enjeksiyonu ile anestezi altına alındı. Daha sonra tekniğine uygun olarak göğüs kafesleri açıldı. Çalışır durumda iken kalpten 5ml'lik enjektörlerle heparinli ve heparinsiz tüplere ortalama 6-9 ml kan alınarak tüpler soğuk zincir altında zaman kaybetmeden laboratuvara getirildi. Heparinli kan örneklerinin Nüve NF 1000 R model santrifüj cihazı ile 3500 rpm'de 10 dk. Santrifüj edilerek plazmaları ayrılmıştır. Plazmalar 1,5 ml'lik ependorf tüplere alınarak, biyokimyasal parametreler inceleninceye kadar -30°C'de derin dondurucuda saklanmıştır. Heparinsiz tüplere alınan kan örnekleri de oda

sıcaklığında bekletildikten sonra santrifüj edilerek tüpün üstünde toplanan berrak serum numunesi endorff tüplere aktarıldı (Bayşu Sözbilir ve Bayşu, 2008). Serumda kalsiyum, fosfor ve alkalin fosfataz düzeyleri belirtilen yöntemlerle aynı gün Afyon Kocatepe Üniversitesi Araştırma ve Uygulama Hastanesi Biyokimya Anabilimdalı laboratuvarında tayin edildi. Plazma örneklerinde; PTH, kalsitonin, D vitamini, osteokalsin , protein, üre azotu ve glikoz analizleri yapıldı.

2.2.2. Kalsiyum Tayini

Kolorimetrik yöntem uygulandı.

Prensibi: Kalsiyum+o-kresolftalein kompleksonalkalin çözelti → kalsiyum-o-kresolftalein kompleksi

Oluşan mor kompleksin renk yoğunluğu kalsiyum konsantrasyonu ile doğru orantılıdır ve fotometrik olarak ölçüldü.

R1: Etil alkolamin tampon: 1 mol/L, pH 10.6

R2: o-kresolftalein komplekson : 0.3 mmol/L; 8-hidroksiquinolin: 13.8 mmol/L; hidroklorik asit:122 mmol/L

1. Örnek ve R1'in (tampon) ilavesi
2. R2'nin (kromogen) ilavesi ve reaksiyonun başlaması

Sonuçlar mg/dl biriminde hesaplandı.

2.2.3. Paratiroid Hormon (PTH) Tayini

Prensibi: Özgül antijen-antikor bağlanmasının antikorlara horseradish peroksidaz gibi bir enzim bağlanmasive bu enzim substratınınrenkli ürünlere dönüştürülmesi suretiyle gösterilmesi esasına dayalı immünokimyasal ölçüm tekniğine dayanan ELISA yöntemi kullanıldı.

DRG Intact PTH Immunassay, PTH'ın biyolojik olarak bozulmamış 84 amino asit zincirinin ölçümü için kullanılan bir ELISA testi olup PTH molekülü üzerinde çok iyi belirlenmiş bölgeler için spesifik olabilen iki farklı poliklonal antikor afinite kromatografisi ile saflaştırılmıştır. Birinci antikor sadece orta

bölgeye ve C- terminal PTH 39-84'e bağlanması için hazırlanmıştır ve bu antikor biotinlenmiştir. Diğer antikor ise sadece N-terminal PTH 1-34'e bağlanması içindir ve bu antikor tespit için hoseradish peroksidasyon (HRP) ile işaretlenmiştir. Streptavidin Well- biyotinlenmiş Anti- PTH (39-84) bozulmamış PTH-Anti-PTH (1-34) ile konjuge HRP orta bölge ve C-terminal kısımları biotinlenmiş anti-PTH (39-84) tarafından kuşatılmış olmasına rağmen sadece bozulmamış PTH (1-84) analiz için gerekli sandwich kompleksini oluşturur.

1. Kalibratörler, kontroller ve örnekler Streptavidin ile kaplanmış mikroplyette enzim işaretli antikor ve bir biotin ile birleşmiş antikor ile eşzamanlı olarak inkübe edildi.
2. İnkübasyonun sonunda bağlı olmayan bileşenler yıkanarak uzaklaştırıldı ve sabit faza bağlı enzim substrat olarak kullanılan tetrametilbenzidin (TMB) ile inkübe edildi.
3. Asidik bir reaksiyon sonlandırıcı çözelti ilavesiyle reaksiyon sonlandırılırken renk sarıya döner. Sarı rengin şiddeti örnekteki PTH'nin konsantrasyonu ile doğru orantılıdır. Kalibratörlerden elde edilen sonuçlar kullanılarak konsantrasyona karşılık gelen absorbans eğrisi oluşturulur (450 nm dalga boyu). Örnekteki PTH konsantrasyonu bu eğriden belirlendi.

2.2.4. 25-Hidroksi Vitamin D (25-OH Vit D) Tayini

Prensibi: 25-OH Vit D belirleyici ile birlikte örnekte bulunan 25-OH Vit D'nin yarışmasıdır. Bütün bu süreçte 25-OH Vit D, vitamin D bağlayan proteine (vitamin binding protein-VDBP) bağlanır.

1. İlk inkübasyon aşamasında örnek, standartlar, kontrol, VDBP, ve VDBP- antikor, bu protein için özel bir antikor sabit faza ilave edildi.
2. Örnekte bulunan 25-OH Vit D, bağlayıcı proteinin spesifik bağlanması için mikroplyet üzerinde bulunan belirleyici ile yarışır ve VDBP-Antikoru, VDBP'e bağlanır. Örnekteki 25-OH Vit D konsantrasyonunun artmasıyla bağlayıcı protein miktarı azalır.

3. Yıkama aşamasında bağlı olmayan bileşenler uzaklaştırıldıktan sonra VDBP miktar tayini, enzim substratı olarak, TMB'nin (tetrametilbenzidin) kullanıldığı spesifik peroksidaz işaretli antikorun kullanılmasıyla inkübasyon sonunda gerçekleştirildi.
4. Asidik bir reaksiyon sonlandırıcı reaktifin ilavesiyle reaksiyon sonlandırılır. Oluşan sarı rengin şiddeti örnekteki 25-OH Vit D'nin konsantrasyonu ile ters orantılıdır (450 nm dalga boyu). Kalibratörlerden elde edilen sonuçlar kullanılarak konsantrasyona karşılık gelen absorbans eğrisi oluşturulur. Örnekteki 25-OH Vit D konsantrasyonu bu eğriden belirlendi.

2.2.5. Kalsitonin Tayini

Prensibi: Bu yöntem sandwich ELISA tekniğine dayanmaktadır. Sırasıyla;

1. Kalibratörler ve örnekler mikropleyt üzerinde kaplı bulunan monoklonal antikor (MAb1) ve horseradish peroksidaz (HRP) ile işaretlenmiş bir monoklonal antikor (MAb2) ile reaksiyona girer.
2. İnkübasyon süresini takiben, MAb1, human CT (kalsitonin), MAb2-HRP şeklinde bir sandwich oluşur.
3. Bağlı olmayan bileşenler uzaklaşmaya kadar yıkama işlemi yapılır.

Enzim işaretli bağlı antikor, kromojenik bir reaksiyonla belirlendi. Kromojenik çözeltinin ilavesinden sonra inkübe edildi. Stop çözeltisinin ilavesiyle reaksiyon sonlandırılarak mikropleyt uygun dalga boyunda okundu. Substrat dönüşüm miktarı kalsitonin konsantrasyonu ile orantılı absorbans ölçümü ile kolorimetrik olarak belirlendi (450 nm dalga boyu).

2.2.6. Osteokalsin Tayini

Prensibi: Bu yöntem sandwich ELISA tekniğine dayanmaktadır. Deney, monoklonal antikorların (MAbs), insan osteokalsin epitoplarna yönlendirilmesiyle gerçekleştirilir.

1. Kalibratör ve örneklerdeki osteokalsin, mikropleyt üzerinde bulunan monoklonal antikor (MAb1) ve horseradish peroksidaz (HRP) ile işaretlenmiş bir monoklonal antikor (MAb2) ile reaksiyona girdi.
2. İnkübasyon süresini takiben “ MAb1, human osteokalsin, MAb2-HRP” şeklinde bir sandwich oluştu.
3. Bağlı olmayan bileşenler uzaklaşınca kadar yıkama işlemi yapıldı.
4. Bağlanmış haldeki enzim işaretli antikor, kromojenik bir reaksiyon yardımı ile ölçülür. Bunun için kromojenik bir çözelti ilave edildikten sonra inkübe edildi. Stop çözeltisinin ilavesi ile reaksiyon sonlandırılarak uygun dalga boyunda (450 nm) okuma yapıldı.
5. Substrat dönüşüm miktarı, osteokalsin konsantrasyonu ile orantılı olan absorbansın ölçülmesiyle kolorimetrik olarak belirlendi. Hazırlanan kalibrasyon eğrisinden örnekteki osteokalsin konsantrasyonu interpolasyonla belirlendi.

2.2.7. İnorganik Fosfor Tayini

Prensibi: İnorganik fosfat, ortamda H₂SO₄ bulunması halinde amonyum molibdat ile formülü (NH₄)₃[PO₄(MoO₃)₁₂] olan fosfomolibdat kompleksi oluşturur. Oluşan mavi renk aynı işleme tabi tutulmuş standart fosfat çözeltisi ile karşılaştırılır. Kompleks fotometrik olarak ultraviyole bölgede (340 nm) belirlenir.

R1: Sülfürik asit: 0.36 mol/L; deterjan

R2: Amonyum molibdat:3.5 mmol/L; sülfürik asit: 0.36 mol/L; sodyum klorür: 150 mmol/L

1. Örnek ve R1'in ilave edildi
2. R2'nin ilave edilerek reaksiyon başlatıldı.

2.2.8. Alkalen Fosfataz (ALP) Tayini

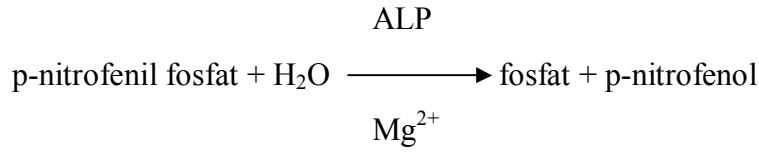
Prensibi: Ortamda magnezyum ve çinko iyonlarının bulunması halinde p-nitrofenilfosfat, fosfatazlar tarafından fosfat ve p-nitrofenol oluşturmak üzere

hidrolize olur. Oluşan p-nitrofenol, ALP aktivitesi ile doğru orantılıdır ve fotometrik olarak ölçülür.

R1: Dietil alkoldiamin tampon: 1.02 mol/L, pH 9.8

R2: Dietil alkolamin tampon: 1.02 mol/L, pH 9.8; magnezyum klorür: 0.51 mmol/L; p-nitrofenil fosfat: 61 mmol/L

1. Örnek ve R1'in (tampon) ilavesi
2. R2 (tampon/substrat)'ın ilavesi ve reaksiyonun başlaması



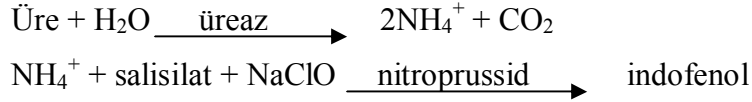
Ortamda magnezyum ve çinko iyonlarının bulunması halinde p-nitrofenil fosfat fosfatazlar tarafından fosfat ve p-nitrofenol oluşturmak üzere hidrolize oldu. Oluşan p-nitrofenol ALP aktivitesi ile orantılıdır ve fotometrik olarak ölçüldü.

2.2.9. Total Protein Tayini

Prensibi: Proteinlerin yapısındaki peptid bağları, alkalın çözeltide 520-560 nm.'de absorbansı okunan mavi-mor kompleks oluşturmak üzere Cu(II) ile reaksiyona girerler. Her bir Cu(II), 6 peptid bağla kompleks oluşturabilir. Tartarat tuzu bir stabilizatördür ve iyodid iyonları alkalın kuprik kompleksin kendi kendine redüksiyonunu önlemek için ilave edildi. Hazırlanan örnekler 540 nm'de spektrofotometrik yöntemle ölçülmüştür. Sonuçlar g/dl olarak hesaplanmıştır.

2.2.10. ÜRE AZOTU TAYİNİ

Prensibi: Yöntem kandaki proteinlerin deproteinize edildikten sonra üreaz enzimi ile ürenin parçalanması esasına dayanır. Analiz örneği içerisindeki üre aşağıda gösterilen reaksiyon çifti yardımıyla spektrofotometrede ölçülebilen renkli bir kompleks oluşturdu.



2.2.11. GLİKOZ TAYİNİ

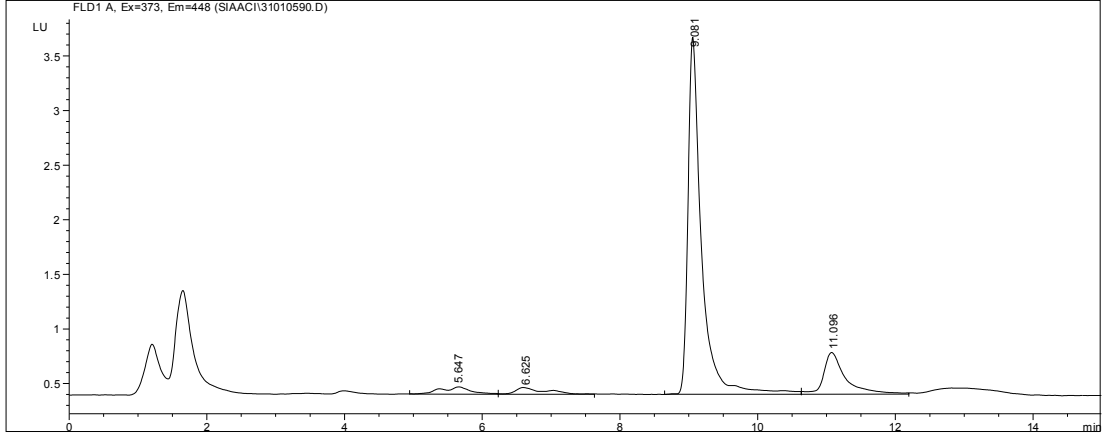
Prensibi: Glikoz oksidaz enzimi, glikozun glukonik asit ve H₂O₂'e oksidasyonunu katalize eder. Oluşan rengin yoğunluğu glikoz konsantrasyonu ile orantılıdır ve fotometrik olarak 510 nm'de ölçüldü. Elde edilen absorbanslardan sonuçlar mg/dl olarak hesaplandı.

2.2.12. İSTATİSTİK ANALİZLER

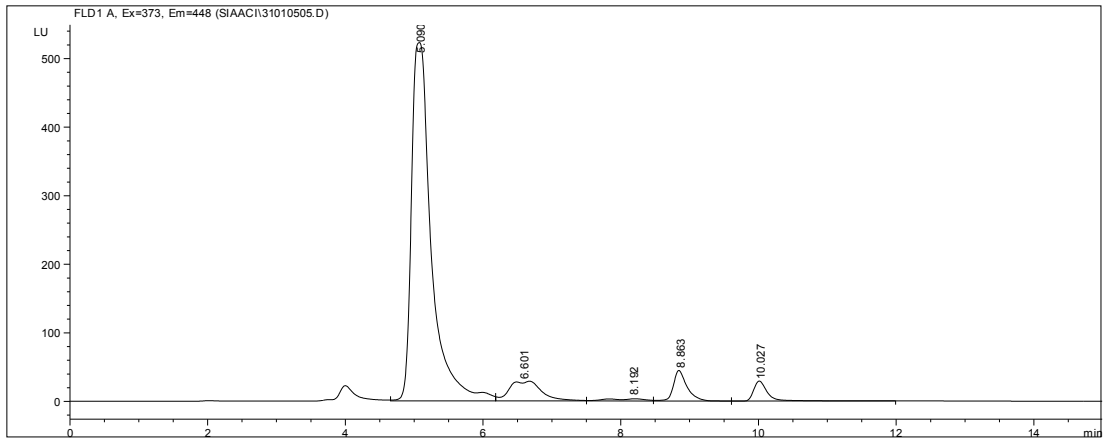
Yapılan çalışmalar sonucunda elde edilen veriler SPSS 13.0 istatistik programı kullanılarak değerlendirildi (Özdamar, 2003). Verilerin ortalamaları \pm standart hatalarıyla ifade edildi. Elde edilen verilerin normallik testleri yapılmış ve gruplar arasındaki istatistiksel farkları saptamak için ANOVA testi, post-test olarak Duncan testi uygulandı. İstatistiksel anlamlılık için P<0,05 değeri seçildi.

