



**TÜRKİYE’DE YETİŞEN *LEONURUS* L.
TÜRLERİ ÜZERİNE FARMASÖTİK
BOTANİK YÖNDEN ARAŞTIRMALAR**

**Doktora Tezi
Nagehan SALTAN**

Eskişehir 2021

**TÜRKİYE’DE YETİŞEN *LEONURUS* L. TÜRLERİ ÜZERİNE
FARMASÖTİK BOTANİK YÖNDEN ARAŞTIRMALAR**

Nagehan SALTAN

DOKTORA TEZİ

Farmasötik Botanik Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Yavuz Bülent KÖSE

Eskişehir

Anadolu Üniversitesi

Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Haziran 2021

Bu tez çalışması BAP Komisyonunca kabul edilen 1904S025 no.lu proje kapsamında desteklenmiştir.

JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI

Nagehan SALTAN'ın “Türkiye’de Yetişen *Leonurus* L. Türleri Üzerine Farmasötik Botanik Yönden Araştırmalar” başlıklı tezi 15.06.2021 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından değerlendirilerek “Anadolu Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliği”nin ilgili maddeleri uyarınca, Farmasötik Botanik Anabilim dalında Doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

	<u>Unvanı-Adı Soyadı</u>	<u>İmza</u>
Üye (Tez Danışmanı)	: Prof. Dr. Yavuz Bülent KÖSE	
Üye	: Prof. Dr. Gökalgp İŞCAN	
Üye	: Prof. Dr. Ceyda Sibel KILIÇ	
Üye	: Prof. Dr. Ayşe Mine GENÇLER	
Üye	: Dr. Öğr. Üyesi İlham ERÖZ POYRAZ	

Prof. Dr. Nalan GÜNDOĞDU KARABURUN

Enstitü Müdürü

ÖZET

TÜRKİYE’DE YETİŞEN *LEONURUS* L. TÜRLERİ ÜZERİNE FARMASÖTİK BOTANİK YÖNDEN ARAŞTIRMALAR

Nagehan SALTAN

Farmasötik Botanik Anabilim Dalı

Anadolu Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Haziran 2021

Danışman: Prof. Dr. Yavuz Bülent KÖSE

Bu çalışmada, Türkiye’de yetişen *Leonurus* L. cinsine ait türlerin morfolojik ve anatomik karakterleri ayrıntılı olarak belirlenmiş, morfolojik ölçümler SPSS programı kullanılarak kümeleme analizi ve ayırma analizi teknikleri ile değerlendirilmiştir. Bu amaçla, çalışılan taksonlar çiçeklenme zamanlarında farklı lokalitelerden toplanmıştır. Gövde, kaliks ve nutletlerin mikromorfolojik özellikleri ve polenlerin yüzey ornamentasyonları SEM kullanılarak ilk kez tanımlanmıştır. *Leonurus* türlerinin toprak üstü kısımlarından farklı çözücülerle hazırlanan ekstrelerin DPPH[•] ve ABTS^{•+} yöntemleri ile antioksidan etkileri karşılaştırılarak, toplam fenolik madde miktarları Folin-Ciocalteu yöntemi ile galik asit eşdeğeri cinsinden belirlenmiş ve sonuçlar ilişkilendirilmiştir. En yüksek değerin (170 mg GAE/g) tespit edildiği Bursa’dan toplanan *L. cardiaca* taksonunda, antioksidan etkinin de en yüksek olduğu görülmüştür. Antimikrobiyal duyarlılık testleri ile antibakteriyal ve antifungal etkiler, 12 patojen mikroorganizmaya karşı ortaya konmuştur. Ekstrelerin A549, MCF7 ve C6 hücreleri üzerindeki sitotoksik etkileri MTT yöntemi kullanılarak incelenmiş ve C6 hücre hattı üzerinde oldukça etkili oldukları belirlenmiştir. Elde edilen biyolojik etkilerin değerlendirilmesi açısından, her bir ekstrenin kimyasal bileşimleri YPSK-KS/KS ile analiz edilmiş, ana bileşenler (genkvanin, verbaskozit) belirlenmiştir. Ek olarak, tez konusunu oluşturan türlerin, DNA dizi analizleri için ITS primerleri kullanılmış, bu gen bölgeleri sekanslanarak GenBank verileri ile karşılaştırılmış ve türler arasındaki filogenetik ilişkiler değerlendirilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre ITS primerleri ile türler düzeyinde başarılı bir ayırım yapılmıştır.

Anahtar Sözcükler: *Leonurus* L., Biyolojik aktivite, ITS, Morfo-anatomi, YPSK-KS/KS

ABSTRACT

PHARMACEUTICAL BOTANY INVESTIGATIONS on *LEONURUS* L. SPECIES GROWING in TURKEY

Nagehan SALTAN

Department of Pharmaceutical Botany

Anadolu University, Graduate School of Health Sciences, June 2021

Supervisor: Prof. Dr. Yavuz Bülent KÖSE

In this study, morphological and anatomical characters of species belonging to the genus *Leonurus* L. growing in Turkey were determined in detail, and the morphological measurements were evaluated by cluster analysis and discriminant analysis techniques using SPSS program. For this purpose, the studied taxa were collected from different localities at flowering times. Micromorphological features of stem, calyx and nutlets and surface ornamentations of pollens were described for the first time using SEM. By comparing the antioxidant effects of the extracts prepared with different solvents from the aerial parts of *Leonurus* species with DPPH[•] and ABTS^{•+} assays, the total phenolic substance amounts were determined in gallic acid equivalent by Folin-Ciocalteu method and the results were associated. It was observed that the antioxidant effect was the highest in the *L. cardiaca* taxon collected from Bursa, where the highest value (170 mg GAE /g) was detected. Antibacterial and antifungal effects have been demonstrated against 12 pathogenic microorganisms with antimicrobial susceptibility tests. The cytotoxic effects of the extracts on A549, MCF 7 and C6 cells were examined using the MTT method and it was determined that they were highly effective on the C6 cell line. In terms of evaluating the biological effects obtained, the chemical composition of each extract was analyzed by HPLC-MS/MS, and the main components (genkwanin, verbascoside) were determined. In addition, ITS primers were used for DNA sequence analysis of the species that constitute the thesis subject, these gene regions were sequenced and compared with the GenBank data, and the phylogenetic relationships between the species were evaluated. According to the results, a successful distinction was made at the level of species with ITS primers.

Keywords: *Leonurus* L., Biological activity, ITS, Morpho-anatomy, HPLC-MS/MS

TEŞEKKÜR

12/06/2021

Doktora çalışmamın gerçekleşmesinde bilgi ve tecrübesiyle beni yönlendiren tez danışmanım sayın Prof. Dr. Yavuz Bülent KÖSE'ye teşekkürü bir borç bilirim.

Tez dönemi boyunca çalışmalarımı takip eden ve önerileriyle katkı sağlayan, ayrıca antimikrobiyal aktivite çalışmalarını birlikte yaptığım sayın hocam Prof. Dr. Gökalp İŞCAN'a ve tez dönemim boyunca her aşamada beni sabırla dinleyen ve motive eden sevgili Dr. Öğr. Üyesi İlham ERÖZ POYRAZ'a,

Tez çalışmalarım sırasında antioksidan aktivite çalışmalarını ve YPSK/KS-KS analizlerini birlikte yaptığım ve bu süreçte yardımını esirgemeyip, her sorumu cevaplayan arkadaşım Doç. Dr. Fatih GÖGER'e,

Sitotoksik aktivite çalışmalarında emek harcayan ve bana destek olan sevgili Doç. Dr. Begüm Nurpelin SAĞLIK'a ve Araş. Gör. Dr. Derya OSMANİYE'ye,

Taramalı Elektron Mikroskop analizlerinde yardımını esirgemeyen, birlikte keyifle çalıştığım canım arkadaşım Biyolog Arzu İŞCAN'a,

Tez çalışmamızı maddi olarak destekleyen Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu'na,

Hayatım boyunca aldığım her kararda yanımda olan, desteklerini hep hissettiğim canım annem, babam ve kardeşime,

Bitmeyen sabrı ile bu süreçte beni anlayışla idare eden, bana hep güvenen, ayrıca istatistiksel çalışmalarda da yardımını esirgemeyen, sevgili eşim Doç. Dr. Mustafa SALTAN'a,

Yaşına göre çok olgun ve anlayışlı olan, gülen yüzüyle beni hep motive eden, birlikte geçireceğimiz zamanları sabırla bekleyen, hayattaki en büyük şansım, oğlum Uras SALTAN'a

en içten teşekkürlerimi sunarım...

ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ

Bu tezin bana ait, özgün bir çalışma olduğunu; çalışmamın hazırlık, veri toplama, analiz ve bilgilerin sunumu olmak üzere tüm aşamalarında bilimsel etik ilke ve kurallara uygun davrandığımı; bu çalışma kapsamında elde edilen tüm veri ve bilgiler için kaynak gösterdiğimi ve bu kaynaklara kaynakçada yer verdiğimi; bu çalışmanın Anadolu Üniversitesi tarafından kullanılan “bilimsel intihal tespit programıyla” tarandığını ve hiçbir şekilde “intihal içermediğini” beyan ederim. Herhangi bir zamanda, çalışmamla ilgili yaptığım bu beyana aykırı bir durumun saptanması durumunda, ortaya çıkacak tüm ahlaki ve hukuki sonuçları kabul ettiğimi bildiririm.

Nagehan SALTAN

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
TEZ BAŞLIĞI.....	i
JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI.....	ii
ÖZET	iii
ABSTRACT.....	iv
TEŞEKKÜR	v
ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ.....	vi
İÇİNDEKİLER	vii
TABLolar DİZİNİ	xiii
ŞEKİLLER DİZİNİ	xv
KISALTMALAR DİZİNİ	xx
1. GİRİŞ VE AMAÇ	25
2. KAYNAK BİLGİSİ	28
2.1. Lamiaceae Familyası.....	28
2.2. <i>Leonurus</i> L. Cinsi	30
2.2.1. <i>Leonurus</i> cinsine ait türlerin tayin anahtarı	31
2.2.2. <i>Leonurus</i> türlerinin bilinen yerel isimleri.....	32
2.2.3. <i>L. cardiaca</i> L.	32
2.2.4. <i>L. glaucescens</i> Bunge	34
2.2.5. <i>L. quinquelobatus</i> Gilib.....	35
2.2.6. <i>L. persicus</i> Boiss.....	36
2.3. <i>Leonurus</i> Türlerinin Halk Arasında Kullanımı	37
2.4. <i>Leonurus</i> Türleri Üzerine Yapılan Botanik Çalışmalar	44
2.5. <i>Leonurus</i> Türleri Üzerine Yapılan Biyolojik Aktivite Çalışmaları	48
2.5.1. Antioksidan aktivite	49
2.5.2. Antimikrobiyal aktivite	55

	<u>Sayfa</u>
2.5.3. Sitotoksik aktivite.....	56
2.6. <i>Leonurus</i> Türleri Üzerine Yapılan Fitokimyasal Çalışmalar	59
2.7. <i>Leonurus</i> Türleri Üzerine Yapılan Diğer Çalışmalar	63
2.8. <i>Leonurus</i> Türlerinde Tanımlanmış Bazı Bileşikler ile İlgili	
Genel Bilgiler.....	70
2.8.1. Verbaskozit.....	70
2.8.2. Genkvanin.....	72
2.9. Biyolojik Aktiviteler ile İlgili Genel Bilgiler	74
2.9.1. Antioksidan aktivite.....	74
2.9.2. Kanser	81
2.9.2.1. <i>Sitotoksik aktivite</i>	87
2.10. Tez Kapsamında Kullanılan SPSS Teknikleri	88
2.10.1. Kümeleme analizi.....	88
2.10.2. Ayırma analizi.....	89
2.11. Moleküler Sistemik Çalışmaları	89
2.11.1. Polimeraz zincir reaksiyonu	90
2.11.2. ITS (Internal Transcribed Spacer) bölgesi.....	91
2.11.3. DNA dizileme.....	92
2.11.3.1. <i>Sanger dizileme (Cycle Sequencing) yöntemi</i>	92
2.11.4. Filogenetik analiz	93
3. GEREÇLER.....	95
3.1. Deneysel Çalışmalarda Kullanılan Materyaller, Kimyasal Madde	
ve Gereçler.....	95
3.1.1. Bitkisel materyal	95
3.1.2. Kullanılan kimyasallar	98
3.1.3. Kullanılan cihaz ve apareyler	99
4. YÖNTEMLER	100

	<u>Sayfa</u>
4.1. Botanik Çalışmalar	100
4.1.1. Morfolojik çalışmalar	100
4.1.2. İstatistiksel çalışmalar	100
4.1.3. Anatomik çalışmalar	100
4.1.4. Palinolojik çalışmalar	101
4.2. Deneysel Çalışmalar	101
4.2.1. Ekstrelerin hazırlanışı	101
4.2.2. Avrupa Farmakopesi'nde belirtilen yöntemler kullanılarak yapılan analizler	102
4.2.2.1. <i>İnce tabaka kromatografisi (İTK) ile analiz</i>	102
4.2.2.2. <i>Flavonoit Tayini</i>	103
4.3. Biyolojik Aktivite Çalışmaları	105
4.3.1. Antioksidan etkinin araştırılması	105
4.3.1.1. <i>1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH') radikalini süpürücü etki tayini</i>	105
4.3.1.2. <i>ABTS⁺radikal süpürücü etki tayini (Troloks Eşdeğeri Antioksidan Kapasite- TEAK)</i>	106
4.3.1.3. <i>Folin-Ciocalteu Reaktifi (FCR) ile Toplam Fenolik Yöntemi (Toplam Fenol Miktar Tayini)</i>	107
4.3.2. Antimikrobiyal duyarlılık testleri	108
4.3.2.1. <i>Mikro dilüsyon yöntemi ile antibakteriyel etkinin belirlenmesi</i>	108
4.3.2.2. <i>Mikro dilüsyon yöntemi ile antikandidal etkinin belirlenmesi</i>	109
4.3.3. Antikanser etkinin araştırılması	110
4.3.3.1. <i>Hücrelerin çoğaltılması</i>	110
4.3.3.2. <i>Hücrelerin plakalara ekilmesi</i>	111

4.3.3.3. <i>MTT Sitotoksosite Testinin Uygulanması</i>	111
4.4. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi/Kütle Spektroskopisi- Kütle Spektroskopisi (YPSK-KS/KS) ile Analizler	112
4.5. DNA Dizi Analizi	112
4.5.1. PCR koşulları	113
4.5.2. Dizileme ve dizi analizi	114
4.5.3. Filogenetik analiz	114
5. BULGULAR ve TARTIŞMA	115
5.1. Morfolojik Bulgular	115
5.1.1. <i>Leonurus L.</i>	115
5.1.1.1. <i>Leonurus cardiaca L.</i>	115
5.1.1.2. <i>Leonurus glaucescens Bunge.</i>	121
5.1.1.3. <i>Leonurus quinquelobatus Gilib.</i>	125
5.1.1.4. <i>Leonurus persicus Boiss.</i>	129
5.1.2. Taramalı elektron mikroskop (SEM) ile yapılan mikromorfolojik çalışmalara ilişkin bulgular.....	131
5.1.2.1. <i>L. cardiaca ile yapılan SEM çalışmaları</i>	133
5.1.2.2. <i>L. glaucescens ile yapılan SEM çalışmaları</i>	136
5.1.2.3. <i>L. quinquelobatus ile yapılan SEM çalışmaları</i>	139
5.1.2.4. <i>L. persicus ile yapılan SEM çalışmaları</i>	143
5.1.3. İstatistiksel bulgular	146
5.1.3.1. <i>Kümeleme analizi</i>	146
5.1.3.2. <i>Ayrırma (diskriminant) analizi</i>	147
5.2. Anatomik Bulgular.....	151
5.2.1. <i>L. cardiaca</i>	152
5.2.1.1. <i>Gövde</i>	152
5.2.1.2. <i>Yaprak</i>	154

	<u>Sayfa</u>
5.2.2. <i>L. glaucescens</i>	159
5.2.2.1. <i>Gövde</i>	159
5.2.2.2. <i>Yaprak</i>	161
5.2.3. <i>L. quinquelobatus</i>	165
5.2.3.1. <i>Gövde</i>	165
5.2.3.2. <i>Yaprak</i>	167
5.2.4. <i>L. persicus</i>	170
5.2.4.1. <i>Gövde</i>	170
5.2.4.2. <i>Yaprak</i>	173
5.3. Palinolojik Bulgular	177
5.3.1. <i>L. cardiaca</i>	177
5.3.2. <i>L. glaucescens</i>	179
5.3.3. <i>L. quinquelobatus</i>	180
5.3.4. <i>L. persicus</i>	181
5.4. Avrupa Farmakopesi'nde Belirtilen Yöntemler Kullanılarak Yapılan Analizlere İlişkin Bulgular	182
5.4.1. İnce tabaka kromatografisi (İTK) ile analiz.....	182
5.4.2. Flavonoit tayini.....	183
5.5. Ekstraksiyon Çalışmaları ve Ekstre Verimleri	185
5.6. Ekstrelerin Analizleri	185
5.6.1. Antioksidan aktiviteye ilişkin bulgular	185
5.6.1.1. 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH') radikalini süpürücü etki tayini.....	187
5.6.1.2. ABTS ^{•+} radikalini süpürücü etkiye ilişkin bulgular	190
5.6.1.3. Folin-Ciocalteu reaktifi (FCR) ile toplam fenolik yöntemine ilişkin bulgular	193
5.6.2. Antimikrobiyal aktiviteye ilişkin bulgular	198