3. BULGULAR

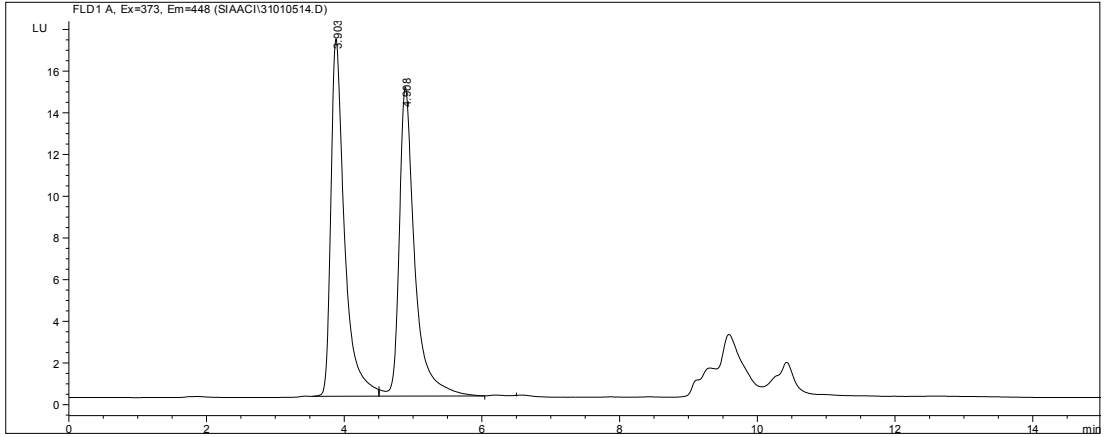
3.1. Atkestanesi Ekstresinin HPLC Analizi Sonuçları



Grafik 3.1. İçerisinde Sialik Asit Bulunmayan ve Türevlendirmede Kullanılan Kimyasalların Bulunduğu Analiz



Grafik 3.2. Sialik Asit (N-Asetil Neurominik Asit) Analizi



Grafik 3.3. N-Asetil Nörominik Asit ve N-Glikolilnörominik Asit Analizi

Tablo 3.1. Ekstredeki Aescin Miktarı ve Aescinin Bileşimi (%)

Aescin	58,28
Aescin 1a	55,25
Aescin 1b	19,21
Isoaescin 1a	20,07
Isoaescin 1b	5,14

3.2. Hormonlar ve Biyokimyasal Parametrelerdeki Değişimler

Yüksek protein içeren diyetle beslenen sıçanlara atkestanesi ağacının (*Aesculum hippocastanum L.*) tohumlarından elde edilen ekstrakt verilmesinin özellikle kalsiyum ve kemik metabolizması üzerindeki etkilerinin araştırıldığı ve toplam 30 gün süren denemede elde edilen kalsiyum, PTH, vitamin D, kalsitonin, osteokalsin, fosfor, ALP, total protein, üre azotu ve glikoz düzeyler ile istatistiksel değerleri Tablo 3.2.'de verildi. Yüksek protein tüketimi ve atkestanesi ekstresi uygulamalarının serum Ca düzeylerine etkisinin olmadığı, buna karşın etil alkol uygulamasının sözkonusu parametreyi Kontrol ve deneme gruplarına göre istatistiksel anlamda önemli düzeyde ($P < 0.001$) düşürdüğü bulundu (Tablo 3.2.).

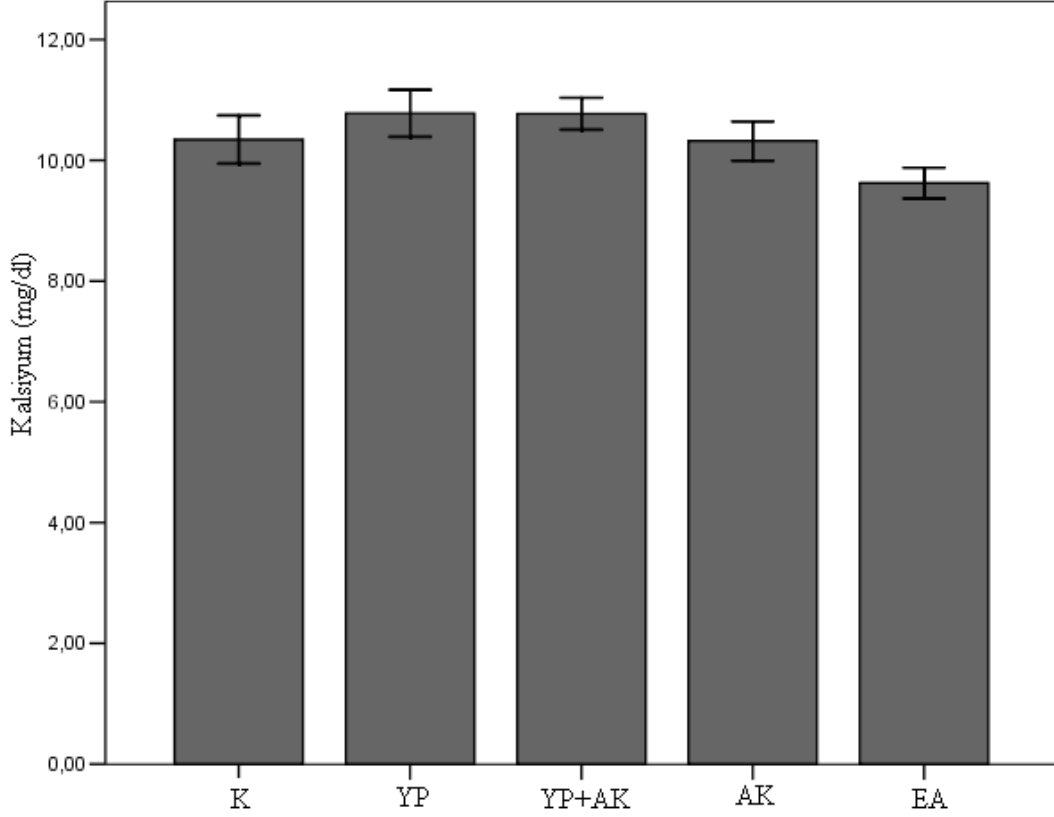
Araştırmada; PTH, kalsitonin, osteokalsin ve ALP düzeyleri bakımından uygulamalar arasında istatistiksel anlamda bir farklılığın olmadığı ($P > 0.10$) tespit edildi (Tablo 3.2.). Tablo 3.2. incelendiğinde, vitamin D düzeylerini kontrol grubuna göre; yüksek protein uygulamasının etkilemediği, yüksek proteinle birlikte atkestenesi ekstresi uygulaması ile etil alkol uygulamalarının ise önemli ($P < 0.07$) düzeyde artırdığı gözlemlendi. Çalışmada, serum fosfor düzeyleri yüksek proteinle beslenen hayvanlarda Kontrol grubundakilerden önemli düzeyde ($P < 0.001$) yüksek olduğu, buna karşın diğer deneme gruplarında Kontrol grubuna göre önemli bir farklılığın olmadığı bulundu (Tablo 3.2.). Yüksek protein tüketimine bağlı olarak plazmada total protein düzeyleri rakamsal bir artış sağlamasına rağmen istatistiksel bir öneme ulaşmazken, etil alkol verilen hayvanlardaki total protein düzeylerinin yüksek protein tüketenlerinkinden önemli düzeyde ($P < 0.05$) düşük olduğu bulundu (Tablo 3.2.). Tablo 3.2. incelendiğinde, plazma üre azotunun; Kontrol grubuna göre yüksek protein tüketen hayvanlarda önemli düzeyde yüksek olduğu ($P < 0.001$), atkestenesi ekstresinin yüksek protein içeren ve kontrol yemiyle beslenen hayvanlardakine göre önemli düzeyde düşürdüğü ($P < 0.001$), etil alkol uygulamasının ise sözkonusu parametreye etkisinin olmadığı görüldü. Araştırmada, etil alkol uygulaması yapılan hayvanlarda plazma glikoz düzeylerinin diğer gruplardakinden önemli düzeyde ($P < 0.001$) yüksek olduğu bulundu (Tablo 3.2.).

Tablo 3.2. Yüksek Protein Diyeti ve Atkestanesi (*Aesculum Hippocastanum L.*) Ekstraktının Kalsiyum, PTH, Vitamin D, Kalsitonin, Osteokalsin, Fosfor, ALP, Total Protein, Üre Azotu ve Glikoz Düzeylerine Etkileri (n=10, ± SEM).

Parametre	I. Kontrol (K) $\bar{x} \pm SE$	II. Yüksek Protein Grubu (YP) $\bar{x} \pm SE$	III. Yüksek Protein ve Atkestanesi Ekstresi Grubu (YP + AK) $\bar{x} \pm SE$	IV. Atkestanesi Ekstresi Grubu (AK) $\bar{x} \pm SE$	V. Etil Alkol Grubu (EA) $\bar{x} \pm SE$	P
Kalsiyum (mg/dl)	10,34±0,17 ^a	10,77±0,16 ^a	10,77±0,10 ^a	10,32±0,14 ^a	9,62±0,11 ^b	0,000
PTH (pg/ml)	62,22±1,46	60,00±0,00	61,42±1,42	61,11±1,11	63,00±1,52	0,616
Vitamin D (pg/ml)	20,76±1,34 ^c	23,67±2,25 ^{bc}	29,51±0,90 ^{ab}	23,88±2,27 ^{bc}	31,62±2,84 ^a	0,007
Kalsitonin (pg/ml)	1,37±0,42	0,74±0,23	1,06±0,31	1,25±0,38	1,90±0,63	0,528
Osteokalsin (pg/ml)	56,66±1,66	56,66±2,10	55,71±2,02	58,75±4,40	60,00±2,10	0,797
İnorganik Fosfor (Pi, mg/dl)	8,92±0,21 ^b	11,28±0,49 ^a	9,92±0,39 ^b	8,98±0,39 ^b	9,17±0,21 ^b	0,000
ALP (U/l)	594,33 ± 54,40	783,25 ± 84,38	824,85 ± 83,57	736,10 ± 46,46	686,33 ± 61,31	0,143
Total Protein (g/dl)	6,68 ± 0,09 ^{abc}	7,06 ± 0,17 ^a	6,96 ± 0,12 ^{ab}	6,37 ± 0,20 ^{b,c}	6,17 ± 0,34 ^c	0,022
Üre Azot (mg/dl)	23,90 ± 1,29 ^b	31,34 ± 0,67 ^a	25,25 ± 1,39 ^b	19,61 ± 1,13 ^c	24,31 ± 0,95 ^b	0,000
Glikoz (mg/dl)	72,64 ± 2,18 ^{bc}	73,71 ± 3,57 ^{bc}	84,44 ± 6,32 ^b	68,63 ± 4,41 ^c	108,03 ± 3,33 ^a	0,000

^{a,b,c}: Aynı satırda farklı harf taşıyan değerler arasında farklılık önemlidir.

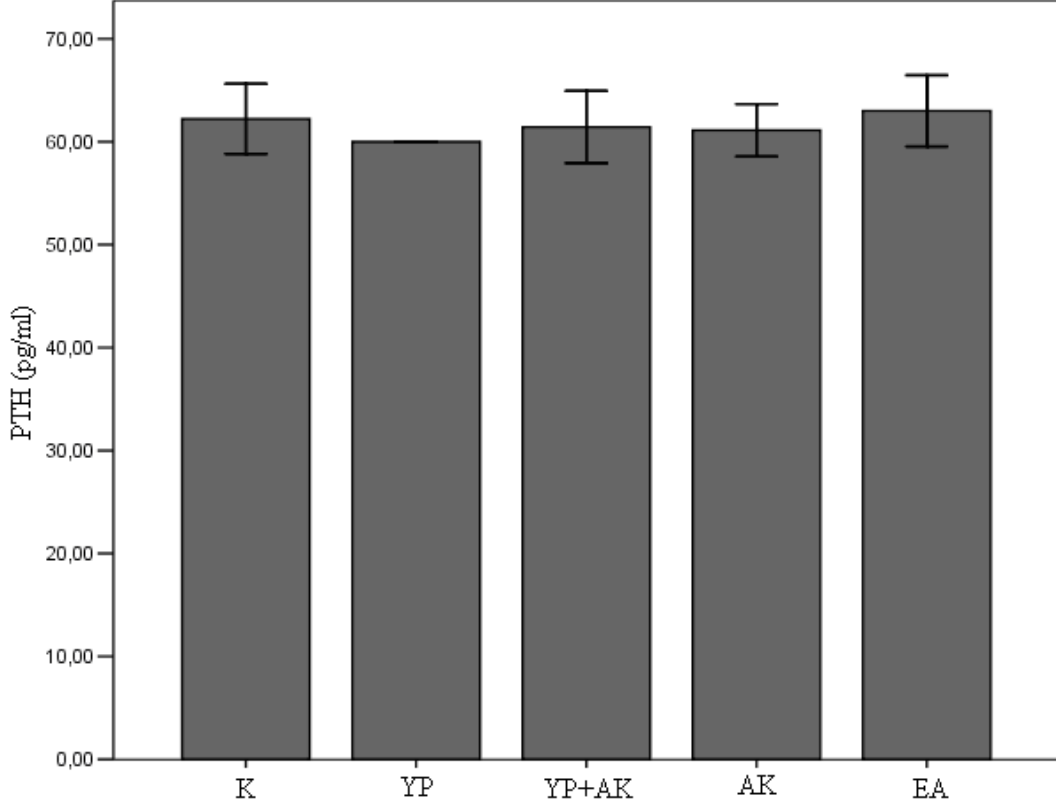
3.2.1 Serum Kalsiyum Düzeyleri



Grafik 3.4. Serum Kalsiyum Düzeyleri

Çalışmada serum kalsiyum düzeyleri; Kontrol grubunda $10,34 \pm 0,17$ mg/dl, yüksek protein içeren diyetin uygulandığı grupta $10,77 \pm 0,16$ mg/dl, yüksek protein ile birlikte atkestanesi ekstresi uygulaması yapılan grupta $10,77 \pm 0,10$ mg/dl, normal diyet ile birlikte atkestanesi ekstresinin uygulandığı grupta $10,32 \pm 0,14$ mg/dl ve etil alkol ve su karışımı uygulaması yapılan diyetle ise $9,62 \pm 0,11$ mg/dl olarak tespit edildi. Serum kalsiyum düzeylerine ait veriler Tablo 3.2. ve Grafik 3.4.'de verilmiştir. Tablo ve grafikte de görüldüğü üzere serum kalsiyum düzeyi kontrol grubu ve göre etil alkol uygulaması yapılan grup arasındaki kalsiyum farkı istatistiksel olarak önemlidir ($p=0,000$).

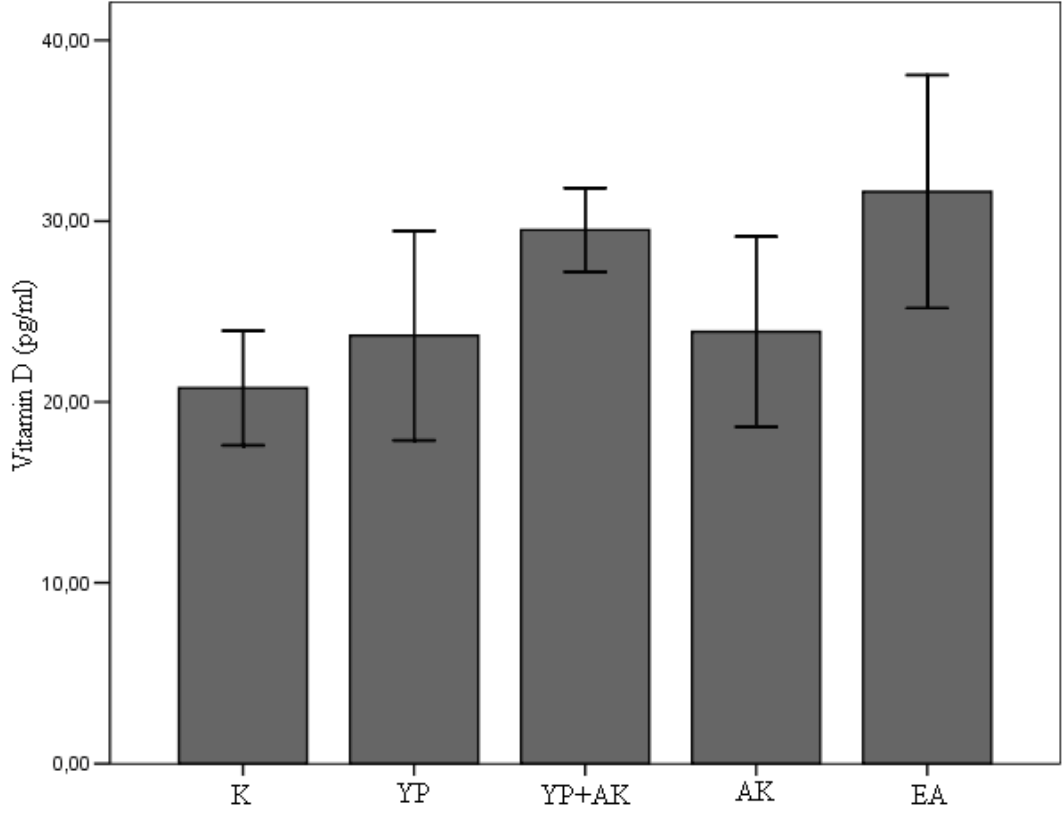
3.2.2. Plazma Paratiroid Hormon (PTH) Düzeyleri



Grafik 3.5. Plazma Paratiroid Hormon (PTH) Düzeyleri

Çalışmamızda plazma PTH düzeyleri Kontrol grubunda $62,22 \pm 1,46$ pg/ml, yüksek protein içeren diyetin uygulandığı grupta $60,00 \pm 0,00$ pg/ml, yüksek protein ile birlikte atkestanesi ekstresi uygulaması yapılan grupta $61,42 \pm 1,42$ pg/ml, normal diyet ile birlikte atkestanesi ekstresinin uygulandığı grupta $61,11 \pm 1,11$ pg/ml ve etil alkol ve su karışımı uygulaması yapılan diyetle ise $63,00 \pm 1,52$ pg/ml olarak ölçülmüştür. Plazma PTH düzeylerine ait veriler Tablo 3.2. ve Grafik 3.5.'de verilmiştir. Tablo 3.2. ve grafikte 3.5.'de görüldüğü üzere deneme gruplarında Kontrol grubuna göre istatistiksel önemde bir farklılık kaydedilmemiştir ($P = 0,616$).

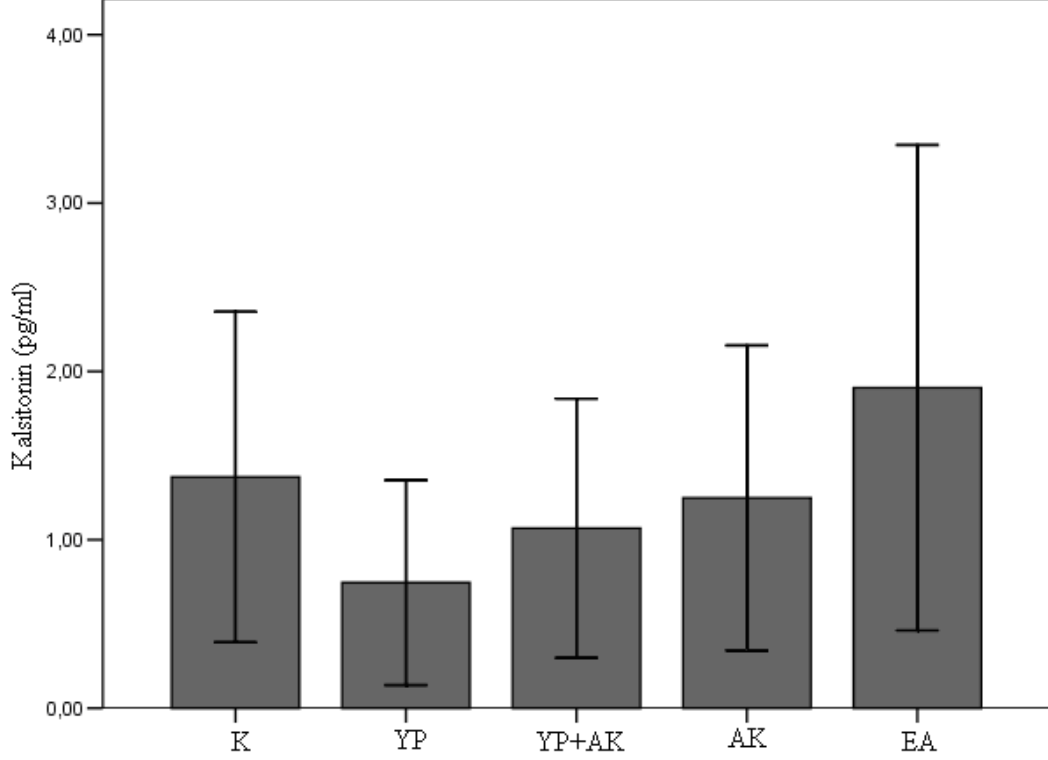
3.2.3. Plazma Vitamin D Düzeyleri



Grafik 3.6. Plazma Vitamin D Düzeyleri

Çalışmamızda plazma Vitamin D düzeyleri Kontrol grubunda $20,76 \pm 1,34$ pg/ml, yüksek protein içeren diyetin uygulandığı grupta $23,67 \pm 2,25$ pg/ml, yüksek protein ile birlikte atkestanesi ekstresi uygulaması yapılan grupta $29,51 \pm 0,90$ pg/ml, normal diyet ile birlikte atkestanesi ekstresinin uygulandığı grupta $23,88 \pm 2,27$ pg/ml ve etil alkol ve su karışımı uygulaması yapılan diyetle ise $31,62 \pm 2,84$ pg/ml olarak ölçülmüştür. Plazma Vitamin D düzeylerine ait veriler Tablo 3.2. ve Grafik 3.6.'da verilmiştir. Kontrol ve etil alkol grupları arasındaki fark istatistiksel olarak önemlidir ($p=0,007$).

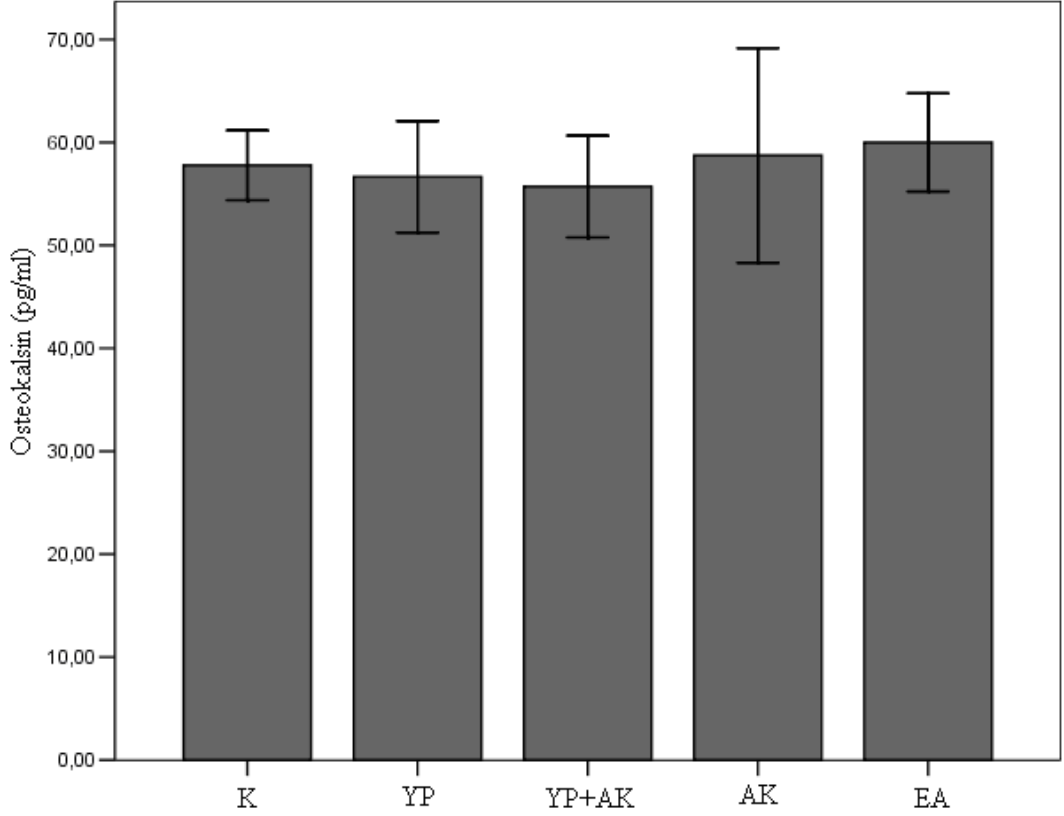
3.2.4 Plazma Kalsitonin Düzeyleri



Grafik 3.7. Plazma Kalsitonin Düzeyleri

Çalışmamızda plazma kalsitonin düzeyleri Kontrol grubunda $1,37 \pm 0,425,43$ pg/ml, yüksek protein içeren diyetin uygulandığı grupta $0,75 \pm 0,57$ pg/ml, yüksek protein ile birlikte atkestenesi ekstresi uygulaması yapılan grupta $1,06 \pm 0,31$ pg/ml, normal diyet ile birlikte atkestenesi ekstresinin uygulandığı grupta $1,24 \pm 0,38$ pg/ml ve etil alkol ve su karışımı uygulaması yapılan diyetle ise $1,90 \pm 0,63$ pg/ml olarak ölçülmüştür. Plazma kalsitonin düzeylerine ait veriler Tablo 3.2. ve Grafik 3.7.'de verilmiştir. Tablo ve grafikten de görüleceği gruplar arasında istatistiki olarak anlamlı bir farklılık kaydedilmemiştir ($p=0,528$).

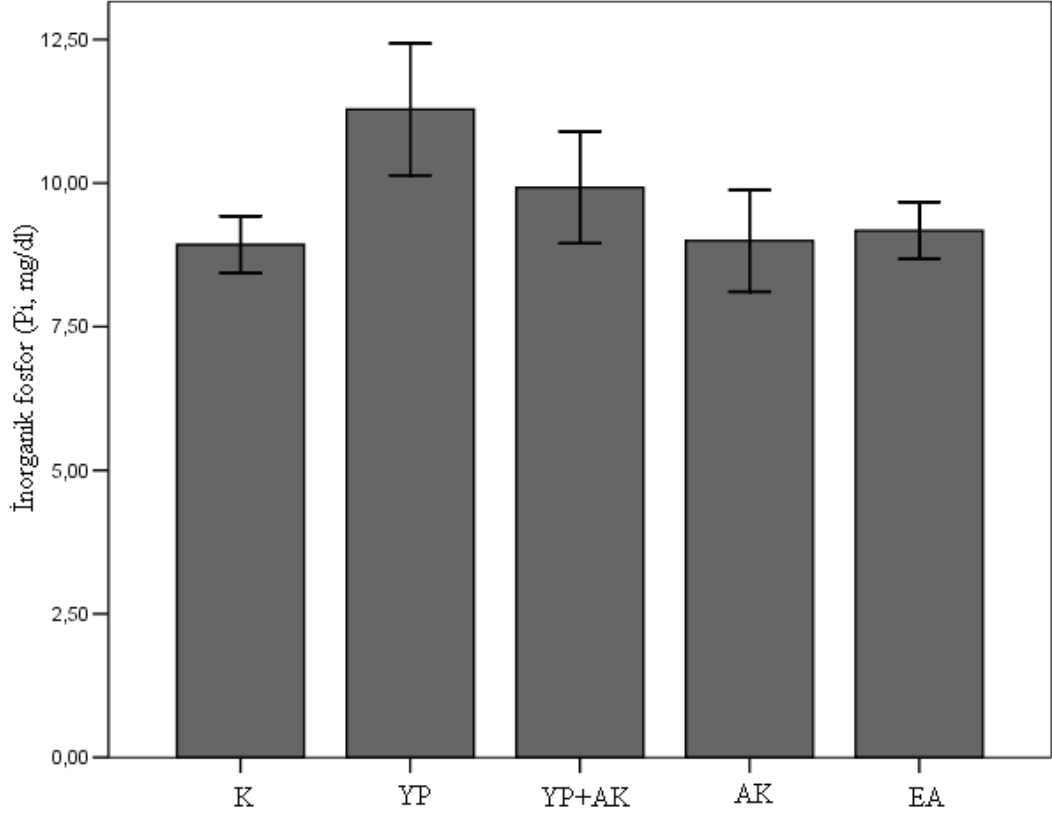
3.2.5. Plazma Osteokalsin Düzeyleri



Grafik 3.8. Plazma Osteokalsin Düzeyleri

Çalışmamızda plazma osteokalsin düzeyleri Kontrol grubunda $57,77 \pm 1,66$ pg/ml, yüksek protein içeren diyetin uygulandığı grupta $56,66 \pm 2,10$ pg/ml, yüksek protein ile birlikte atkestanesi ekstresi uygulaması yapılan grupta $55,71 \pm 2,02$ pg/ml, normal diyet ile birlikte atkestanesi ekstresinin uygulandığı grupta $58,75 \pm 4,40$ pg/ml ve etil alkol ve su karışımı uygulaması yapılan diyetle ise $60,00 \pm 2,10$ pg/ml olarak ölçülmüştür. Plazma osteokalsin düzeylerine ait veriler Tablo 3.2. ve Grafik 3.8.'de verilmiştir. Tablo ve grafikte de görüldüğü üzere deneme gruplarında Kontrol grubuna göre istatistiksel önemde bir farklılık kaydedilmemiştir (0,797).