5.6.2.1. Mikrodilüsyon yöntemiyle antibakteriyel etkinin belirlenmesi.....	198
5.6.2.2. Mikrodilüsyon yöntemiyle antikandida etkinin belirlenmesi.....	201
5.6.3. Sitotoksik aktiviteye ilişkin bulgular.....	204
5.7. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi/Kütle Spektroskopisi-Kütle Spektroskopisi (YPSK-KS/KS) ile Analizlerine İlişkin Bulgular	206
5.7.1. Tanımlamalar	213
5.8. Moleküler Çalışmalara İlişkin Bulgular	231
5.8.1. DNA dizileri ve benzerlik oranları	233
5.8.1.1. NS21 (<i>L. cardiaca</i>) – ITS1-ITS4.....	233
5.8.1.2. NS19 (<i>L. glaucescens</i>) – ITS2-ITS5	234
5.8.1.3. NS17 (<i>L. quinquelobatus</i>) – ITS1-ITS4.....	235
5.8.1.4. NS25 (<i>L. persicus</i>) – ITS1-ITS4.....	236
5.8.1.5. NS24 (<i>L. cardiaca</i>) – ITS1-ITS4.....	237
5.9. Morfolojik Bulguların Değerlendirilmesi	237
5.10. Anatomik Bulguların Değerlendirilmesi	245
5.11. Palinolojik Bulguların Değerlendirilmesi	247
5.12. Biyolojik Aktivite Bulgularının Değerlendirilmesi	249
5.13. YPSK/KS-KS analizine ilişkin bulguların değerlendirmesi	258
5.14. Moleküler Bulguların Değerlendirilmesi	260
6. SONUÇLAR ve ÖNERİLER.....	272
KAYNAKÇA.....	276
EKLER	
ÖZGEÇMİŞ	

TABLÖLAR DİZİNİ

Sayfa

Tablo 2.1. <i>Leonurus</i> türlerinin bilinen yerel isimleri.....	32
Tablo 2.2. <i>L. cardiaca</i> 'nın farklı ülkelerdeki kullanımları	41
Tablo 2.3. <i>L. cardiaca</i> ile farklı ülkelerde yapılan bazı biyolojik aktivite çalışmaları	54
Tablo 3.1. Bitkilerin lokaliteleri ve ESSE numaraları	96
Tablo 3.2. Deneylerde kullanılan kimyasallar	98
Tablo 3.3. Deneylerde kullanılan cihaz ve apareyler	99
Tablo 4.1. Antibakteriyal aktivite tayininde kullanılan mikroorganizmalar	109
Tablo 4.2. Antikandidal aktivite tayininde kullanılan mikroorganizmalar.....	110
Tablo 4.3. Kullanılan primer dizileri	113
Tablo 4.4. PCR'de kullanılan kimyasallar.....	113
Tablo 5.1. Farklı lokalitelerden toplanan <i>L. cardiaca</i> örneklerinin morfolojik karakterlerinin karşılaştırılması	120
Tablo 5.2. Farklı lokalitelerden toplanan <i>L. glaucescens</i> örneklerinin morfolojik karakterlerinin karşılaştırılması	125
Tablo 5.3. Farklı lokalitelerden toplanan <i>L. quinquelobatus</i> örneklerinin morfolojik karakterlerinin karşılaştırılması	128
Tablo 5.4. Taksonların benzerlik katsayılarına göre kümeleme analizi	146
Tablo 5.5. Taksonların morfolojik özelliklerinin ortalama ve standart sapma değerleri	148
Tablo 5.6. Taksonların morfolojik özelliklerine göre sınıflandırma başarısı	149
Tablo 5.7. Standartlaştırılmış ayırım fonksiyon katsayıları.....	150
Tablo 5.8. Grup ortalamalarının eşitliği testi.....	151
Tablo 5.9. Bitkilerin absorpsiyon değerleri ve flavonoid yüzdeleri	184
Tablo 5.10. <i>Leonurus</i> türlerinden elde edilen ekstraktların verimleri	185
Tablo 5.11. Ekstrelerin antioksidan aktivitelerine ilişkin bulgular.....	186
Tablo 5.12. <i>L. cardiaca</i> ekstraktlarının Trolox'a eşdeğer antioksidan kapasiteleri	191
Tablo 5.13. <i>L. glaucescens</i> ekstraktlarının Trolox'a eşdeğer antioksidan kapasiteleri.....	192

Tablo 5.14. <i>L. quinquelobatus</i> ve <i>L. persicus</i> ekstralarının Troloks'a eşdeğer antioksidan kapasiteleri	192
Tablo 5.15. <i>L. cardiaca</i> 'nın içerdği Gallik asite eşdeğer toplam fenol miktarı	194
Tablo 5.16. <i>L. glaucescens</i> 'in içerdği Gallik asite eşdeğer toplam fenol miktarı	195
Tablo 5.17. <i>L. quinquelobatus</i> ve <i>L. persicus</i> 'un içerdği Gallik asite eşdeğer toplam fenol miktarı	196
Tablo 5.18. <i>Leonurus</i> ekstralarının antibakteriyal etki sonuçları	200
Tablo 5.19. <i>Leonurus</i> ekstralarının antikandida etki sonuçları	203
Tablo 5.20. Ekstrelerin A549, C6 ve MCF7 hücre dizilerine ait IC ₅₀ değerleri.....	204
Tablo 5.21. <i>L. persicus</i> ekstralarının HPLC-MS analizleri	210
Tablo 5.22. <i>L. quinquelobatus</i> ekstralarının HPLC-MS analizleri	211
Tablo 5.23. <i>L. glaucescens</i> ekstralarının HPLC-MS analizleri	212
Tablo 5.24. <i>L. cardiaca</i> ekstralarının HPLC-MS analizleri	213
Tablo 5.25. <i>L. cardiaca</i> 'dan elde edilen dizilerin Gen Bankası'ndaki en yakın temsilcileri ve benzerlik oranları	233
Tablo 5.26. <i>L. glaucescens</i> 'ten elde edilen dizilerin Gen Bankası'ndaki en yakın temsilcileri ve benzerlik oranları	234
Tablo 5.27. <i>L. quinquelobatus</i> 'tan elde edilen dizilerin Gen Bankası'ndaki en yakın temsilcileri ve benzerlik oranları	235
Tablo 5.28. <i>L. persicus</i> 'tan elde edilen dizilerin Gen Bankası'ndaki en yakın temsilcileri ve benzerlik oranları	236
Tablo 5.29. <i>L. cardiaca</i> 'dan elde edilen dizilerin Gen Bankası'ndaki en yakın temsilcileri ve benzerlik oranları	237
Tablo 5.30. <i>Leonurus</i> türlerinin nutlet özelliklerinin karşılaştırılması	240
Tablo 5.31. <i>Leonurus</i> türlerinin morfolojik sonuçlarının Türkiye Florası ile karşılaştırılması.....	241
Tablo 5.32. İncelenen taksonlarda gövde tüy yapısının karşılaştırılması	246
Tablo 5.33. İncelenen taksonlarda yaprak tüy yapısının karşılaştırılması.....	247
Tablo 5.34. <i>Leonurus</i> polenlerinin özellikleri	248

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

Şekil 2.1. <i>L. cardiaca</i> 'nın Türkiye'de yayılış gösterdiği kareler	34
Şekil 2.2. <i>L. glaucescens</i> 'in Türkiye'de yayılış gösterdiği kareler	35
Şekil 2.3. <i>L. quinquelobatus</i> 'un Türkiye'de yayılış gösterdiği kareler	36
Şekil 2.4. <i>L. persicus</i> 'un Türkiye'de yayılış gösterdiği kareler	36
Şekil 2.5. Verbaskozitin kimyasal yapısı	71
Şekil 2.6. Genkvaninin kimyasal yapısı	72
Şekil 2.7. Antioksidan bileşenlerin sınıflandırılması	76
Şekil 2.8. DPPH' radikali	80
Şekil 2.9. ABTS'nin persülfatla oksidasyonu	81
Şekil 2.10. Normal hücre ve kanser hücresinin çoğalması	83
Şekil 2.11. MTT bileşiğinin kimyasal yapısı	88
Şekil 2.12. nrDNA'nın ITS bölgesi	91
Şekil 2.13. ITS Primerlerinin rDNA üzerindeki bağlanma bölgeleri	92
Şekil 3.1. <i>Leonurus</i> türlerinin Türkiye'deki yayılışı.....	97
Şekil 4.1. Bitki ekstraktları.....	101
Şekil 4.2. Rotavapor.....	102
Şekil 4.3. İTK plağı ve numuneler	103
Şekil 4.4. Stok solüsyonlarının hazırlanışı	104
Şekil 4.5. Test solüsyonları	104
Şekil 4.6. Kontrol ve test solüsyonları	105
Şekil 4.7. UV-spektrofotometre	107
Şekil 5.1. <i>L. cardiaca</i> genel görünüş (çiçeklenme dönemi).....	117
Şekil 5.2. <i>L. cardiaca</i> genel görünüş (meyve dönemi)	118
Şekil 5.3. <i>L. cardiaca</i> herbaryum örnekleri	119
Şekil 5.4. <i>L. glaucescens</i> genel görünüş	122
Şekil 5.5. <i>L. glaucescens</i> genel görünüş (yakın görünüm)	123
Şekil 5.6. <i>L. glaucescens</i> herbaryum örnekleri	124
Şekil 5.7. <i>L. quinquelobatus</i> genel görünüş	127
Şekil 5.8. <i>L. quinquelobatus</i> herbaryum örnekleri.....	128
Şekil 5.9. <i>L. persicus</i> genel görünüş	130
Şekil 5.10. <i>L. persicus</i> herbaryum örneği	131