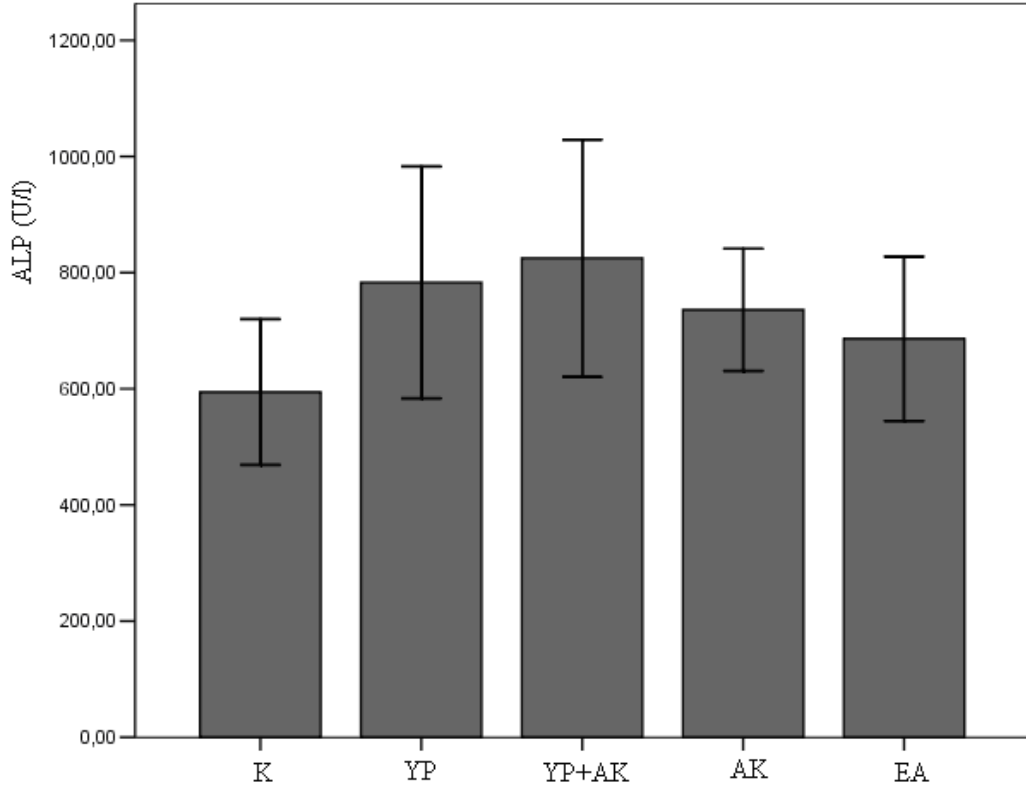
3.2.6. Serum İnorganik Fosfor Düzeyleri



Grafik 3.9. Serum İnorganik Fosfor Düzeyleri

Çalışmamızda serum fosfor düzeyleri Kontrol grubunda $8,92 \pm 0,21$ mg/dl, yüksek protein içeren diyetin uygulandığı grupta $11,28 \pm 0,49$ mg/dl, yüksek protein ile birlikte atkestenesi ekstresi uygulaması yapılan grupta $9,92 \pm 0,39$ mg/dl, normal diyet ile birlikte atkestenesi ekstresinin uygulandığı grupta $8,98 \pm 0,39$ mg/dl ve etil alkol ve su karışımı uygulaması yapılan diyetle ise $9,17 \pm 0,21$ mg/dl olarak ölçülmüştür. Serum fosfor düzeylerine ait veriler Tablo 3.2. ve Grafik 3.9.'da verilmiştir. Tablo ve grafikte de görüldüğü üzere serum fosfor düzeyi kontrol ve deneme grubu ile göre etil alkol uygulaması yapılan grup arasındaki fosfor düzeyi farklılıkları istatistiksel olarak önemlidir ($p=0,000$).

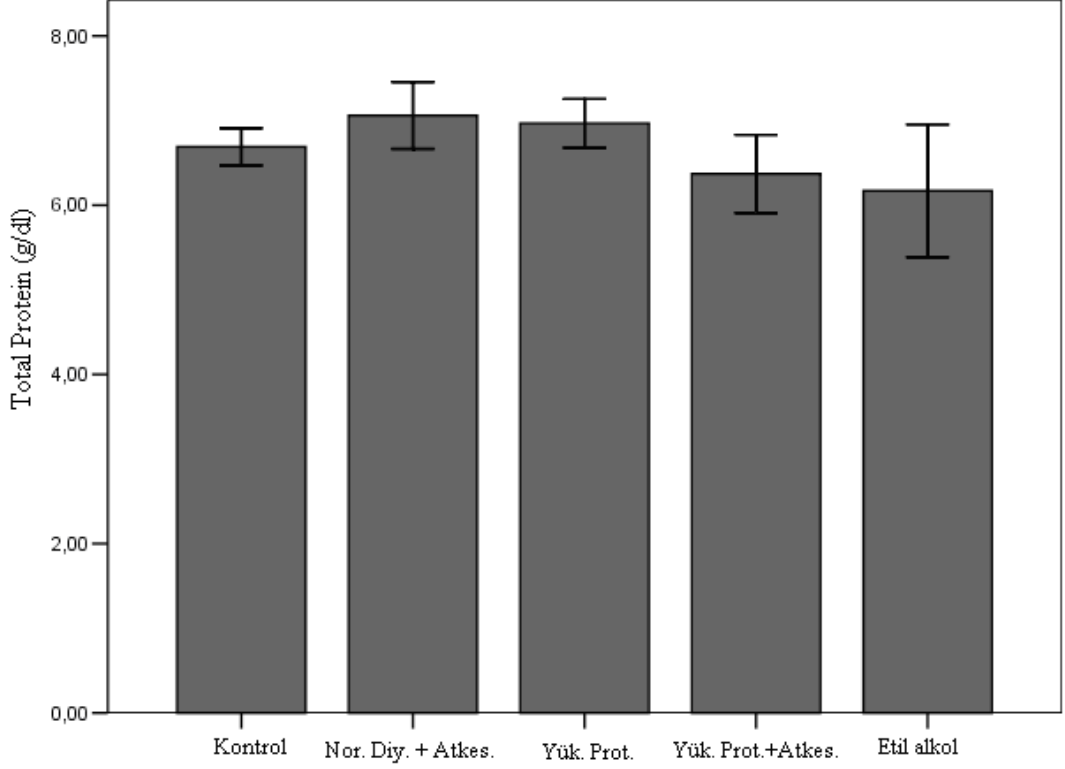
3.2.7. Serum Alkalen Fosfataz (ALP) Düzeyleri



Grafik 3.10. Serum Alkalen Fosfataz (ALP) Düzeyleri

Çalışmamızda serum ALP düzeyleri Kontrol grubunda $594,33 \pm 54,40$ U/l, yüksek protein içeren diyetin uygulandığı grupta $783,25 \pm 8438$ U/l, yüksek protein ile birlikte atkestanesi ekstresi uygulaması yapılan grupta $824,85 \pm 83,57$ U/l, normal diyet ile birlikte atkestanesi ekstresinin uygulandığı grupta $736,10 \pm 46,46$ U/l ve etil alkol ve su karışımı uygulaması yapılan diyetle ise $686,33 \pm 61,31$ U/l olarak ölçülmüştür. Serum ALP düzeylerine ait veriler Tablo 3.2 ve Grafik 3.10.'da verilmiştir. Tablo ve grafikte de görüldüğü üzere deneme gruplarında Kontrol grubuna göre istatistiksel önemde bir farklılık kaydedilmemiştir ($P = 0,143$).

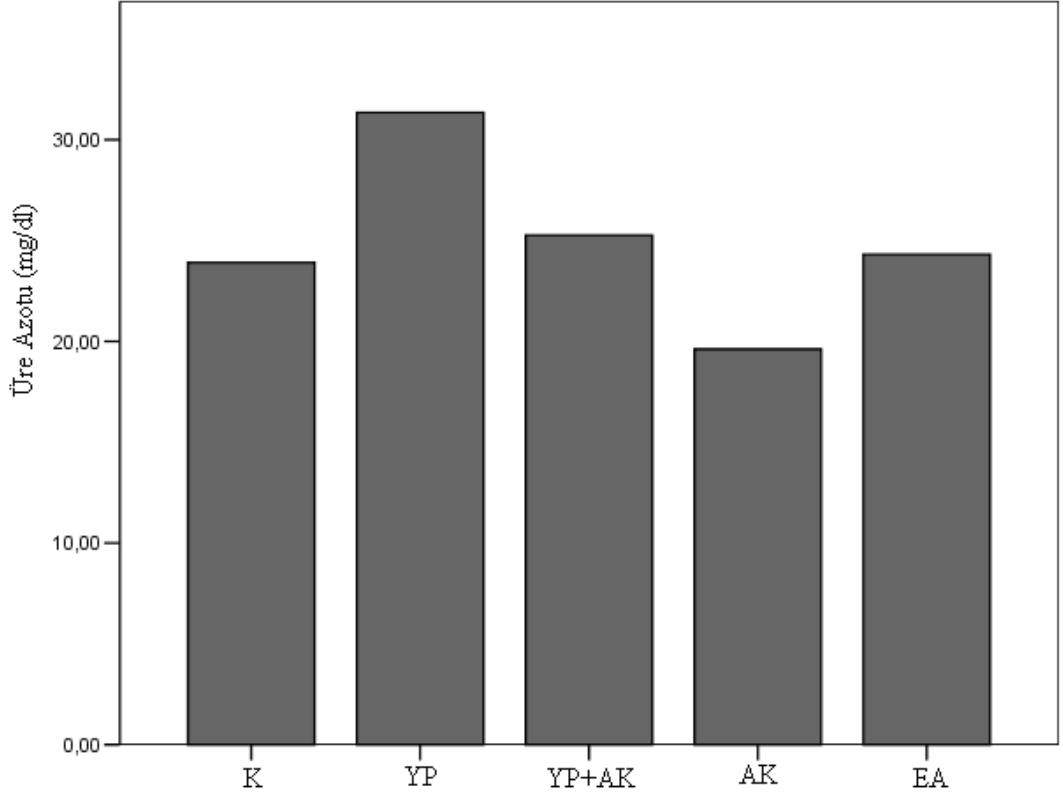
3.2.8. Plazma Total Protein Düzeyleri



Grafik 3.11. Plazma Total Protein Düzeyleri

Çalışmamızda plazma total protein düzeyleri Kontrol grubunda $6,68 \pm 0,09$ g/dl, yüksek protein içeren diyetin uygulandığı grupta $7,06 \pm 0,17$ g/dl, yüksek protein ile birlikte atkestanesi ekstresi uygulaması yapılan grupta $6,96 \pm 0,12$ g/dl, normal diyet ile birlikte atkestanesi ekstresinin uygulandığı grupta $6,37 \pm 0,20$ g/dl ve etil alkol ve su karışımı uygulaması yapılan diyetle ise $6,17 \pm 0,34$ g/dl olarak ölçülmüştür. Plazma total protein düzeylerine ait veriler Tablo 3.2. ve Grafik 3.11.'de verilmiştir. ($p = 0,022$)

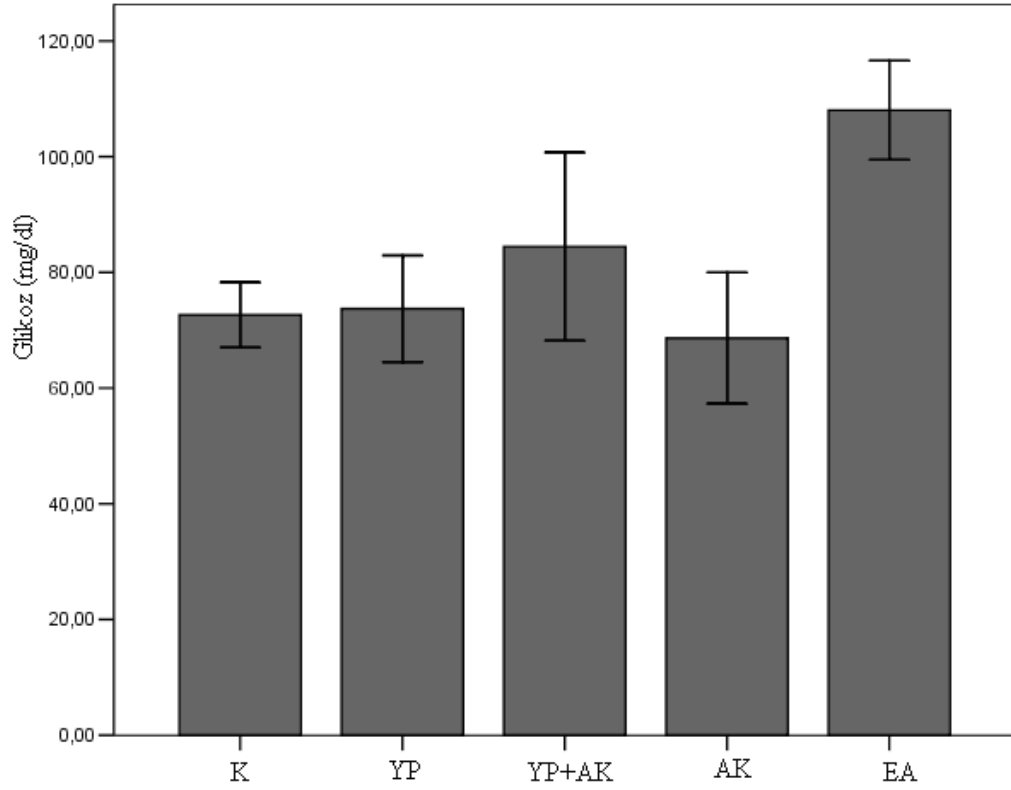
3.2.9. Plazma Üre Azotu Düzeyleri



Grafik 3.12. Plazma Üre Azotu Düzeyleri

Çalışmamızda plazma üre azotu düzeyleri Kontrol grubunda $23,90 \pm 1,29$ mg/dl, yüksek protein içeren diyetin uygulandığı grupta $31,34 \pm 0,67$ mg/dl, yüksek protein ile birlikte atkestanesi ekstresi uygulaması yapılan grupta $25,25 \pm 1,39$ mg/dl, normal diyet ile birlikte atkestanesi ekstresinin uygulandığı grupta $19,61 \pm 1,13$ mg/dl ve etil alkol ve su karışımı uygulaması yapılan diyetle ise $24,31 \pm 0,95$ mg/dl olarak ölçülmüştür. Serum kalsiyum düzeylerine ait veriler Tablo 3.2. ve Grafik 3.12.'de verilmiştir. Tablo 3.2 ve grafik 3.12'de görüldüğü üzere yüksek protein içeren diyetin uygulandığı grup ile kontrol ve diğer deneme grupları plazma üre azotu düzeyleri arasındaki fark istatistiksel olarak önemlidir ($p = 0,000$)

3.2.9 Plazma Glikoz Düzeyleri



Grafik 3.13. Plazma Glikoz Düzeyleri

Çalışmamızda plazma glikoz düzeyleri Kontrol grubunda $72,64 \pm 2,18$ mg/dl, yüksek protein içeren diyetin uygulandığı grupta $73,71 \pm 3,57$ mg/dl, yüksek protein ile birlikte atkestanesi ekstresi uygulaması yapılan grupta $84,44 \pm 6,32$ mg/dl, normal diyet ile birlikte atkestanesi ekstresinin uygulandığı grupta $68,63 \pm 4,41$ mg/dl ve etil alkol ve su karışımı uygulaması yapılan diyetle ise $108,03 \pm 3,33$ mg/dl olarak ölçülmüştür. Plazma glikoz düzeylerine ait veriler Tablo 3.2. ve Grafik 3.13.'de verilmiştir.

4. TARTIŞMA

Kalsiyum metabolizmasının değerlendirilmesinde bir takım biyokimyasal belirteçlerden yararlanılmakta ve bu sayede kalsiyumun vücuttaki en büyük deposunu oluşturan kemik döngüsündeki bozuklukların tespit edilmesinde kemik kaynaklı belirteçlerin serum veya idrardaki miktar tayini yaygın olarak kullanılmaktadır. Saponin içeren bitkilerin hipokolesterolemik, hipoglisemik (Mahaday ve ark., 2001, Francis ve ark. 2002) ve hemolitik aktivitelerini (Koçkar, 1989, Sağdıçoğlu, 2000) konu alan çok sayıda çalışma yapılmış olmasına rağmen, saponinlerin yüksek protein içeren diyetin kalsiyum ve kemik metabolizmasında meydana getirdiği değişiklikler ile bu metabolizmada rol alan hormonlarla etkileşimini ele alan bir çalışmaya rastlanılamamıştır. Bu nedenle, yüksek protein içeren diyet ile triterpenik saponinleri içeren atkestanesi ağacı (*Aesculum hippocastanum L.*) tohumlarının etil alkoldaki ekstraktının özellikle kalsiyum ve kemik metabolizması üzerindeki etkilerinin araştırıldığı bu çalışmada; hayvan materyali olarak kullanılan sıçanlar, kontrol yemi, protein içeriği yüksek yem, kontrol yemi ve atkestanesi tohumunun etil alkol ekstraktı verilmiş, protein içeriği yüksek yem ve atkestanesi tohumunun etil alkol-su ile ekstraksiyonundan elde edilen ekstraktı verilmiş ile kontrol yemi ve etil alkol verilmiş 5 değişik gruba ayrılmışlardır.

İnsan ve hayvan sağlığının korunması ile hayvanlarda verim artışı sağlayacak sentetik katkı maddelerine alternatif olarak tüm dünyada doğal bitkisel ürünlerden ve bunların ekstraktlarından yararlanılması amacıyla yapılan çalışmalardan elde edilen bulgular neticesinde, günlük optimum saponin tüketiminin 65 ila 100 mg/kg canlı ağırlık arasında olması gerektiği bildirimlerinden (Preston ve ark., 1987; Cheeke, 1998; Francis ve ark., 2002; Sparg ve ark, 2004; Aslan ve ark., 2006; Ciğerci ve ark., 2009) hareketle çalışmada, atkestanesi ağacı tohumlarından elde edilen etil alkol ekstraktının 100 mg/kg canlı ağırlık dozu kullanılmıştır. Bu çalışmada kullanılan atkestanesi tohumlarından hazırlanan ekstraktın %58,28 oranında en önemli triterpenoid saponin bişenlerinden biri olan “escin” içerdiği tespit edildi. Sıçanların yemindeki protein düzeyi % 10’dan 20-25’e çıkartıldığında, vücut yağ kitlesinin ve

canlı ağırlığın azaldığı yönündeki bildiriden (Thonney ve Ross, 1987) hareketle çalışmada, yüksek protein gruplarının yemine protein katkısı olarak % 25 kazein ilavesi yapılmış, bu sayede yemin HP oranı %20'den % 40'a çıkartılmıştır. Çalışmada; atkestanesi tohumunun ekstraksiyonunda kullanılan etil alkolün muhtemel etkilerinin ortaya konması amacıyla, kontrol yemiyle beslenen sıçanlara 20 ml %50 etil alkol-su karışımı gastrik gavaj yolu ile verilmiştir.

Araştırmada, 30 gün süren denemenin sonunda tüm gruplardaki hayvanlardan alınan kan örneklerinde elde edilen serum kalsiyum düzeyi 9.62 ila 10.77 mg /dl arasında tespit edilmiş ve bu değerlerin sıçanlar için kabul edilen normal değerler arasında olduğu gözlenmiştir (6.00 ile 10.6 mg/dl) (Kaneko, 1989; Patrick ve ark., 1998; Thrall ve ark. 2004). Çalışmada; gerek yüksek proteinin gerekse atkestanesi ekstresinin serum Ca düzeyleri üzerine etkisinin olmadığı, buna karşın etil alkol verilmesinin sözkonusu değeri önemli düzeyde düşürdüğü bulundu. Yüksek protein tüketiminin idrarla atılan Ca miktarını artırarak Ca metabolizmasını olumsuz etkilediği yönündeki bildirimlerin (Bell ve ark., 1975; Ginty, 2003) aksine, bu çalışmada yüksek protein tüketiminin serum Ca düzeyini etkilemediği bulundu. Bu bulgunun, insanlarda yüksek ve düşük et tüketiminin kalsiyum metabolizmasında herhangi bir değişime yol açmadığı yönündeki bildirimle uyumlu olduğu gözlendi (Hunt ve ark., 1995). Çalışmada; idrarla atılan Ca miktarı belirlenmemiş olmasına rağmen, yüksek protein tüketiminin serum Ca düzeyini etkilememesinin nedeni, yüksek protein tüketimine bağlı bağırsaklardan Ca emilimindeki artış olabilir. Nitekim, yüksek protein tüketimine bağlı olarak idrarla atılan Ca düzeyi yükselirken, aynı zamanda bağırsaklardan emilen Ca düzeyinin de arttığı ve idrarla atılan Ca'un % 80'inin bağırsaklardan emilen Ca artışıyla karşılandığı kaydedilmektedir (Kerstetter ve ark., 2003).

Bu çalışmanın önemli araştırma konusundan birisi de saponinlerin Ca homeostazisindeki değişikliklere etkisinin belirlenmesiydi. Steroidal saponin içeren *Yucca schidigera* ekstraktları verilen hayvanlarda kanda Ca düzeyinin yükseldiği yönündeki bildirimelerin (Güçlü, 2003; Avcı ve ark., 2007) aksine çalışmada; kontrol grubuna göre, normal diyetle birlikte atkestanesi ekstresi uygulaması yapılan grupta

serum Ca düzeyi bakımından istatistiksel anlamda bir fark olmadığı bulundu. Southon ve ark. (1988), domuzların yemine yonca (*Medicago sativa*) saponinleri ilave edildiğinde serum Ca düzeyinin azaldığını tespit etmişlerdir. Bu çalışmada elde edilen bulgu ile diğer bildirimler (Southon ve ark., 1988; Güçlü, 2003, Avcı ve ark., 2007) arasındaki farklılığın nedeni, kullanılan saponinlerin yapıları (triterpenoid veya steroidal), uygulama dozu ve saponinlerin eldesinde kullanılan ekstraksiyon işlemi ile materyal olarak kullanılan farklı sindirim sistemine sahip hayvanlardaki farklılıklardan kaynaklanabilir (Francis ve ark., 2002; Sparg ve ark., 2004).

Alkol tüketiminin iskelet sistemi üzerinde olumsuz etkilerinin olduğu bildirimini (Hogan ve ark., 1997) destekler nitelikte bu çalışmada, etil alkol uygulaması yapılan hayvanlardaki serum kalsiyum düzeyleri, kontrol ve diğer deneme gruplarından önemli oranda düşük olduğu tespit edildi. Alkol tüketimine bağlı kan kalsiyum değişikliklerin belirlenmesine yönelik daha önce yapılan çalışmalarda; sıçanlara uzun süreli olarak toksikasyonu karakterize eden dozda etil alkol uygulaması yapıldığında serum kalsiyum düzeyinde herhangi bir değişiklik olmadığı (Baran ve ark., 1980) ya da düşürdüğü (Peng ve Gitelman, 1974) bulunmuştur. Araştırmada; etil alkolün kan Ca düzeyini düşürücü etkisinin, kontrol yemiyle beslenen ve atkestanenin etanol ekstresi verilen sıçanlarda gözlenmemesi, saponinlerin etil alkolün emilimini önlemesine bağlanabilir. Nitekim, Yoshikawa ve ark. (1994) atkestanesinden elde edilen saponinlerin etil alkolün emilimini önlediğini bulmuşlardır. Bu bulgu, saponinlerin birlikte kullanıldığında alkol tüketiminin iskelet sistemi üzerine olan olumsuz etkisinin önlenebileceğine işaret etmektedir.

Çalışmada; kemik oluşumu ve kemik resorpsiyonun düzenlenmesi ile ekstraselüler Ca ve P homeostazisinin sürdürülmesinde önemli bir hormon olan PTH düzeyleri, 60 ila 63 pg/ml arasında bulundu ve bu değerlerin Kaneko (1989) tarafından bildirilen (70-700 pg/ml) normal değerlerin alt sınırına yakın, Hunt ve ark. (2009)'nın insanlarda bildirdiği değerlerin (30-33 pg/ml) üzerinde olduğu gözlemlendi. Bu araştırmada, gerek yüksek protein tüketimi ve atkestanesi ekstresi verilmesi gerekse etil alkol uygulamasının sözkonusu parametre üzerine etkili olmadığı bulundu. Yüksek protein tüketiminin PTH üzerine etkisinin olmaması, Roughead ve

ark. (2003) ile Hunt ve ark. (2009)'nın bildirimleriyle uyumluydu. Kan Ca düzeyinin kontrolünde önemli bir hormon olan PTH'un kan düzeylerine saponinlerin etkilerini belirlemeye yönelik araştırmaya rastlanılamamıştır. Bu araştırma, atkestanesi ekstrelerinin PTH üzerine etkilerini belirlemeye yönelik elde edilen ilk bulguları içermekte ve saponinlerin PTH düzeyini etkilemediğini göstermektedir. Alkol tüketiminin insanlarda kan PTH düzeylerini düşürdüğü bildirilmektedir (McCarty ve Thomas, 2003). Etil alkol uygulamasına bağlı serum Ca düzeyindeki azalmanın PTH'un baskılanmasından kaynaklandığı ileri sürülmektedir (Peng ve Gitelman, 1974). Bununla birlikte, bu çalışmada etil alkolün PTH düzeyini etkilememesi, yukarıda verilen çalışmaların bulgularıyla çelişmektedir. Bunun nedeni muhtemelen paratiroid bezinin kan Ca düzeyine verdiği cevabın yetersizliğinden kaynaklanabilir. Nitekim, Chanard ve ark. (1980) sıçanlarda yaptıkları araştırmada, akut etil alkol verilmesinin serum kalsiyum düzeyindeki düşmeye paratiroid bezinin verdiği cevabı azalttığını bulmuşlardır.

Serum vitamin D düzeyi; günlük vitamin D tüketimi (kolekalsiferol ve ergokalsiferol) ve derideki 7-dehidrokolesterolün güneş ışığına maruz kalması (kolekalsiferol) gibi çevresel faktörlerden önemli düzeyde etkilenmektedir (Bayşu Sözbilir ve Bayşu, 2008). Bununla birlikte, vitamin D büyük oranda güneş ışığına maruz kalma sonucunda sağlanırken, daha az düzeylerde diyet ve ilave kaynaklardan sağlanmaktadır (Reis ve ark., 2009). Vitamin D düşüklüğünün hiperparatiroidizme yol açtığı bildirilmektedir (Alemzadeh ve ark., 2008). Çalışmada; tüm gruplarda elde edilen plazma vitamin D düzeyleri 20.76-31.62 pg/ml arasında bulunmuştur. Yüksek protein tüketiminin vitamin D düzeylerini etkilemediği yönündeki bildirimlere (Roughead ve ark., 2003; Hunt ve ark., 2009) uygun olarak bu çalışmada yüksek protein tüketen hayvanlardaki vitamin D düzeyleri kontroldekilerden farklı bulunmadı. Kronik alkol tüketiminin insan (Laitinen ve ark., 1990) ve sıçanlarda (Shankar ve ark., 2008) plazma vitamin D düzeyini düşürdüğü yönündeki bildirimlerin aksine, bu çalışmada, etil alkol uygulaması plazma vitamin D düzeyini artırmıştır. Tüketilen alkolün düzeyi ve süresinin vitamin D düzeyi üzerine etkisinin olduğu ve kronik tüketiminin böbreklerde sentezinin ya da yıkılımının artmasına bağlı olarak vitamin D düzeyini düşürdüğü ileri sürülmektedir (Shankar ve ark.,

2008). Nitekim sıçanlara 3 hafta gibi kısa süre etil alkol verilmesinin vitamin D düzeylerini etkilemediği bulunmuştur (Turner ve ark., 1987). Toplam 4 hafta süren ve sıçanlara düşük düzeyde etil alkol verilen bu çalışmada, vitamin D düzeyinin yüksek olması muhtemelen kan Ca düşüklüğüne karaciğerin daha fazla vitamin D'yi dolaşıma vermesinin etkisi olabilir. Nitekim plazmada vitamin D artışı Ca iyon düzeyi ile ters orantılı şekilde kontrol edildiği bildirilmektedir (Guyton ve Hall, 1996). Saponinlerin yüksek oranıyla beslenen sıçanlarda vitamin D düzeyinin değişmediği yönündeki bildirim (Coulson ve Evans, 1960) uygun olarak, bu çalışmada da atkestanesi ekstresi uygulamasının plazma vitamin D düzeyini etkilemediği bulundu. Çalışmada, etil alkolün vitamin D düzeyini artırıcı etkisinin atkestanesi verilen grupta gözlenmemesi, atkestanesinde bulunan ve saponince zengin escinin etil alkolün emilimini bozmasına (Yoshikawa ve ark., 1994) bağlanabilir.

Çalışmada; tiroid bezi tarafından salgılanan ve kan kalsiyum düzeyini düşürücü etkiye sahip kalsitonin hormonu 0.74 ila 1.90 pg/ml arasında tespit edilirken, osteoblastlar tarafından sentezlenen ve osteoblastik aktivitenin arttığı durumlarda serum düzeyleri yükselen osteokalsin düzeyleri ise 55 ila 60 pg/ml arasında bulundu. Araştırmada, uygulamaların hem kalsitonin hem de osteokalsin hormonlarının kan düzeylerine etkilerinin olmadığı tespit edildi. Bu bulgu, yüksek protein diyeti (Roughead ve ark., 2003, Hunt ve ark.,2009) ve etil alkolün (Perks ve ark., 2006) kalsitonin ve osteokalsin düzeylerine etkisinin olmadığı yönündeki bildirimlerle uyumluydu. Bu araştırma, saponin içeren atkestanesi ekstresinin kalsitonin ve osteokalsin üzerine etkilerini belirlemeye yönelik elde edilen ilk bulguları içermekte ve saponinlerin sözkonusu hormonların düzeyini etkilemediğini göstermektedir. Çalışmada, osteokalsin ve kalsitonin hormon düzeylerine benzer şekilde kemik yapımında etkili ve kemik kalsifikasyonu ile ilişkili bir enzim olan ALP aktivitesine de uygulamaların etkisinin olmadığı bulundu. Bu araştırmada; osteoblastlar tarafından sentezlenen (Elçi, 2004) osteokalsin düzeyleri ve serum osteokalsin düzeyi ile beraber hareket eden ALP aktivitesi bakımından uygulamaların etkisinin olmaması; yüksek protein tüketimi ve saponin ile etil alkol

uygulamalarının osteoblast sayı ve fonksiyonlarını dolayısı ile kemik yapımını etkilemediğine işaret etmektedir.

Plazmada kalsiyum ve fosfor iyonlarından birinin artması, genellikle diğlerinin azalmasına sebep olmakta ve bu nedenle kanın normal kalsiyum düzeylerinin korunmasında fosfor gerekmektedir (Ersoy ve Bayşu, 1986). Çalışmada; tüm gruplarda bulunan fosfor düzeyleri 8.92-9.92 mg /dl arasında bulundu ve değerlerin sıçanlar için bildirilen düzeyler (5.0-13.0 mg/dL) (Thrall ve ark., 2004) arasında olduğu gözlemlendi. Sıçanların yeminde protein düzeyi artırıldığında vücutta P tutulumunun yükseldiği yönündeki bildirim (Grawes ve ark., 1980) uygun olarak, bu çalışmada, yüksek protein tüketiminin serum Pi düzeyini artırdığı bulundu. Buna karşın, böyle diyetle beslenen sıçanlara atkestanesi ekstresi verilmesinin söz konusu değeri önemli düzeyde düşürdüğü gözlemlendi. Saponinlerin, bu etkisinin sindirim kanalı içerisinde proteinlerle oluşturdukları sindirilemeyen komplekse bağlanabilir (Preston ve ark., 1987). Araştırmada serum Pi düzeyine gerek etil alkol gerekse kontrol diyetle beslenen sıçanlara atkestanesi ekstresi verilmesinin etkisi olmadığı bulundu. Bu bulgu, saponin içeren *Yucca schidigera* ekstraktı ilave edilmiş yemle beslenen tavşanlardaki bulgularla uyumluydu (Avcı ve ark., 2007).