Sayfa

Şekil 5.11. <i>L. cardiaca</i> gövde yüzeyi SEM görüntüsü	133
Şekil 5.12. <i>L. cardiaca</i> kaliks SEM görüntüsü	134
Şekil 5.13. <i>L. cardiaca</i> nutlet SEM görüntüsü.....	135
Şekil 5.14. <i>L. glaucescens</i> gövde yüzeyi SEM görüntüsü	136
Şekil 5.15. <i>L. glaucescens</i> kaliks SEM görüntüsü	137
Şekil 5.16. <i>L. glaucescens</i> nutlet SEM görüntüsü.....	138
Şekil 5.17. <i>L. quinquelobatus</i> gövde yüzeyi SEM görüntüsü	139
Şekil 5.18. <i>L. quinquelobatus</i> kaliks SEM görüntüsü	140
Şekil 5.19. <i>L. quinquelobatus</i> nutlet SEM görüntüsü (a).....	141
Şekil 5.20. <i>L. quinquelobatus</i> nutlet SEM görüntüsü (b).....	142
Şekil 5.21. <i>L. persicus</i> gövde yüzeyi SEM görüntüsü	143
Şekil 5.22. <i>L. persicus</i> kaliks SEM görüntüsü	144
Şekil 5.23. <i>L. persicus</i> nutlet SEM görüntüsü.....	145
Şekil 5.24. <i>L. cardiaca</i> gövde anatomisi.....	153
Şekil 5.25. <i>L. cardiaca</i> gövdesinde salgı tüyü	154
Şekil 5.26. <i>L. cardiaca</i> yaprak anatomisi.....	155
Şekil 5.27. <i>L. cardiaca</i> yaprağında örtü tüyü, salgı tüyü	156
Şekil 5.28. <i>L. cardiaca</i> yaprak alt yüz	157
Şekil 5.29. <i>L. cardiaca</i> yaprak üst yüz.....	158
Şekil 5.30. <i>L. glaucescens</i> gövde anatomisi.....	160
Şekil 5.31. <i>L. glaucescens</i> gövdesinde örtü tüyü, salgı tüyü, peltat tüy.....	161
Şekil 5.32. <i>L. glaucescens</i> yaprak anatomisi.....	163
Şekil 5.33. <i>L. glaucescens</i> yaprak alt yüz	164
Şekil 5.34. <i>L. glaucescens</i> yaprak üst yüz.....	164
Şekil 5.35. <i>L. quinquelobatus</i> gövde anatomisi	166
Şekil 5.36. <i>L. quinquelobatus</i> gövdesinde örtü tüyü, salgı tüyü, peltat tüy	167
Şekil 5.37. <i>L. quinquelobatus</i> yaprak anatomisi	168
Şekil 5.38. <i>L. quinquelobatus</i> yaprağında örtü tüyü, salgı tüyü, peltat tüy.....	168
Şekil 5.39. <i>L. quinquelobatus</i> yaprak alt yüz	169
Şekil 5.40. <i>L. quinquelobatus</i> yaprak üst yüz	170
Şekil 5.41. <i>L. persicus</i> gövde anatomisi.....	172
Şekil 5.42. <i>L. persicus</i> yaprak anatomisi	174

Şekil 5.43. <i>L. persicus</i> yaprak alt yüz	175
Şekil 5.44. <i>L. persicus</i> yaprak üst yüz.....	176
Şekil 5.45. <i>L. cardiaca</i> polenleri SEM görüntüsü.....	178
Şekil 5.46. <i>L. glaucescens</i> polenleri SEM görüntüsü.....	179
Şekil 5.47. <i>L. quinquelobatus</i> polenleri SEM görüntüsü	180
Şekil 5.48. <i>L. persicus</i> polenleri SEM görüntüsü.....	181
Şekil 5.49. İTK sonuçları	182
Şekil 5.50. Toplam flavonoit miktar tayini	184
Şekil 5.51. <i>Leonurus</i> ekstralarının DPPH' radikalini süpürme etkisinin tespiti	187
Şekil 5.52. <i>L. cardiaca</i> ekstralarının ve standartın DPPH' radikalini süpürme kapasiteleri	188
Şekil 5.53. <i>L. quinquelobatus</i> ekstralarının ve standartların DPPH' radikalini süpürme kapasiteleri	189
Şekil 5.54. <i>L. glaucescens</i> ve <i>L. persicus</i> ekstralarının ve standartların DPPH' radikalini süpürme kapasiteleri	189
Şekil 5.55. Troloks kalibrasyon eğrisi ve denklemi.....	190
Şekil 5.56. <i>L. cardiaca</i> ekstralarının Troloks'a eşdeğer antioksidan kapasiteleri	191
Şekil 5.57. <i>L. glaucescens</i> ekstralarının Troloks'a eşdeğer antioksidan kapasiteleri	192
Şekil 5.58. <i>L. quinquelobatus</i> ve <i>L. persicus</i> ekstralarının Troloks'a eşdeğer antioksidan kapasiteleri.....	193
Şekil 5.59. Gallik asit kalibrasyon eğrisi	194
Şekil 5.60. <i>L. cardiaca</i> ekstralarının toplam fenol miktarı	195
Şekil 5.61. <i>L. glaucescens</i> ekstralarının toplam fenol miktarı	196
Şekil 5.62. <i>L. quinquelobatus</i> ve <i>L. persicus</i> ekstralarının toplam fenol miktarı	197
Şekil 5.63. <i>Leonurus</i> ekstralarının antibakteriyal etkisinin tespiti.....	198
Şekil 5.64. <i>Leonurus</i> ekstralarının antikandidal etkisinin tespiti	201
Şekil 5.65. <i>L. persicus</i> MeOH ekstresi HPLC-MS/MS analizinde elde edilen DAD kromatogramı.....	207

Şekil 5.66. <i>L. persicus</i> infüzyon HPLC-MS/MS analizinde elde edilen DAD kromatogramı.....	207
Şekil 5.67. <i>L. quinquelobatus</i> alkollü ekstresi tüm kromatogramlar çakıştırılmış.....	208
Şekil 5.68. <i>L. glaucescens</i> alkollü ekstresi tüm kromatogramlar çakıştırılmış.....	208
Şekil 5.69. <i>L. cardiaca</i> alkollü ekstresi tüm kromatogramlar çakıştırılmış	209
Şekil 5.70. Deoksigeniposidik asit Chemdraw ile çizilmiş parçalanmaları	217
Şekil 5.71. Loganik asit kütle spektrumu.....	217
Şekil 5.72. Protokateşik asit heksozit kütle spektrumu.....	218
Şekil 5.73. Kafeoil heksozit kütle spektrumu	218
Şekil 5.74. Kafeik asit kütle spektrumu	219
Şekil 5.75. 5-kafeoilkinik asit kütle spektrumu	219
Şekil 5.76. Lavandulifoliosit kütle spektrumu	220
Şekil 5.77. Kersetin heksozit kütle spektrumu.....	220
Şekil 5.78. Kersetin diglukozit kütle spektrumu.....	221
Şekil 5.79. Kersetin asetilheksozit	221
Şekil 5.80. Kersetin rutinozit kütle spektrumu.....	222
Şekil 5.81. Loganik asit veya trihidroksisinnamik asit-O-glukozit kütle spektrumu.....	222
Şekil 5.82. Verbaskozit kütle spektrumu	223
Şekil 5.83. Rozmarinik asit benzeri kütle spektrumu	223
Şekil 5.84. Rozmarinik asit CE 50	224
Şekil 5.85. Bilinmeyen kafeik asit türevi kütle spektrumu	224
Şekil 5.86. Genkvanin kütle spektrumu	225
Şekil 5.87. Apigenin glukozit kütle spektrumu.....	225
Şekil 5.88. Apigenin rutinozit kütle spektrumu	226
Şekil 5.89. Mediaresinol veya ikarisit B5 benzeri kütle spektrumu	226
Şekil 5.90. Bilinmeyen kersetin türevi CE 15	227
Şekil 5.91. Bilinmeyen kersetin türevi CE 30 361	227
Şekil 5.92. Bilinmeyen maddeye ait kütle spektrumu.....	228
Şekil 5.93. Luteolin / kamferol glukozit kütle spektrumu CE 15	228

Şekil 5.94. Luteolin/kamferol glukozit kütle spektrumu CE 50	229
Şekil 5.95. Luteolin /kamferol rutinozit kütle spektrumu	229
Şekil 5.96. Bilinmeyen maddeye ait kütle spektrumu.....	230
Şekil 5.97. Bilinmeyen maddeye ait kütle spektrumu.....	230
Şekil 5.98. <i>Leonurus</i> türlerinin ITS ile yapılan PCR görüntüsü	231
Şekil 5.99. Taksonların morfolojik özelliklerine göre yapılan kümeleme analizi dendogramı	243
Şekil 5.100. Taksonların morfolojik özelliklerine göre yapılan ayırma analizinin grafiksel gösterimi.....	244
Şekil 5.101. <i>Leonurus</i> ekstrelerinin toplam fenol miktarı.....	251
Şekil 5.102. <i>Leonurus</i> ekstrelerinin DPPH' radikalini süpürme kapasiteleri	252
Şekil 5.103. <i>Leonurus</i> ekstrelerinin Troloks'a eşdeğer antioksidan kapasiteleri.....	253
Şekil 5.104. <i>Leonurus</i> ekstrelerinin C6 hücre dizilerine karşı IC ₅₀ değerleri	256
Şekil 5.105. Taksonların ITS baz dizilimlerine göre oluşturulan filogenetik ağaç (dış grup <i>Verbena officinalis</i>).....	264
Şekil 5.106. Taksonların ITS baz dizilimlerine göre oluşturulan filogenetik ağaç (dış grup <i>Galeopsis bifida</i>).....	265
Şekil 5.107. <i>L. cardiaca</i> 'nın (NS21) ITS baz dizilimlerine göre (ITS1-ITS4) oluşturulan filogenetik ağaç.....	266
Şekil 5.108. <i>L. quinquelobatus</i> 'un ITS baz dizilimlerine göre (ITS1-ITS4) oluşturulan filogenetik ağaç.....	267
Şekil 5.109. <i>L. glaucescens</i> 'in ITS baz dizilimlerine göre (ITS2-ITS5) oluşturulan filogenetik ağaç.....	268
Şekil 5.110. <i>L. persicus</i> 'un ITS baz dizilimlerine göre (ITS1-ITS4) oluşturulan filogenetik ağaç.....	269
Şekil 5.111. <i>L. cardiaca</i> 'nın (NS24) ITS baz dizilimlerine göre (ITS1-ITS4) oluşturulan filogenetik ağaç.....	270

KISALTMALAR DİZİNİ

A	: Absorbans
ABTS	: 2,2'-Azino-bis (3-etilbenzotiyazoline-6-sulfonik asit)
ae	: Alt epiderma
AEF	: Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Herbaryumu
AFLP	: Amplified Fragments Length Polymorphisms
ANK	: Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Herbaryumu
Amp	: Ampisilin
Amp-B	: Amfoterisin
A549	: İnsan akciğer karsinoma hücre dizisi
APG4	: Angiosperm Phylogeny Group
ASFV	: Afrika domuz gribi virüsü
ATCC	: American Type Culture Collection
ATP	: Adenozin trifosfat
BE	: Brakte eni
BB	: Brakte boyu
BLAST	: Basic Local Alignment Search Tool
BR	: Brakteol
BS	: Brakte sapı
BuOH	: Butanol
C6	: Sıçan glioma hücresi dizisi
CCRF-CEM	: Akut lenfoblastik lösemi hücre hattı
CFU	: Koloni oluşturan ünite
CLSI	: Clinical and Laboratory Standards Institute (Klinik ve Laboratuvar Standartları Enstitüsü)
COX-2	: Siklooksijenaz enziminin izoformu
CUPRAC	: Bakır (II) İyonu İndirgeme Esaslı Antioksidan Kapasite
DAD	: Diode array detector
DHBV	: Ördek hepatit B virüsü
DMSO	: Dimetilsülfoksit
DNA	: Deoksiribo Nükleik asit
dNTP	: Deoksinükleotittrifosfat
DOX	: Dokсорubisin

DPPH*	: 1,1-Difenil-2-pikril hidrazil radikali
E	: Ekvatorial eksen
EC ₅₀	: Maksimum inhibisyonun %50'sini oluşturan doz
EDTA	: Etilen diamin tetra asetik asit
EMA	: Avrupa İlaç Ajansı
en	: Endodermis
ESI	: Elektro Sprey İyonlaşma
ESSE	: Anadolu Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Herbaryumu
df	: Serbestlik derecesi
F	: Test değeri
FASTA	: DNA ve protein dizisi hizalama yazılım paketi
FCR	: Folin-Ciocalteu Reaktifi
fl	: Floem
FRAP	: Demir indirgeyici antioksidan güç
GABA	: Gamma-aminobutirik asit
GAE	: Gallik Asit'e Eşdeğer
GAZİ	: Gazi Üniversitesi Fen Fakültesi Herbaryumu
GBB	: Gövde boyu
GBE	: Gövde eni
GC-FID	: Gaz Kromatografisi-Alev İyonlaşma Dedektör
GC-MS	: Gaz Kromatografisi-Kütle Spektrometresi
HCV	: Hepatit C virüsü
HepG2	: İnsan hepatokarsinoma hücre hattı
HIV	: İnsan Bağışıklık Yetmezliği Virüsü
HPLC	: Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi
HPLC-DAD	: Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi
HPTLC	: Yüksek Performanslı İnce Tabaka Kromatografisi
HPV	: İnsan papilloma virüsü
HSV-1	: Herpes simpleks virüsü tip 1
HSV-2	: Herpes simpleks virüsü tip 2
HUEF	: Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Herbaryumu
IC ₅₀	: Maksimum inhibisyonun %50'sini oluşturan doz
INF	: İnfüzyon

ITS	: Internal Transcribed Spacers
id	: İletim demeti
İTK	: İnce Tabaka Kromatografisi
KA	: Kaliks
Keto	: Ketokonazol
kl	: Klorkima
Klr	: Kloramfenikol
KO	: Korolla
ko	: Kollenkima
KR	: Korolla rengi
ks	: Ksilem
KT	: Kaliks tüpü
ku	: Kütikula
K-562	: Kronik myeloid lösemi hücre hattı
KVH	: Kardiyovasküler hastalıklar
LC-MS/MS	: Sıvı Kromatografisi Kütle Spektrometresi
LH	: Leonurin hidroklorid
LM	: Işık Mikroskobu
M	: Metanol
MCF7	: İnsan meme adenokarsinoma hücre dizisi
MEGA	: Molecular Evolutionary Genetics Analysis
MeOH	: Metanol
MHB	: Mueller Hinton Broth
MİK	: Minimum inhibisyon konsantrasyonu
ML	: Maximum likelihood metodu
mRNA	: Messenger RNA
MTT	: (3-(4,5-Dimetiltiyazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür)
<i>m/z</i>	: Kütle/yük
NCBI	: Ulusal Biyoteknoloji Bilgi Merkezi
NSCLC	: Küçük hücreli olmayan akciğer kanseri
NU	: Nutlet
OD	: Ortalama değer
ö	: Öz

öt	: Örtü tüyü
P	: Polar eksen
PCR	: Polymerase Chain Reaction
PDA	: Photo-diode array
Ph. Eur.	: European Pharmacopoeia
PP	: Fenilpropanoit
pp	: Palizat parenkiması
ps	: Periskl
PPG	: Fenilpropanoit glikozitler
PZR	: Polimeraz zincir reaksiyonu
q-NMR	: Kantitatif nükleer manyetik rezonans
RAPD	: Rastgele çoğaltılmış polimorfik DNA
rDNA	: Ribozomal DNA
RFLP	: Restriksiyon parça uzunluk polimorfizmi
RNS	: Reaktif nitrojen türleri
ROS	: Reaktif oksijen türleri
RPMI	: Roswell Park Memorial Enstitüsü Kültür ortamı
RSV	: Respiratuvar sinsityal virüs
Rt	: Tutunma zamanı
RE	: Rutin'e Eşdeğer
S	: Stoma
Sb	: Stoma boşluğu
SEM	: Taramalı elektron mikroskobu
Sign	: Anlamlılık
Sin	: Sinonim
SH-SY5Y	: İnsan nöroblastoma hücre hattı
SOD	: Süperoksit dismutaz
Subsp	: Alt tür
Sp	: Sünger parenkiması
SPSS	: Statistical Package for the Social Sciences
St	: Salgı tüyü
Tae	: Tannik Asit'e Eşdeğer
TAE	: Tris-Asetat-EDTA

TEAK, TEAC	: Troloks Eşdeğeri Antioksidan Kapasite
TRAP	: Toplam Radikal Yakalama Parametresi
UV	: Ultraviyole
üe	: Üst epiderma
WHO	: Dünya Sağlık Örgütü
XTT	: 2,3-bis[2-metoksi-4-nitro-5-sülfofenil]-2H-tetrazolyum-5-karboksianilit tuzu
YB	: Yaprak boyu
YPSK- KS/KS	: Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi -Kütle Spektrometrisi/ Kütle Spektrometrisi
YE	: Yaprak eni
YS	: Yaprak sapı

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Türkiye, iklimsel, edafik, coğrafik ve jeolojik çeşitlilik gibi birçok biyotik ve abiyotik farklılığa sahip olduğu için, içerdiği 10000'den fazla bitki türü ve %35 endemizm oranı ile dünyanın en önemli bitki biyoçeşitlilik merkezlerinden biridir [1].