Çalışmada, tüm gruplardan elde edilen total protein düzeyleri 6.17 ile 7.06 g/dl arasında bulundu ve bu değerlerin sıçanlar için bildirilen (Kaneko, 1989) normal değerler 6.2 ile 7.8 g/dl arasında olduğu gözlemlendi. Araştırmada, yüksek protein tüketiminin total protein düzeyini rakamsal olarak artırdığı fakat istatistiksel öneme ulaşmadığı bulundu. Bu bulgu, Hunt ve ark. (1995)'nin yüksek ve düşük et tüketen postmenopozal kadınların kanında total protein düzeylerinin farklı olmadığı yönündeki bildirimleriyle uyumluydu. Organizmada protein sentezi ve yıkılımı arasındaki dengeyi günlük protein tüketimindeki değişiklikler ile tüketilen proteinlerin kalitesi etkilemekte (Philips ve ark., 2009) ve vücudun ihtiyacından fazla alınan proteinler, enerji kaynağı olarak da kullanılmaktadır (Ersoy ve Bayşu, 1986). Peret ve ark. (1984) genetik olarak obez olan sıçanlarda yaptıkları araştırmada; yüksek protein tüketiminin yem tüketimi ve canlı ağırlığı azalttığı, karaciğerde

üreogenezis ve glikoneogenezis ile yağ dokusunda lipolizisi uyardığını bulmuşlardır. Amino asitlerin glikoneogenezisin en önemli kaynağı olduğu ve amino asit katabolizmasının vücut enerji dengesinde büyük bir etkiye sahip olduğu öne sürülmektedir (Reeds ve ark., 1998). Yüksek protein tüketimine bağlı yem tüketimindeki azalmanın tokluk duygusundan kaynaklanabileceği ileri sürülmekte (Bensaid ve ark., 2003) ve makro besinler arasında proteinlerin tokluk duygusunun oluşmasında karbonhidratlar ve yağlara göre daha etkin olduğu bildirilmektedir (Stubbs ve Whybrow, 2004). Yapılan çalışmalarda (Lean ve ark., 2001), yüksek protein tüketimine karşı organizmada bir adaptasyonun oluştuğu da bildirilmektedir. Bu bilgiler ışığında, bu çalışmada yüksek protein tüketiminin total protein düzeyini etkilememiş olması; bu tür bir beslemede amino asitlerin enerji kaynağı olarak kullanılmasına doğru yönlendirilmesinin ya da tokluk duygusuna bağlı olarak hayvan tarafından yem tüketiminin azaltılmasıyla günlük protein alımının düşürülmesinin etkisi olabileceği söylenebilir.

Çalışmada; gerek yüksek proteinle beslenen sıçanlara gerekse kontrol yemiyle beslenen sıçanlara atkestanesi ekstresi verilmesinin total protein düzeyine etkisinin olmadığı tespit edildi. Saponinlerin proteinlerle sindirilmeyen kompleksler oluşturarak sindirim kanalında proteinlerin sindirimini düşürdüğü, ancak bu etkinin diyetteki protein kaynağına göre değiştiği bildirimi (Potter ve ark., 1993) dikkate alınır, bu çalışmada saponinlerin total protein düzeyine etkisinin olmaması kullanılan protein kaynağından olabileceği düşünülebilir.

Alkolün genel etkilerinden birisinin de protein kaybına yola açması, bağırsaklardan protein emiliminin önlenmesi ve idrarla atılan azot miktarını artırması nedeniyle negatif azot dengesine sebep olduğu bildirimi (Hemat, 2003) dikkate alındığında, bu çalışmada etil alkol verilen sıçanlarda total protein düzeyinin kontrol sıçanlarındakinden farklı olmaması, kullanılan etil alkolün miktar ve süresiyle ilişkili olabilir (Shankar ve ark., 2008).

Araştırmada; plazma üre azotu düzeyleri 24 ile 31 mg /dl arasında bulundu ve bu değerler sıçanlar için bildirilen (Kaneko, 1989) düzeylerin (16.9 ile 21 mg/dl) üst

sınırına yakın ya da üzerinde olduğu gözlemlendi. Yüksek protein tüketiminin karaciğerde üreogenezis ve glikoneogenezisi artırdığı yönündeki bildirimlere (Peret ve ark. 1984; Visek, 1984) uygun olarak bu çalışmada, yüksek protein tüketimi kan üre azotu düzeyini yükseltmiştir. Bu bulgu, Hunt ve ark. (1995)'nın bildirimleriyle uyumluydu ve vücudun ihtiyacından fazla alınan proteinlerin enerji kaynağı olarak kullanıldıklarına işaret etmektedir (Ersoy ve Bayşu, 1986). Nitekim üre döngüsünde yer alan enzimlerin aktivitelerinde diyet ve hormonal faktörlere bağlı olarak değişimler olduğu ve sıçanların yemindeki protein düzeyi % 15'ten % 65'e çıkartıldığında, üre döngüsünde yer alan bütün enzimlerin aktivitelerinde 2 ila 4 kat bir artışın olduğu ifade edilmektedir (Visek, 1984).

Saponinlerin sıçanlarda dahil pek çok hayvanın gastrointestinal kanal içerisinde amonyak düzeyini düşürdüğü bilinmektedir (Wallace ve ark., 1994; Killeen ve ark. 1998; Francis ve ark., 2002). Çalışmada; saponin uygulamalarının sıçanlarda kan üre azotu düzeylerini düşürdüğü yönündeki bildirimlere (Preston ve ark., 1987, Potter ve ark., 1993, Killeen ve ark., 1998) uygun bir şekilde, gerek yüksek protein diyetle gerekse kontrol yemiyle beslenen sıçanlara atkestenesi ekstresi verilmesinin söz konusu parametreyi önemli düzeyde düşürdüğü bulundu. Preston ve ark. (1987) steroidal saponince zengin *Yucca schidigera*'nın diyetteki protein düzeyine bağlı olarak sıçanların kalın bağırsaklarındaki üreaz aktivitesinin artırılıp ya da azaltılabileceğini öne sürmektedirler. Bu çalışmadan elde edilen bulgular; saponin uygulamalarının yol açtığı kan üre azotu düzeyinde meydana gelen düşmenin, proteinlerin sindirim kanalında proteinlerle oluşturduğu sindirilmeyen kompleks oluşturmasından daha ziyade azotlu maddelerin sıçanların kalın bağırsaklarında mikrobiyel sindirime uğramaları esnasında yıkımlanmalarının engellenmesi ya da yıkımlanma sonucu oluşan amonyağı bağlayarak emilimlerinin düşük olmasına atfedilebilir (Killeen ve ark., 1998, Francis ve ark., 2002).

Çalışmada, tüm gruplardan elde edilen plazma glikoz düzeyleri 69 ile 108 mg/dl arasında bulundu ve bu değerlerin sıçanlar için bildirilen (Kaneko, 1989) normal değerler (47.7 ile 107.0 mg/dl) arasında olduğu gözlemlendi. Araştırmada, gerek yüksek protein gerekse atkestenesi ekstresi verilmesinin plazma glikoz düzeyini

etkilemediği ancak etil alkol verilmesinin söz konusu değeri önemli düzeyde artırdığı bulundu. Bu bulgu, etil alkolün kan glikoz düzeyini yükselttiği ve atkestanesinde elde edilen escinin etil alkolün etkisini önlediği yönündeki bildirimle (Yoshikawa ve ark., 1994) uyumlu olduğu gözlemlendi.

5. SONUÇ ve ÖNERİLER

Yüksek protein tüketimi ve atkestanenin etil alkoldeki ekstraktının kan kalsiyum düzeyi ile kan kalsiyum düzeylerini düzenleyen hormonları etkilemediği, buna karşın etil alkol verilmesinin kan kalsiyum düzeyini düşürdüğü ancak alkolün kemik metabolizmasına olan olumsuz etkisinin kemik mineral durumunu düzenleyen hormonların sekonder etkisiyle olmadığı, atkestanesi ekstraktı verilmesinin bağırsaklarda azot yıkılımını ya da amonyak emilimini azaltarak kan üre azotu düzeyini düşürüleceği ve alkolün glikoz metabolizmasına olan olumsuz etkisini azaltacağı kanaatine varıldı. Bu çalışmada elde edilen bulguların, yüksek protein ya da alkol tüketimine bağlı kemik ve kalsiyum metabolizmasında meydana gelen fizyolojik ve biyokimyasal değişimler ile saponinlerin bu değişimler üzerine olan etkileri ve neden-sonuç ilişkisinde yer alan mekanizmaların açığa kavuşturulmasına yönelik yapılacak yeni araştırmalara önemli veri ve bilimsel yorumlara katkı sağlayacağı sonucuna varıldı.

ÖZET

Atkestanesi (*Aesculus hippocastanum L.*)” bitkisinden elde edilecek ekstraktın yüksek protein içeren diyetle ilavesiyle ratlarda kemik ve kalsiyum metabolizmasına etkilerinin araştırılması.

Son yıllarda tüm dünyada yeniden önem kazanan bitkilerle tedavide ele alınan konular arasında önemli bir yere sahip olan saponinlerin; hemolitik, antiinflamatuvar, hücre zarı geçirgenliğini etkilemesi gibi özelliklerini konu alan birçok çalışma bulunmasına rağmen birçok fizyolojik olayda önemli görevleri olan proteinlerin yüksek miktarda tüketilmesi durumunda kemik ve kalsiyum metabolizmasına etkilerini konu alan bir çalışmaya rastlanılmamıştır.

Bu tez atkestanesinde elde edilen ve triterpenoid yapıda saponin içeren aescinin, yüksek protein içeren diyetle ilavesiyle kemik ve kalsiyum metabolizmasında yer alan bazı hormon ve biyokimyasal parametrelere etkilerinin araştırılması amacıyla yapılmıştır. Araştırmamız 50 adet 2–3 aylık erkek Sprague-Dawley sıçanlardan oluşan biri kontrol, dördü deneme olmak üzere toplam 5 grupta yapılmıştır. Gruplardan kontrol grubuna standart sıçan yemi, yüksek protein grubuna standart yeme %25 kazein ilave edilmesiyle hazırlanan yüksek protein diyeti, yüksek protein + saponin grubuna standart yeme yine %25 kazein ilavesiyle hazırlanan yüksek protein diyetinin yanında 100 mg/kg/gün %58,28 aescin içerdiği bilinen atkestanesi ekstresi 20 ml % 50 etil alkol- su içeren çözücü sistemi içerisinde çözülerek gastrik gavaj yolu ile, standart diyet + saponin grubuna standart yemin yanı sıra 100 mg/kg/gün %58,28 aescin içerdiği bilinen atkestanesi ekstresi 20 ml % 50 etil alkol - su içeren çözücü sistemi içerisinde çözülerek gastrik gavaj yolu ile, etil alkol grubuna ise standart yem ve 20 ml % 50 etil alkol – su gastrik gavaj yolu ile 30 gün boyunca verilmiş ve içme suları hazır bulundurulmuştur.

Çalışmamızda etil grubuna ait plazma kalsiyum seviyesi kontrol ve yüksek protein ve saponinin yer aldığı diğer deneme gruplarınınkinden daha düşüktür ($p = 0,000$). Gerek yüksek protein gerekse saponin uygulaması plazma paratiroid hormonu (PTH) üzerinde

herhangi bir değişiklik meydana getirmemiştir ($p = 0,616$). Plazma vitamin D düzeylerine yüksek protein diyetinin ve saponin uygulamasının bir etkisi gözlenmezken etanol grubunda vitamin D düzeyinin arttığı görülmektedir ($p=0,007$). Çalışmamızda yer alan tüm gruplar arasında plazma kalsitonin ve osteokalsin düzeylerinde anlamlı bir farklılık görülmemektedir ($p = 528$ ve $p = 0,797$). Serum inorganik fosfor düzeyini yüksek protein uygulamasının yükselttiği ve yüksek protein + saponin grubu ile kontrol ve diğer deneme grupları arasındaki farkı anlamlı hale getirdiği görülmektedir ($p = 0,000$). Tüm gruplara ait serum alkalin fosfataz düzeyleri arasında istatistiki olarak anlamlı bir fark bulunmamaktadır ($p = 0,143$). Plazma total protein düzeyine saponin uygulamasının bir etkisi bulunmamakla birlikte, yüksek protein diyeti yükseltmiştir ($p = 0,022$). Bulgularımız; plazma üre azotunun yüksek protein diyetiyle arttığını buna karşılık atkestanesi ekstresi verilmesinin ve standart yemin verildiği gruplarda da yine atkestanesi ekstresinin verilmesinin üre azotu düzeyini düşürdüğünü göstermektedir ($p = 0,000$). Yüksek protein diyeti ve saponin uygulaması plazma glikoz düzeyinde önemli bir farklılık meydana getirmezken standart yemin yer aldığı etanol grubunda artan plazma glikoz düzeyi, atkestanesi ekstresi ile istatistiksel olarak anlamlı şekilde düşmüştür ($p = 0,000$).

Anahtar kelimeler: *Aesculum hippocastanum* L., triterpenoid saponin, kalsiyum, paratirod hormon (PTH), vitamin D, kalsitonin, osteokalsin, fosfor, alkalin fosfataz (ALP), total protein, üre azotu, glikoz.

SUMMARY

Investigation Of Effect Extract Obtained From *Aesculum Hippocastanum L.* Horse Chestnut Added To High Protein Diets On Bone And Calcium Metabolism In Rats

The present thesis was planned to determine to effects of extract obtained from horse chestnut (*Aesculum hippocastanum L.*) seeds given especially on bone and calcium metabolism in feeded rats with high protein. Material of animal, aged 2-3 months, weighing 173-287 g, 50 male Sprague-Dawley rats were used. Rats divided into 5 groups as a control and four study groups in each group will have 10 units in and were placed unable to contact each other in the five compartments. While control group was feed control rat diet, I. Study group was fed with added %25 casein to standart diet, II. Study group was fed with added %25 casein to standart diet and extract of horse chestnut, III. Study group was fed with standart diet and extract of horse chestnut, IV. study group was fed with standart diet and 20 ml %50 ethyl alcohol and water mixture.

Horse chestnut extract which dissolved 20 ml %50 ethyl alcohol and water mixture was given 100 mg/day/kg to animals via gavage. Rats were housed so as to 12 hours light and 12 hours dark at normal room temperature for 30 days. At the end of the study; calcium, parathyroid hormone (PTH), vitamin D, calcitonin, osteocalcin, phosphorus, alkaline phosphatase (ALP), total protein, urea nitrogen and glucose level were determined in were taken blood samples.

Appications of high protein diet and horse chestnut extract had no effects on serum calcium levels in contrast with these parameters were obtained a decrease in statistical significance ($P < 0.001$) in control and study groups by application of ethanol. In our study according to the findings there aren't significant differences ($P > 0.10$) in the levels of PTH, calcitonin, osteocalcin and ALP. Appications of high protein diet had no effects on vitamin D levels, appications of high protein diet with

horse chestnut extract and application of ethanol causing a significantly increase ($P < 0.07$) in vitamin D levels. In our study serum phosphorus levels were elevated in fed rats with high protein compared to the control group ($P < 0.001$). In animals which fed with ethanol total protein levels showed a statistically significant decrease compared to the fed animals with high protein. Our results show high protein added group as causing an increase ($P < 0.001$), horse chestnut added groups as causing a decrease ($P < 0.001$) in plasma urea nitrogen levels. In our study according to the findings application of ethanol was elevated plasma glucose level significantly ($P < 0.001$).

It was concluded, high protein fed and ethanol extract of horse chestnut had no effect on blood calcium level and hormones which regulate blood calcium levels in contrast with blood calcium level were obtained a decrease, horse chestnut fed causing a decrease in blood urea nitrogen and will reduced the negative effect of ethanol.

Key words: *Aesculum hippocastanum* L., calcium, parathyroid hormone (PTH), vitamin D, calcitonin, osteocalcin, phosphorus, alkaline phosphatase, total protein, urea nitrogen, glucose.

KAYNAKLAR

- ALEMZADEH, R., KICHLER, J., BABAR, G., CALHOUN, M. (2008) Hypovitaminosis D in obese children and adolescents: relationship with adiposity, insulin sensitivity, ethnicity, and season. *Metabolism Clinical and Experimental* Volume 57, Issue 2, pages 183-191.
- ALLEN, L.H, ODDOYE, E.A., MARGEN, S. (1979) Protein-induced hypercalciuria: a longer term study. *American Journal of Clinical Nutrition* 32, 741–749.
- ARNETT, T., (2003) Regulation of Bone Cell Function by Acid-Base Balance, *Proceedings of The Nutrition Society*. 62(2):511-20
- ASLAN, R., DÜNDAR, Y., ERYAVUZ, A., BÜLBÜL, A., KÜÇÜKKURT, İ., FİDAN, A.F., AKINCI, Z., (2005) Effects of various quantities of *Yucca schidigera* powder (Deodorase) added to diets on the performance, some hematological and biochemical blood parameters, and total antioxidant capacity of laying hens, *Revue Méd. Vét.*, 2005, **156**, 6, 350-355.
- AVCI, G., KÜÇÜKKURT, İ., KONTAŞ, T., ERYAVUZ, A., FİDAN, A.F. (2007). Tavşanlarda rasyona ilave edilen farklı miktarlardaki *Yucca schidigera* ekstraktının (De-Odorase®) bazı serum makro ve mikro element düzeylerine etkisi. *F.Ü.Sağ.Bil.Derg.*, 21,(6); 257-262.
- AXELLSSON, I., (2006), Effects of High Protein Intakes, Nestlé Nutr. Wworkshop Ser Pediatr. Program. 2006; 58:121-9; Discussion 129-31.
- BACHRAN, C., SUTHERLAND, M., HEISLER, I., HEBESTREIT, MELZIG, M. F., FUCHS, H. (2006). The saponin-mediated enhanced uptake of targeted saporin-based drugs is strongly dependent on the saponin structure. *Experimental Biology and Medicine* 231:412-420.
- BADWELL, C.E., ERDMAN, J.W. (1988), Nutrient Interactions, CRC Pres, 389 sayfa.
- BALLMER, P.E., Mc NURLAN, M.A., HULTER, H.N., ANDERSON S.E., GARLICK, P.J., KRAPF, R. (1995). Chronic metabolic acidosis decreases albumin synthesis and induces negative nitrogen balance in humans. *J. Clin. Invest.* 95: 39–45.
- BANKIR, L., KRIZ, W. (1995) Adaptation of the kidney to protein intake and to urine concentrating activity: similar consequences in health and CRF. *Kidney Int.* 47: 7–24.

- BARAN, D.T., TEITELBAUM, S.L., BERGFELD, M.A., PARKER, E.M., AVIOLI, L.V. (1980). Effect of alcohol ingestion on bone mineral metabolism in rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 238:E507-E510.
- BARZEL, U.S., MASSEY, L.K., (1998) Excess Dietary Protein Can Adversely Affect Bone. *The Journal of Nutrition* Vol. 128 No. 6 June 1998, pp. 1051-1053.
- BAYŞU SÖZBİLİR, N., BAYŞU, N. (2008). Biyokimya, Güneş Kitabevleri, Ankara. Sf. 201.
- BELITZ, H. D., GROSCH W., SCHIEBERLE, P. (2009) Food Chemistry, Springer.
- BELL, R.R., ENGELMANN, D.T., SIE, T.L., DRAPER, H.H. (1975). Effect of a High Protein Intake on Calcium Metabolism in the Rat. *J. Nutr.* 105: 475-483.
- BELOBRAJDIC, D.P., MCINTOSH G.H., OWENS J. A.. (2004), A High-Whey-Protein Diet Reduces Body Weight Gain and Alters Insulin Sensivity Relative to Red Meat in Wistar Rat. *The American Society for Nutritional Sciences J. Nutr.* 134: 1454-1458.
- BENSAID, A., TOMÉ , D., L'HEUREUX-BOURON, D., EVEN, P., GIETZEN, D., MORENS, C., GAUDICHON, C., LARUE-ACHAGIOTIS, C., FROMENTIN, G. (2003) A high-protein diet enhances satiety without conditioned taste aversion in the rat. *Physiol. Behav.* 78: 311–320.
- BONJOUR, J.P., (2005), Dietary Protein: An Essential Nutrient For Bone Health, *Journal of the American College of Nutrition.* Vol. 24, No. 90006, 526S-536S
- BRANDAO-BURCH, A., UTTING, J. C., ORRISS, I.R., ARNETT, T.R. (2005). Acidosis Inhibits Bone Formation by Osteoblasts In Vitro by Preventing Mineralization. *Calcif. Tissue Int.* 77:167-174.
- BRÄNDLE, E., SIEBERTH, H. G., HAUTMANN, R.E. (1996) Effect of chronic dietary protein intake on the renal function in healthy subjects. *Eur. J. Clin. Nutr.* 50: 734–740.
- BROWN, S. E., JAFFE, R., Acid-Alkaline And Its Effect On Bone Health, (2000), *Int. J. Ingerative Med.* 2(6).
- BUSHINSKY, D.A., KRIEGER N.S., GEISSER, D.I., GROSSMAN, E.B., COE, F.L., (1983), Effects of pH on bone calcium and proton fluxes in vitro. *Am J Physiol Renal Physiol* 245: F204-F209.

- BUSHINSKY, D.A., GOLDRING, J.M., COE, F. L., (1985), Cellular contribution to pH-mediated calcium flux in neonatal mouse calvariae. *Am J Physiol Renal Physiol* 248: F785-F789.
- BUSHINSKY, D.A., LECHLEIDER, R.J.(1987), Mechanism of proton-induced bone calcium release: calcium carbonate-dissolution. *Am J Physiol Renal Physiol* 253: F998-F1005.
- BUSHINSKY, D.A., (2001) Acid-Base Imbalance and The Skeleton. *Eur. J. Nutr.* 40: 238-244.
- CHANARD, J., LACOUR, B., DRUEKER, T., BRUNOIS, J.P., RUIZ, J.C. (1980). Effect of acute ethanol loading on parathyroid gland secretion in the rat. *Adv. Exp. Med. Biol.* 128; 495-504.
- CHEEKE P.R. (1998). Toxicants of Plant Origin Volume II Glycosides. CRC Pres..
- CHOW, W.H., GRIDLEY, G., McLAUGHLIN, J.K., MANDEL, J.S., WACHOLDER, S., BLOT, W. J., NIWA, S., FRAUMENI, J.F. JR. (1994) Protein intake and risk of renal cell cancer. *J. Natl. Cancer Inst.* 86: 1131–1139.
- ÇİGERCİ, İ. H., FİDAN, A.F., KONUK, M., YÜKSEL, H., KUÇÜKURT, İ., ERYAVUZ, A., SOZBİLİR N.B. (2009), The protective potential of *Yucca schidigera* (Sarsaponin 30[®]) against nitrite-induced oxidative stress in rats. *Journal of Natural Medicines*. Volume 63, Number 3: 311-317.
- COULSON, C.B., EVANS, R.A. (1960). The effect of saponin, sterols and linoleic acid on the weight increase of growing rats. *Brit. J. Nutr.* 14, 121.
- DESHPANDE, S. S. (2002). Handbook of Food Toxicology. CRC Pres.
- DI PASQUALE, M.G., (2007), Amino acids and proteins for the athlete: the anabolic edge Nutrition in exercise and sport, CRC Pres, 434 sayfa.
- EASTELL, R., BAUMANN, M., WIECZOREK, L. (2001), Bone Markers: biochemical and clinical perspectives, Informa Health Care.
- ELÇİ A. (2004), Postmenopozal Kadınlarda Serum Total Osteokalsin ve Gamma Karboksiglutamat Kalıntısı Taşımayan Osteokalsin Oranı ile Kemik Mineral Dansitesi Ölçümünün Karşılaştırılması. Uzmanlık Tezi. T. C. Sağlık Bakanlığı Haydarpaşa Numune Eğitim ve Araştırma Hastanesi Tıbbi Biyokimya Bölümü. İstanbul.
- ERSOY, E., BAYŞU, N., (1986). Biyokimya, Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Yayınları No: 408 Ders Kitabı. Ankara.

- ERYAVUZ, A.B., DEHORITY, A. (2004). Effect of *Yucca schidigera* extract on the concentration of rumen microorganisms in sheep. *Anim. Feed Sci. Technol.* 117:215–222.
- ESCOPE MONOGRAPHS: The Scientific Foundation for Herbal Products European Scientific Cooperative on Phytotherapy (2003). Thieme.
- FİDAN, A.F., DÜNDAR, Y., (2007). *Yucca schidigera* ve içerdiği saponinler ile fenolik bileşiklerinin, hipokolesterolemik ve antioksidan etkileri (derleme). *Lalahan Hay. Araşt. Enst. Derg.*, 47(2)31-39.
- FRANCIS, C.,KEREM, Z.,MAKKUR, H.P.,BECKER, K. (2002). The biological action of saponins in animal system: a review. *British journal of nutrition.* Vol. 88 No. 6 587-605.
- GINTY, F.,(2003), Dietary Protein and Bone Health.*Proceedings of the Nutrition Society*, 62, 867-876.
- GRAVES, K.L.,WOLINSKY, I. (1980). Calcium and phosphorus metabolism in pregnant rats ingesting a high protein diet. *J. Nutr.* 110:2420-2432.
- GUBANOV, L.A.,LIBIZOV, N.I.,GLADKIKH, A.S.(1970). Search For Saponin Containing Plants Among Flora of Central Asia and Southern Kazakhstan. *Farmatsiya* (Moscow), 19:23-31.
- GURFINKEL, D.M.,RAO, A.V. (2003). Soyasaponin: The Relationship Between Chemical Structure and Colon Anticarcinogenic Activity. *Nutrition and Cancer.* 47(1), 24-33.
- GUYTON, A.C., HALL, J.E. (1996). Tıbbi Fizyoloji. 9. Baskı, (Çev. H. Çavuşoğlu), İstanbul, Nobel Tıp Kitabevleri, s.985-998.
- GÜÇLÜ, K.B., (2003) Bildircin rasyonlarına katılan yucca schidigera ekstraktının yumurta verimi ve yumurta kalitesi ile bazı kan parametrelerine etkisi. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Science*, 27: 567-574.
- GÜÇLÜ, K.B.,UYANIK, F. (2004) Saponinler ve Biyolojik önemi. *Erciyes Üniv. Vet. Fak. Derg.* 1(2) 125-131.
- HEGSTED, D.M. (1986)Calcium and Osteoporosis. *J Nutr*;116:2316–9.
- HEMAT, R.A.S. (2003). Protein metabolism in alcoholism.In Urotext simplifying Ureology-Vol. 1, Basics.
- HOFFMAN, J.R., FALVO, M.J., (2004), Protein-Which Is Best? *Journal of Sports Science and Medicine.* 3, 118-130.

- HOGAN, H.A.,SAMPSON, H.W.,CASHIER, E.,LEDOUX, N. (1997). Alcohol consumption by young actively growing rats: A study of cortical bone histomorphometry and mechanical properties. *Alcoholism: Clin.Expr.Res.* 21; 809-816.
- HOOGEVEN, E.K.,KOSTENSE, P.J.,JAGER, A.,HEINE, R.J.,JAKOBS, C., BOUTER, L.M.,DONKER, A.J.,STEHOUWER, C.D. (1998) Serum homocysteine level and protein intake are related to risk of microalbuminuria: the Hoorn study. *Kidney Int.* 54: 203–209.
- HOSSTETTMAN, K.,MARSTON, A., (1995) Saponins, Cambridge University Pres.
- HOST - EASIA KAP 1381, Biosource.
- HRISTOV, A.N.,Mc.ALLISTER, T.A.,VAN HERK F.H.,CHENG K. J.,NEWBOLD C.J.,CHEEKE P.R., (1999), Effect Of Yucca Schidigera On Ruminant Fermentation And Nutrient Digestion In Heifer, *J. Anim. Sci.* 77: 2554-2563.
- HUNT, J.R.,GALLAGHER, S.K.,JOHNSON, L.K.,LYKKEN G.I. (1995). High-versus low-meat diets: effects on zinc absorption, iron status, and calcium, copper, iron, magnesium, manganese, nitrogen, phosphorus, and zinc balance in postmenopausal women. *Am. J. Clin. Nutr.* ;62:621-32.
- HUNT, J.R., JOHNSON, L.K.,ROUGHEAD, Z.K.F. (2009). Dietary protein and calcium interact to influence calcium retention: a controlled feeding study. *Am. J. Clin. Nutr.* 89:1357–1365.
- HUSSAIN, I.,ISMAIL, A.M.,CHEEKE, P.R. (1996). Effects of feeding Yucca schidigera extract in diets varying in crude protein and urea contents on growth performance and cecum and blood urea and ammonia concentration of rabbits. *Anim. Feed Sci. Technol.* 62:121-129.
- HUSSAIN, I.,CHEEKE P.R., (1995). Effect of dietary Yucca schidigera extract on rumen and blood profiles of steers fed concentrate- or roughage-based diets. *Anim. Feed Sci. Technol.* 51:231-242.
- HUUSKONEN J, VAISANEN S. B, KROGER H (2001) Regular physical exercise and bone mineral density: a four-year controlled randomized trial in middle-aged men. The DNASCO study. *Osteoporos Int*, 12:349-355.
- JOHNSTONE, A.M.,HORGAN, G.W., MURISON, S.D.,BERNER, D.M., LOBLEY, G.E. (2008), Effects of a high-protein ketogenic diet on hunger, appetite, and weight loss in obese men feeding ad libitum. *American Journal of Clinical Nutrition*.Vol. 87, No. 1, 44-55.
- KALAYCIOĞLU, L., SERPEK, B.,NİZAMLIOĞLU, M., BAŞPINAR, N., TİFTİK, A. (2006) *Biyokimya*, Nobel Yayın Dağıtım, Ankara. Sf. 55.
- KANEKO, J.J.(1989). *Clinical Biochemistry of Domestic Animals* 4th Edition , Academic pres Inc.,San Diego California 92101,678-752.

- KENT, J.C., DEVLIN R.D.,GUTTERIGE, D.H.,RETALLACK, R.W. (1979) Effect of alcohol on renal vitamin D metabolism in chickens. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. Volume 89, Issue 1, p.155-161.
- KERSTETTER, J.E.,O'BRIEN, K.,INSOGNA, K.L. (2003), Dietary protein, calcium metabolism, and homeostasis revisited. *Am. J. Clin. Nutr.* 78 (suppl): 584S-92S.
- KILLEEN, G. F.,CONNOLLY, C.R., WALSH, G.A., DUFFY, C.F.,HEADON, D. R.,POWER, R.F. (1998) The effects of dietary supplementation with *Yucca schidigera* extract or fractions thereof on nitrogen metabolism and gastrointestinal fermentation processes in the rat. *J. Sci. Food Agric.* 76:91-99.
- KINYAMU, H.K., GALLAGHER, J.C., RAFFERTY, K. A., BALHORN, K.E. (1998). Dietary calcium and vitamin D intake in elderly women: effect on serum parathyroid hormone and vitamin D metabolites. *Am.J.Clin.Nutr.*, 67; 342-348.
- KOÇKAR, Ö. M. (1989). Atkestanesi ekstraksiyonu ve essin izolasyonu. Doktora Tezi- Anadolu Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü. Eskişehir.
- KÜÇÜKKURT, İ. (2007), Diyete Farklı Miktarlarda *Yucca Schidigera* Tozunun Katılmasının Sıçanlarda Plazma Leptin, İnsulin Ve Tiroid Hormonları İle Bazı Biyokimyasal Parametrelere Etkilerinin Araştırılması, Veteriner Biyokimya Anabilim Dalı Doktora Tezi, Afyon Kocatepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü.
- KÜÇÜKKURT, İ., FİDAN, A.F. (2008). Saponinler ve bazı biyolojik etkileri. *Kocatepe Veteriner Dergisi*. 1:89-96.
- LAITINEN, K.,VALIMAKI, M,LAMBERG-ALLARDT, C.,KIVISAARI, L., LALLA, M., KARKKAINEN, M., YLIKAHRI, R. (1990). Deranged vitamin D metabolism but normal bone mineral density in Finnish noncirrhotic male alcoholics. *Alcohol Clin Exp Res* 14:551–556.
- LARUE-ACHAGIOTIS, C., MARTIN, C., VERGER, P.,LOUIS-SYLVESTRE, J. (1992) Dietary self-selection vs. complete diet: body weight gain and meal pattern in rats. *Physiol. Behav.* 51: 995–999.
- LÁSZTITY, R.,HIDVÉGI, M.,BATA, A. (1988), Saponins in Food, *Food Rev. Int.*, 14(4), 371-390.
- LEMANN, J, JR., ADAMS, N.D., GRAY, R.W. (1979) Urinary calcium excretion in human beings. *N Engl J Med* 301:535–541.