Ülkemizde Akdeniz, İran-Turan ve Avrupa-Sibirya olmak üzere üç farklı fitocoğrafik bölge bir araya gelmektedir [2-4].

Türkiye farklı iklim kuşaklarının kesişme noktasında yer alması nedeniyle, bitki tür ve çeşitliliği açısından oldukça zengin bir ülke olup, halk arasında kullanım açısından önemli bir yeri olan Lamiaceae bitkileri bakımından da önemli bir gen merkezidir [3]. Bu familya, ülkemizin tür sayısı bakımından en zengin familyalarından olup, %44.2 endemizm oranına sahiptir

Lamiaceae (Labiatae/Balıbabagiller), Anadolu'da yaygın kullanımı olan en büyük familyalardan biridir. Familyanın etnobotanik mirası, gıda ve tıbbi amaçlar için kullanılan birçok aromatik bitki içerdiği için büyük ve önemlidir. Üyelerinin birçoğu ekime alınmış ve yenilebilir yaprakları, çiçekleri ve tohumları için yetiştirilmiştir. Büyük bir kısmı bitkisel çaylar, baharatlar, damıtılmış su veya kozmetikte kullanılan yağ olarak tüketilmek üzere doğadan toplanmaktadır [5].

Lamiaceae bitkileri, sekonder metabolitlerinin yapıları açısından çok zengin bir çeşitlilik gösterir. İridoitler, flavonoidler, rosmarinik asit, klorojenik asit, kafeik asit türevlerinin yanı sıra izoprenoitler (mono-, seski-, di-, triterpenoitler, steroidler, fitoekdisteroitler) bakımından da zengindirler. Uçucu terpenoitler ve iridoit glikozitler, Lamiaceae bitkileri arasında yararlı belirteçler sağlar. Benzer şekilde, kafeik asit türevleri de familya üyeleri için potansiyel taksonomik değere sahip olmuştur. Üstelik bu familyanın birçok bitkisi, dünyadaki uçucu yağ üretimi nedeniyle ekonomik öneme sahip olup, biyolojik ve tıbbi uygulamalarda yararlanılan çok çeşitli bitkileri bünyesinde barındırır. Bu familyanın en bilinen üyeleri *Origanum* L., *Mentha* L., *Salvia* L., *Rosmarinus* L., *Melissa* L. gibi cinslere ait olan çeşitli tıbbi ve aromatik bitkilerdir. Bu zengin yapısal çeşitlilik nedeniyle, Lamiaceae bitkileri ilaç keşif çalışmaları için çekici bir konu olmuştur. Ayrıca bitkilerin çoğu geleneksel tıpta bitkisel ilaçlar olarak da bilinmekte ve bir kısmı Türkiye'de bitki çayı olarak kullanılmaktadır [5].

İnsanlık tarihi boyunca şifalı olduğu düşünülen tıbbi bitkiler, çeşitli hastalıkları tedavi etmek için her zaman ilaç olarak kullanılmıştır [6]. Dünya Sağlık Örgütü'ne (WHO) göre, gelişmekte olan ülkelerin toplam nüfusunun yaklaşık %80'i hala esas olarak

bitki bazlı ilaçları kullanmaktadır [7]. Tedavilerin çoğunda tıbbi bitkinin özleri ve aktif bileşikleri kullanılmaktadır [8].

Günümüzde tıbbi bitkilerin bazı hastalıkları iyileştirmedeki kanıtlanmış etkinliği ve kullanımının güvenli olduğunu gösteren iddialar nedeniyle, dünyada tıbbi bitki tüketiminde de ciddi bir artış gözlenmektedir [9].

Kardiyovasküler hastalıklar (KVH) dünya çapında en yaygın rastlanan hastalıklardan biridir ve bu hastalıklara bağlı olarak ölüm oranı her yıl artmaktadır. Dünya Sağlık Örgütü, KVH'lardan ölen toplam insan sayısının dünya çapındaki ölümlerin %31'ini temsil eden yaklaşık 17.9 milyon kişi olduğunu tahmin ettiğini bildirmiştir. Bu durumdan dolayı, tıbbi değerleri bulunan bazı bitkilerin kardiyovasküler hastalıklar üzerindeki aktiviteleri ile ilgili olarak yapılan çalışmaların, kardiyovasküler hastalık yönetiminde kullanılması oldukça önemlidir. Kalp ve kan damarları bozuklukları, koroner kalp hastalığı, kalp yetmezliği, serebrovasküler hastalık (felç), kan basıncında artış (hipertansiyon) ve miyokardiyal enfarktüs, KVH'ye neden olan öncülerdir [10]. KVH'a bağlı ölümlerin %80' inden sorumlu olan koroner kalp hastalığı ve felç, beyne ve kalbe oksijen eksikliğinden kaynaklanır. Kan damarı içinde yağ birikintilerinin artması, serebral ve koroner arterlerin tıkanmasına neden olarak yol boyutlarını daraltır [11].

Kanser de önde gelen ölüm nedenlerinden biri olduğu için kanserle ilgili de dünya çapında araştırmalar yapılmaktadır. Kanser üzerine yapılan çalışmalar, çoğu çeşitli bitkilerden kaynaklanan biyolojik olarak aktif maddelerin, kanser hücreleri üzerindeki etkilerini incelemektedir [12, 13]. Bitki biyoteknolojisi, aktif bitki bileşiklerinin ucuza edinilmesine izin verebileceğinden bu çalışmalarda büyük bir rol oynamaktadır. Ayrıca, mevcut kanser tedavisi başarı oranı yeterli olmadığından, kanser önleyici bileşiklerin olası kaynakları olarak bitkilere ilgi artmıştır. Kanser tedavisinde gelecekte uygulanacak antikanser ajanların mekanizmalarını anlamak önemlidir. Mitokondriyal membran potansiyelinin kaybı, sitokrom C'nin salınması, apoptozu indükleyen faktör ve Bcl-2 ailesi proteinlerinin aktivitesindeki değişiklikler dâhil olmak üzere, apoptoz sırasındaki birçok önemli olay mitokondri ile yakından ilişkilidir [14]. Daha önceki çalışmalar apoptozun içsel ve dışsal yollarla indüklenebileceğini ve *Leonurus* ekstreleri ile tedaviyi takiben çeşitli derecelerde glioma hücrelerinde mitokondriyal potansiyel kaybının indüklenebileceğini göstermiştir [15].

Leonurus L. (Lamiaceae) cinsine ait türlerin, içerdikleri bileşiklerden kaynaklı olarak özellikle kardiyovasküler hastalıklar ve jinekolojik rahatsızlıklar başta olmak

üzere pek çok hastağın tedavisinde değerdendirilmeleri ile ilgili olarak birçok araştırma yapılmıştır. Geniş bir aktivite yelpazesine sahip olan *Leonurus* cinsine ait *L. cardiaca* L., *L. glaucescens* Bunge, *L. persicus* Boiss. ve *L. quinquelobatus* Gilib. türlerinin ülkemizde Marmara, Trakya ve Doğı Anadolu bölgelerinde doğıal yayılış gösterdiği bildirilmiştir [1]. *Leonurus* cinsi içerisinde yer alan türlerden biri olan ve Avrupa Farmakopesi monografı olan *L. cardiaca* ‘nın, Orta ve Kuzey Asya’da ortaya çıktığı, 17. yüzyılda Batı Avrupa’ya yayıldığı ve 19. yüzyılda sömürgeciler tarafından Kuzey Amerika’ya getirildiğı düşünölmektedir. Asya ve Güneydoğı Avrupa’ya özgü olan *L. cardiaca*, tıbbi kullanımı nedeniyle tüm dünyaya yayılmıştır [16, 17].

Kardiyak bozuklukların yanı sıra, kadınlara özgü rahatsızlıkların tedavisindeki potansiyel uygulama, *L. cardiaca*’yı hem geleneksel doğı hem de modern tıpta alternatif tedavilerin geliştirilmesi için çok iyi bir aday haline getirmiştir [16, 18]. Endikasyonlar nöropatik ve fonksiyonel kardiyak bozuklukların tedavisi içindir. Avrupa İlaç Ajansı (EMA) raporları *Leonuri cardiacae herba*’nın, bitkisel tıbbi ürünlerinin sinirlilik, sinirsel kalp şikâyetleri ve uyku bozuklukları için geleneksel kullanımını onaylamaktadır [18]. Bitkinin birçok kimyasal bileşeni (alkaloitler, iridoitler, saponinler, flavonoitler, glikozitler ve diterpenoitler) tespit edilmiş ve izole edilmiştir, ancak bunların tıbbi kullanımla ilgisi tam olarak araştırılmamıştır.