- LINN, T., GEYER, R., PRASSEK, S., LAUBE, H. (1996) Effect of dietary protein intake on insulin secretion and glucose metabolism in insulin-dependent diabetes mellitus. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 81: 3938–3953.
- LITZOW, J.R., LEMANN, J.JR., LENNON, E.J. (1967) The effect of treatment of acidosis on calcium balance in patients with chronic azptemic renal disease. *J. Clin. Invest.* 46: 280-286.
- MAHADAY, G.B , FONG , H.H.S., NORMAN, R. (2001). Dietary Supplements Quality, Safety and Efficacy. CRC Pres. Sf. 159.
- MAKKAR, H.P.S., BECKER, K. (1997), Degradation Of Quillaja Saponins By Mixed Culture Of Rumen Microbes, *Letters in Applied Microbiology.* 25, 243-245.
- Mc ARTHUR, L.H., KELLY, W. F., GIETZEN, D.W., ROGERS, Q. R. (1993) The role of palatability in the food intake response of sıçans fed high-protein intake response. *Appetite* 20: 191–196.
- Mc CARTY, M.F., THOMAS, C.A. (2003). PTH excess may promote weight gain by impeding catecholamine-induced lipolysis-implications fort he impact of calcium, vitamin D, and alcohol on body weight. *Med.Hypoth.* 61; 535-542.
- MEDRAS, M, JANKOWSKA, E.A (2000) The effect of alcohol on bone mineral density in men. *Przegl Lek.* 57:743-746.
- MONTGOMERY, R., CONWAY, T.W., SPECTOR, A.A. (2000). Biyokimya-Olgu Sunumlu Yaklaşım. Palme Yayıncılık. Ankara.
- MUNGER, R.G., CERHAN, J.R., CHIU, B.C. (1999) Prospective study of dietary protein intake and risk of hip fracture in postmenopausal women. *Am J Clin Nutr.* 69:147–52.
- MURRAY, R.K., GRANNER, D.K., MAYES, P.A., RODWELL, V.W. (2004). Harper'ın Biyokimyası. Çevirenler: Menteş, G., Ersöz, B., Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul.
- NAIDU, A.S. (2000), Natural food antimicrobial systems. CRC Pres.
- NEW, S.A., (2002). The Role of The Skeleton in Acid- Base Homeostase. *Proceedings of the Nutrition Societ.*, 61, 151-164.
- NIRANJAN, P.S., BESUDEB, A., OLESZEK, W. (2002). Advances in Structural Determination of Saponins and Terpenoid Glycosides. *Current Organic Chemistry.* 5, 315-334.
- NOYAN, A. (1993). Fiziyoloji. Meteksan., Sekizinci Baskı, Ankara

- OLESZEK, W., MARSTON, A. (2000). Saponins in Food, Feedstuffs and Medicinal. Kluwer Academic Publishers. Sf. 260.
- ÖZDAMAR, K. (2003). SPSS ile Biyoistatistik. 5. Baskı. Kaan Kitap Evi. Eskişehir.
- ÖZEN, Ş., HASPOLAT, K., (2003), D Vitamini, kalsiyum, kemik metabolizması ve psikiyatrik bozukluklar. *Klinik Psikiyatri* 6:102-113.
- PENG, T.C., AND GITELMAN, H. (1974). Ethanol-Induced Hypocalcemia, Hypermagnesemia and Inhibition of the Serum Calcium- Raising Effect of Parathyroid Hormone in Rats. *Endocrinology* Vol. 94, No. 2 608-611.
- PERET, J.,BACH, A.C.,DELHOMME, B.,BOIS-JOYEUX, B.,CHANEZ, M., SCHIRARDIN, H. (1984) Metabolic effects of high-protein diets in Zucker rats. *Metabolism*. 33(3):200-207.
- PERKS, N.,CHAMPNEY,T.H.,DEFEELL, B. (2006). Alcohol consumption inhibits bone growth and development in young actively growing rats.*Alcoholism:Clin.Exp.Res.*,20;1375-1384.
- PHILLIPS, S.M, TANQ, J.E, MOORE, D.R.(2009). The role of milk- and soy-based protein in support of muscle protein synthesis and muscle protein accretion in young and elderly persons. *J Am Coll Nutr*. 28:343-54.
- PINEDA, M.H.,(2003).Mc Donald's Veterinary Endocrinology and Reproduction, Iowa State Pres, Sf. 102.
- POTTER, S.M.,FLORES, R.J., POLLACK, J.,LONE, T.,JIMENEZ, M.D. (1993). Saponin- Protein Interaction and Influence on Blood Lipids. *J. Agric. Food Chem*. 41, 1287-1291.
- PRESTON, R.L.,BARTLE, S.J., MAY, T., GOODALL, S.R. (1987). Influence Of Sarsaponin On Growth, Feed And Nitrogen Utilization In Growing Male Rats Feed Diets With Added Urea Or Protein. *J. Anim. Sci*. 65: 481-487.
- PROMISLOW, J.H.E.,GOODMAN-GRUEN, D.,SLYMEN, D.,BARETTI-CONNOR, E., (2002), Protein Consumption and Bone Mineral Density in the Elderly. *American Journal of Epidemiology*, Vol.155 No.7.
- RAMP, W.K.,LENZ L.G.,KAYSINGER K.K. (1994). Medium pH modulates matrix, mineral, and energy metabolism in cultured chick bones and osteoblast-like cells. *Bone and Mineral* Volume 24, Issue 1, 59-73.
- RAPURI, P.B.,GALLAGHER, J.C.,BALHORN K.E.,RYSCHON K.L. (2000), Alcohol intake and bone metabolism in elderly women. *American Journal of Clinical Nutrition*, Vol. 72, No. 5, 1206-1213.

- REEDS, P.J., BURRIN, D.G., DAVIS, T.A., STOLL, B. (1998) Amino acid metabolism and the energetics of growth. *Arch. Anim. Nutr.* 51: 187–197.
- REIS, J.P., MILLER, E.R., APEL, L.J. (2009). Vitamin D Status and Cardiometabolic Risk Factors in the United States Adolescent Population. *Pediatrics* (doi: 10.1542/peds.-0213).
- REMER, T. (2001), Influence of nutrition on acid-base balance-metabolic aspects. *Eur. Jour. Nutr* 40:214–220.
- ROUGHEAD Z.K., (2003) Is The Interaction Between Dietary Protein And Calcium Destructive Or Constructive For Bone ?. *J. Nutr.* 133:866S-869S.
- SAGĐIÇOĞLU. A.G. (2000). Aesculus hippocastanum özütlerinden aescinin mikrozomal lipid peroksidasyon üzerindeki etkileri. Yüksek Lisans Tezi-Orta Doğu Teknik Üniversitesi, Ankara.
- SAHU, N.P., ACHARI, B. (2001), Advances in Structural Determination of Saponins and Terpenoid Glycosides. *Current Organic Chemistry*. Volume 5, Number 3, March 2001 , pp. 315-334(20).
- SAMPSON, H.W. (199). Alcohol, osteoporosis, and bone regulating hormones. *Alcohol Clin Exp Res* 21:400–403.
- SELLMEYER, D.E., STONE, K.L., SEBASTIAN, A., STEVEN, R. (2001) Cummings A High Ratio of Dietary Animal To Vegetable Protein Increases The Rate Of Bone Loss And The Risk Of Fracture In Postmenopausal Woman. *Am J Clin Nutr.* 73:118–22.
- SEMON, B.A., LEUNG, P.M.B., ROGERS, Q. R., GIETZEN, D.W. (1987). Effect of type of protein on food intake of rats fed high protein diets. *Physiol. Behav.* 41: 451–458.).
- SHANKAR, K., HDESTRAND, M., HALEY, R., SKINNER, R.A., HOGUE, W., JO, C.H., SIMPSON, P., LUMPKIN, JR. C.K., ARONSON, J., BADGER, T.M., RONIS, M.J. (2006). Different molecular mechanisms underlie ethanol-induced bone loss in cycling and pregnant rats. *Endocrinology* 147:166–178.
- SHANKAR, K., LIU, X., SINGHAL, R., CHEN, J., NAGARAJAN, S., BADGER, T.M., RONIS, M.J.J. (2008). Chronic Ethanol Consumption Leads to Disruption of Vitamin D3 Homeostasis Associated with Induction of Renal 1,25 Dihydroxyvitamin D3-24-Hydroxylase (CYP24A1). *Endocrinology* 149:1748–1756.
- SHARP, P.E., LA REGINA, M.C., SUCKOW, M.A., (1998) The Laboratory Rat, CRC Pres, sayfa 16.

- SHIMOYAMADA, M., OOTSUBO, R., NARUSE, T., WATANABE, K. (2000). Effects of soybean saponins on protease hydrolyses of β - lactoglobulin and α -lactalbunin. *Biosci., Biotechnol. Biochem.*, 64 (4), 891-893, 2000.
- SOUTHON, S.,JOHNSON, I. T.,GEE, J.M.,PRICE K.R. (1988). The effect of Gypsophylla saponins in the diet on the mineral status and plasma cholesterol concentration in the rat. *British Journal Of Nutrition* 59, 49-55.
- SPARG, S.G., LIGHT, M. E.,STADEN J. (2004). Biological activites and distribution of plant saponin. *Journal of Ethnopharmacology* 94:219-243.
- SPENCER, H.,KRAMER L.,OSIS D.,NARRIS, C. (1978), Effect of a high protein (meat) intake on calcium metabolism in man, *Am. J. Clin. Nutr.* 31: 2167-2180.
- STUBBS, R.J,WHYBROW, S. (2004).Energy density, diet composition and palatability: influences on overall food energy intake in humans. *Physiol Behav* ,81(5):755– 764.
- SUGANO, M. (2005), Soy in Health and Disease Prevention Volume 3/ Nutrition and Disease Prevention, CRC Pres, 2005, 313 sayfa.
- ŞİMŞEK, E., KOCABEY, K.,(2002) Kalsiyum, Fosfor ve Magnezyum Homeostasisi, *Türkiye Klinikleri Dahili Tıp Bilimleri Kardiyoloji*, Cilt 11, Sayı 4.
- TATAR, M. (2003). Proteinden yetersiz yemle beslenen sıçanların kan ve doku serbest radikal ve antioksidan düzeylerinin araştırılması. Doktora Tezi- Yüzüncü Yıl Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü.
- THONNEY, M.L.,ROSS, D.A. (1987). Composition of gain of rats fed low or high protein diets and grown at controlled rates from 80 to 205 grams. *J. Nutr.* 117: 2135–2141.
- THRALL, M.A.,BAKER, D.C.,CAMPBELL, T.W.,NICOLA, D.D.,FETTMAN D.L.,REBAR, A.,WEISER G. (2004), Veterinary Hematology and Clinical Chemistry Text and Clinical Chemistry, Yayıncı: Willey Blackwel.
- TURNER, R.T,GREENE, V.S,BELL, N.H. (1987). Demonstration that ethanol inhibits bone matrix synthesis and mineralization in the rat. *J Bone Miner Res* 2:61–66
- TURNER R.T,SIBONGA J. D. (2001) Effects of alcohol use and estrogen on bone. *Alcohol Res Health.* 25:276-281.
- ÜSTDAL, M. (1983), Biyokimya-Vitaminler Enzimler Hormonlar. Anadolu Üniversitesi Eğitim Sağlık ve Bilimsel Araştırma Çalışmaları Vakfı Yayınları

No.:1.

- VIGORITA, V.J.,GHELMAN, B.,MINTZ, D.(2007), Orthopaedic Pathology 2. Baskı, Lippincott Williams&Wilkins.
- VINCKEN, J.P.,LYNN, H.,GROOT, A.,GRUPPEN, H. (2007). Saponins, classification and occurrence in the plant kingdom. *Phytochemistry* 68:3, 275-279.
- VISEK, W.J. (1984).Ammonia: Its Effects on Biological Systems, Metabolic Hormones, and Reproduction *J.Dairy Sci.* 67: 481-498.
- WACHMAN, A.,BERNSTEIN, D. (1968) Diet and Osteoporosis. *Lancet* 1, S.1: 958–959
- WALKER, R.M.,LINKSWILLER, H.M. (1972), Calcium Retention in Adult Human Male as Affected by Protein Intake. *J. Nutr.* 102: 1297-1302.
- WALLACE, R. J. , LAURY ARTHAUD, L., NEWBOLD, C.J. (1994). Influence Of Yucca Schidigera Extract On Ruminant Ammonia Concentrations And Ruminant Microorganisms. *Applied and Environmental Microbiology.*1762-1767.
- WIEDERKEHR, M.,KRAPF, R.(2001), Metabolic and Endocrine Effects of Metabolic Acidosis in Human. *Swiss Med. WKLY*, 131:127-132.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION (2002). WHO Monographs on Selected Medicinal Plants. World Health Organization.
- YAMAGUCHI, M., ONO R.,MA, Z.J. (2001), Prolonged Intake of Isoflavon- and Saponin- Containing Soybean Extract (*Nijiru*) Supplement Enhances Circulating γ -Carboxylated Osteocalcin Concentrations in Healthy Individuals. *Journal of Health Science.* 47(6) 579-582.
- YAMAN K. (1999), Fizyoloji, Uludağ Üniversitesi Güçlendirme Vakfı Yayın No:143, Bursa.
- YANAGISAWA, H.,WADA, O.(1998) Effects of dietary protein on eicosanoid production in rat renal tubules. *Nephron* 78: 179–186.
- YOSHIKAWA, M.,HARADA, E.,MURAKAMI, T.,MATSUDA, H.,WARIISHI, N., YAMAHARA, J.,MURAKAMI, N.,KITAGAWA, I. (1994), Escins-Ia, Ib, IIa, IIb and IIIa, Bioactive Triterpene Oligoglycosides from The Seeds Of *Aesculus Hippocastanum* L.: Their Inhibitory Effects On Ethanol Absorption and Hypoglycemic Activity On glucose Tolerance Test. *Chem. Pharm. Bull.* 42(6) 1357-1359.
- YÜCEKUTLU, A.N., BİLDACI, I.(2008). Determination of plant saponins and some of *Gypsophila* Species: A review of the literature. *Hacettepe Journal Of Biology And Chemistry.* 36 (2), 129-135.

ZEMEL, M.,(1988), Calcium Utilization: effect of varying level and Source Of Dietary Protein. *Am. J. Clin. Nutr.*, 48:880-3.

ZHANG, J.,DAI, J.,LIN, D.L. (2002) Osteoprotegerin abrogates chronic alcohol ingestion-induced bone loss in mice. *J Bone Miner Res*, 17:1256-1263.

ÖZGEÇMİŞ

1970 yılında Uşak'ta doğdu. İlk, orta ve lise öğrenimini Manisa, Uşak ve Eskişehir'de tamamladıktan sonra 1987 yılında başladığı Anadolu Üniversitesi Mühendislik-Mimarlık Fakültesi'nden 1991 yılında mezun oldu. 1991 yılında Osmangazi üniversitesi Fen bilimleri Enstitüsü Temel İşlemler Termodinamik anabilim dalında başladığı yüksek lisans eğitimini 1993 yılında "*Silybum marianum* L. (Deve dikenini) ekstraksiyonu" konulu tez çalışması ile tamamladı. 1994 yılında Uşak Üniversitesi Meslek Yüksek Okulu'nda Öğretim Görevliliğine başladı. Halen bu görevini sürdürmekte olup evli ve iki çocuk annesidir.