Türkiye’de yayılış gösteren *Leonurus* cinsinde yer alan türler ile ilgili olarak, sınırlı sayıda çalışma vardır. Dünya genelinde bitki preparatlarının halk arasında çok yaygın bir kullanımı olmasına karşın, *L. cardiaca* dışındaki türlerin biyolojik aktiviteleri ile ilgili bilgiler de oldukça sınırlıdır. Ülkemizde yayılış gösteren *L. cardiaca*, *L. glaucescens*, *L. persicus*, *L. quinquelobatus* türlerine ait detaylı çalışmalara rastlanmamış olması bu cinsi tercih etme sebeplerimizdendir. Türkiye Florası’nda çok yaygın olan Lamiaceae familyası türlerinin tamamlayıcı tıpta yaygın kullanımı ve birçok hastalığın tedavisinde tıbbi bitki olarak kullanılabilme potansiyelleri de oldukça önemlidir.

Bu bilgiler ışığında, tez konusunu oluşturan *Leonurus* cinsine ait türler arasındaki morfolojik karakterlerin çeşitliliğinin moleküler verilerle birlikte ortaya konmasıyla, cinsin taksonomisinin ve filogenisinin aydınlatılmasının yanı sıra, anatomik yapıları ve polen özellikleri araştırılmıştır. Ayrıca bitkilerin toprak üstü kısımlarından hazırlanan ekstrelerin biyolojik etkileri ve bu etkilerden sorumlu olabilecek bileşikler YPSK- KS/KS analizleri ile belirlenmeye çalışılmıştır.

2. KAYNAK BİLGİSİ

2.1. Lamiaceae Familyası

Familiya ilk kez De Jussieu tarafından 1789 yılında “Labiatae” adıyla isimlendirilmiş, daha sonra Lindley tarafından “Lamiaceae” olarak adlandırılmıştır [3, 19]. Lamiaceae 230'dan fazla cins ve yaklaşık 7200 türü ile en büyük çiçekli bitki familyalarından biri olup, hem kültürel hem de ekonomik olarak dünya çapında büyük öneme sahiptir [20]. Türkiye'de Lamiaceae, takson sayısına göre üçüncü, tür sayısına göre dördüncü, endemik tür sayısı bakımından ise üçüncü büyük familya olarak kabul edilmektedir [21]. Lamiaceae familyasını oluşturan taksonlar 7 alt familya içerisinde yer alırlar [22]. Ülkemizde 46 cins ve 782 takson (603 tür, 179 alttür ve çeşit) içeren familyadaki 346 takson (271 tür, 75 alttür ve çeşit) endemiktir (~ %44). Familyada türlerin yaklaşık %72'si en büyük 10 cins içinde bulunurken, 15 cinsin sadece bir türü vardır. 24'ü endemik olan 28 hibrit türü vardır. Takson sayısına göre en büyük beş cins, *Stachys* L. (118 takson), *Salvia* L. (107 takson), *Sideritis* L. (54 takson), *Phlomis* L. (53 takson) ve *Teucrium* L. (49 takson)'dur. Türkiye'de taksonların çoğu Akdeniz, İç Anadolu ve Doğu Anadolu coğrafik bölgelerinde yoğunlaşmıştır. Sonuçlar, Türk Lamiaceae taksonlarının çoğunun Akdeniz coğrafi bölgesinde, özellikle 283 taksonla bölgenin doğu kesiminde dağıldığını göstermiştir. Taksonların çoğu Akdeniz fitocoğrafik bölgesinde, daha sonra İran-Turan fitocoğrafik bölgesinde, az bir kısmı ise Avrupa-Sibirya fitocoğrafik bölgesinde endemiktir [23].

Türkiye'de etnobotanistler 81 familyada yaklaşık 1200 yenilebilir takson kaydetmişlerdir ve Lamiaceae 169 kayıtle en önde yer almaktadır [21]. Yenilebilir türlerin endemizm oranı Türkiye'nin tüm endemik türlerinde %2.8 (104 yenilebilir endemik/ 3649 endemik takson) iken, Lamiaceae yenilebilirlerinin endemizm oranı % 8.6'dır. Ayrıca Lamiaceae familyasında çay ve baharat gibi yenilebilir türlerin endemizm oranı %23.6'ya ulaşmaktadır. Bunlar arasında *Sideritis*, *Salvia*, *Thymus* L. ve *Origanum* türleri en yüksek sayılarla temsil edilmektedir [21].

Lamiaceae üyelerinin gövdeleri belirgin şekilde dört köşelidir ve çeşitli mekanik dokulardan (odunsu ksilem içeren vasküler demetler, sklerenkima lifleri ve kollenkima lifleri) oluşan bir dış güçlendirme çerçevesine sahiptir. Familya üyelerinin çoğu; dekussat yaprak, iki dudaklı çiçek, derin dört loblu bir ovaryum ve dört stamen taşır. Lamiaceae uzun süredir ortak karakterleri nedeniyle Verbenaceae ile yakından ilişkili olarak kabul edilmiştir [24].

Lamiaceae, Verbenaceae familyasından ginekeum ve meyve yapısı ile ayırt edilir. Çoğu Verbenaceae türü, terminal uçlu bölünmemiş bir ovaryuma sahipken, Lamiaceae dört loblu bir ovaryuma sahiptir.

Lamiaceae familyası üyeleri ağaç ve/veya çalı şeklinde olup, genellikle kokulu ve aromatikdir. Gövde sıklıkla dört köşeli ya da nadiren daha çok yaşlı kısımlarda yuvarlağımsı, dikten yatık uçta yükselen, bazen gövdeden çoğalcı uzun veya ince uzun yapıdadır. Yapraklar stipulasız, basit, bazen pinnat ve daima karşılıklı olup, dekussat dizilişlidir. Çiçekler vertisillat dizilişli, sıklıkla uçta, gevşek ya da sık şekilde dizilmiş, birleşik salkımlı, saplı veya sapsız bir çiçekli ya da daha fazla çiçekli ya da başçık şekilde düzenlenmiştir. Brakteler yapraklarda kolayca ayrılır ya da yapraklara benzer; brakteoller var ya da yoktur. Kaliks genellikle 5 loplu, üstte 3 dişli, altta 2 dişli, nadiren loblar veya dişler 1 ve 1 veya 1 ve 4 veya kaliks aktinomorfik, 5-20 damarlıdır. Korolla gamopetal, zigomorfik ve bilabiata olup, genellikle üst dudak belirsiz şekilde falkat, düz veya konkav, alt dudak 3 loplu olup, nadiren üst dudak küçülmüş ve alt dudak 5 loblu veya 1 üst ve 4 alt loblu veya korolla aktinomorfiktir. Stamenler korolla tüpüne yapışık, 4 didinam ya da 2 olup, posterior (üst) çift genellikle anterior (alt) çiftten daha kısa iken, 1 tanesi de steril şekilde ön kısımda, serbest ya da birleşik hepsi bir arada da bulunabilir. Filamentler kısa veya uzamış, genellikle taç yaprak tüpünden daha uzun ve dışarıya uzamış, bazen çok uzun şekilde tüpten uzamış; paralel, birbirlerinden ayrılmış ya da uçta yükselici şekildedir. Ovaryum üst durumlu, 2 karpelli, 4 loblu, stilus ginobazik, stigma bifid [3].

Yaprakların dekussat dizilişli olması, vertisillastrum durumunda çiçeklerin bulunması, kaliks ve korollanın bilabiata oluşu, stilusun ginobazik stigmanın bifid olması ve meyvanın 4 nuksa ayrılması gibi özellikler, bu familyanın diğer familyalardan kolaylıkla ayırt edilmesini sağlamaktadır. Baş 8-16 hücreli pul şeklindeki salgı tüyleri de familya için karakteristiktir. Cinsler stamen sayısı, korolla şekli ve rengi, stamenlerin korollanın üst dudağına göre uzunluğu, tüy durumu, kaliks boyu, nutlet yapısı ve tek veya çok yıllık oluşuna göre ayrılırlar. Lamiaceae familyasında, Lamioideae'nin 63 cins ve yaklaşık 1250 türle ikinci sırada olduğu, yedi alt familya bulunmaktadır [25].

Subfam. Symphorematoideae Briq. in Engler & Prantl (1895)

Subfam. Viticoideae Briq. in Engler & Prantl (1895)

Subfam. Ajugoideae Kostel. (1834)

Subfam. Prostantheroideae Luer. (1882)

Subfam. Scutellarioideae (Dumort.) Caruel (1884)

Subfam. Lamioideae Harley

Subfam. Nepetoideae (Dumort.) Luer. (1882)

2.2. *Leonurus* L. Cinsi

Lamioideae, trikolpat ve iki çekirdekli polen, albüminli tohumlar, spatulat embriyolar, iridoit glikozitlerin varlığı ve düşük uçucu yağ içeriği ile karakterize edilir [26]. *Leonurus* L. (Familya: Lamiaceae; subfamilya: Lamioideae) cinsi, 13'ü Rusya'da olmak üzere, Dünya çapında Avrupa, Asya, Afrika ve Amerika'da yaklaşık 25 tür içerir. Cinsin Avrupa'da en tanınan üyeleri *L. cardiaca* ve *L. quinquelobatus* iken, Doğu Asya'da *L. japonicus* Houtt'tur [27]. *Leonurus* türlerinin yapraklarında; yaprak alt yüzünün üst yüze göre daha açık renkte olması, her iki yaprak yüzünün de tüylü olması, alt yüzdeki trikomların çoğunlukla damarlarda ve üst yüzdekilerin ise damarların arasında bulunması gibi benzer özellikler gözlemlendiği bildirilmiştir [28-30].

İki veya çok yıllık bitkilerdir. Yapraklar loblu veya bölünmemiş olup, kenarları kabaca dişli veya pinnatifiddir. Brakteler saplı, genellikle büyük fakat yapraklara benzemeyen, $\pm$ geriye kıvrık. Verticillastrum çiçek durumu çok çiçekli, aralıklı ve genellikle tepeye doğru yoğun olan bir spika çiçek durumuna benzer. Brakteoller linear ve subulattır. Kaliks 5 veya 10 damarlı, dişleri dikenli olup tüpten daha kısadır. Korolla belirgin şekilde 2 dudaklı, tüp tepede genişlemeyen, üst dudak miğferli, tüylü ya da arka yüzü ince uzun yumuşak tüylü olup, alt dudak 3 lopludur. Stamenler 4 tane olup, anterler düz veya farklıdır. Nutletler üç köşeli, tüylü ve tepede trunkattır. Sinonimler; *Cardiaca* Lam., *Chaiturus* Willd. [3].

Cins üyeleri, kısmi güneşli ve nemli topraklarda yayılış gösterir. Habitatlar arasında açık bozulmuş ormanlık alanlar, ormanlık yol boyları, ormanlık sınırlar ve çalılıklar, bozulmuş sulak alanların kenarları, ağaçların altındaki bahçelerin kenarları ve kısmen gölgeli çit sıraları bulunur.

Chaiturus ve *Panzerina* Soják, geleneksel sınıflandırmalarda *Leonurus* ile çeşitli şekillerde ilişkilendirilmiştir [31]. Son çalışmalarda *Chaiturus* ve *Panzerina*, *Leonurus*'tan farklı özellikler gösterdiklerinden dolayı, ayrı olarak sınıflandırılmaları

önerilmiştir [25]. *Chaiturus*’un kaliks yapısı, organların dizilişi, yaprak şekli ve kromozom sayısı bakımından, *Panzerina*’nın, korolla boyutu, rengi ve şekli ve nutletlerin yüzey morfolojisi açısından, ayrıca her ikisinin de ekolojik ve biyocoğrafik olarak *Leonurus*’tan farklı olduğu bildirilmiştir [25]. *Chaiturus marrubiastrum* (sin. *L. marrubiastrum*) Avrupa-Akdeniz bölgesinde çöplükte, atık alanlarda yetişen bir tür olup, yaygın şekilde “False motherwort, Aslancık” olarak bilinmektedir [1, 25]. *Panzerina* türlerinin ise Orta Asya’nın yarı çöllerine endemik olduğu bildirilmiştir [25]. Ilıman Asya’da yaygın olarak dağılmış olan *Lagopsis* (Bunge ex Benth.) Bunge ise, morfolojik olarak korolla ve nutlet morfolojisi bakımından *Leonurus*’tan farklıdır [25].

Leonurus cinsi türleri olan *L. cardiaca* ve *L. quinquelobatus* morfolojik olarak oldukça benzer olan iki türdür [29]. Morfolojik yakınlıkları nedeniyle, *L. cardiaca* ve *L. quinquelobatus* her zaman ayrı türler olarak değil, iki varyete veya alt tür (*L. cardiaca* altında) veya tek bir tür olarak (*L. quinquelobatus*, *L. cardiaca*’nın sinonimi olarak) ele alınmıştır [32]. Ancak, son moleküler çalışmalar, ikisinin farklı türler olarak tanınmasını desteklemektedir [33].

2.2.1. *Leonurus* cinsine ait türlerin tayin anahtarı (Flora of Turkey) [3]

1. Yapraklar bölünmemiş; korolla 5-7 mm, kaliksi geçmez ya da ucu ucuna geçer

1. *marrubiastrum* (*Chaiturus marrubiastrum* (L.) Ehrh. ex Rchb.)

1. Yapraklar 3- 5 loblu, digitat (parmaklı); korolla 9-12 mm, belirgin şekilde kaliksten uzun

2. Tüm yapraklar 3 loplu

3. *cardiaca*

2. En azından bazı yapraklar 5 loplu

3. Gövde tüyleri köşeler üzerinde, ya da hemen hemen tüysüz

2. *glaucescens*

3. Gövdenin tüm yüzeyi tüylerle kaplı

4. Gövde uzun yumuşak tüylü, tüyler 1-2 mm; yapraklar uzun yumuşak tüylü (villos)

4. *quinquelobatus*

4. Yoğun ve ince puberuloz, tüyler 0.1-0.2 mm; yapraklar ince kısa yumuşak tüylü

5. *persicus*

Türkiye Florası’nda *Leonurus* cinsinde yer alan *L. marrubiastrum* L., *Chaiturus* cinsine aktarılmıştır.

2.2.2. *Leonurus* türlerinin bilinen yerel isimleri

Yaygın olarak “Motherwort, Chinese motherwort, Yi-Mu-Cao, Lion Tail, Five Lobed Motherwort, Siberian Motherwort” olarak tanınan *Leonurus* türlerinden ülkemizde yayılış gösterenlerin bilinen yerel isimleri Tablo 2.1’de verilmiştir.

Tablo 2.1. *Leonurus* türlerinin bilinen yerel isimleri

Takson	Türkçe Adı
<i>Leonurus cardiaca</i>	aslankuyruğu [1]
<i>Leonurus glaucescens</i>	boz aslankuyruğu, öküzguyruğu [1, 34]
<i>Leonurus persicus</i>	taş aslancığı [1]
<i>Leonurus quinquelobatus</i>	beş aslankuyruğu [1]

2.2.3. *L. cardiaca* L.

L. cardiaca, özellikle sıcak bölgelerde yetişen, ülkemizde Marmara ve Trakya bölgesi’nde yayılış gösteren, yapraklarının üst yüzleri açık yeşil renkte olan, Avrupa Farmakopesi, Komisyon E Monografında kayıtlı olup, drog olarak kullanılan kısmı çiçekli dönem herbası olarak kabul edilen bir Lamiaceae familyası üyesidir [35]. Literatürde “Motherwort, Lion’s Tail” olarak tanınan bitki, ülkemizde “aslan otu, aslankuyruğu” olarak bilinmektedir [1, 36, 37]. XV. yüzyıldan beri geleneksel tıpta sinirsel ve fonksiyonel kardiyak bozukluklara karşı kullanılmakta olan türün, farmakopelerde sedatif, hipotansif ve kardiyotonik farmakolojik etkiler ürettiği yer almaktadır [35, 38-40].

Literatürde *L. cardiaca*’nın, Lamiaceae familyasının diğer üyelerinin aksine, uçucu bileşiklerin yalnızca < %0.01-0.05’ini üreten, yağ açısından fakir bir bitki olduğu bildirilmiştir [41]. Yine Ontario’da (Kanada) oldukça yaygın yabani bir tür olan *L. cardiaca* ile yapılan çalışmalarda da, bitkinin uçucu yağ açısından fakir olduğu bulunmuştur (< %0.01) [42].

Leonuri cardiaca herba (Ph. Eur.), çiçeklenme döneminde toplanan *L. cardiaca*’nın toprak üstü kısımlarından oluşur ve Avrupa Farmakopesi’ne [35] göre, hiperozit üzerinden hesaplanmış minimum %0.2 oranında flavonoit içermelidir. Bitkide monoterpenler, diterpenler, triterpenler, nitrojen içeren bileşikler, fenilpropanoitler, flavonoitler ve fenolik asitlerin yanı sıra uçucu yağlar, steroller ve tanenler grubuna ait bileşikler tanımlanmıştır. Geleneksel olarak, bitki ekstreleri, sinirsel kalp rahatsızlıkları

ve sindirim bozuklukları için dahili olarak kullanılmıştır. Bununla birlikte, bronşiyal astım, klimakterik semptomlar ve amenore için, ayrıca harici olarak yaralarda ve cilt iltihaplarında da kullanılmıştır. Hafif negatif kronotropik, hipotonik ve yatıştırıcı etkiler, bitkiye ve bunun müstahzarlarına bağlanabilir. Farmakolojik çalışmalar, antibakteriyel, antioksidan, antiinflamatuvar ve analjezik aktivitesini ve ayrıca kalp ve dolaşım sistemi üzerindeki etkilerini doğrulamıştır. Sedatif ve hipotansif aktivite klinik çalışmalarda da gösterilmiştir [43].

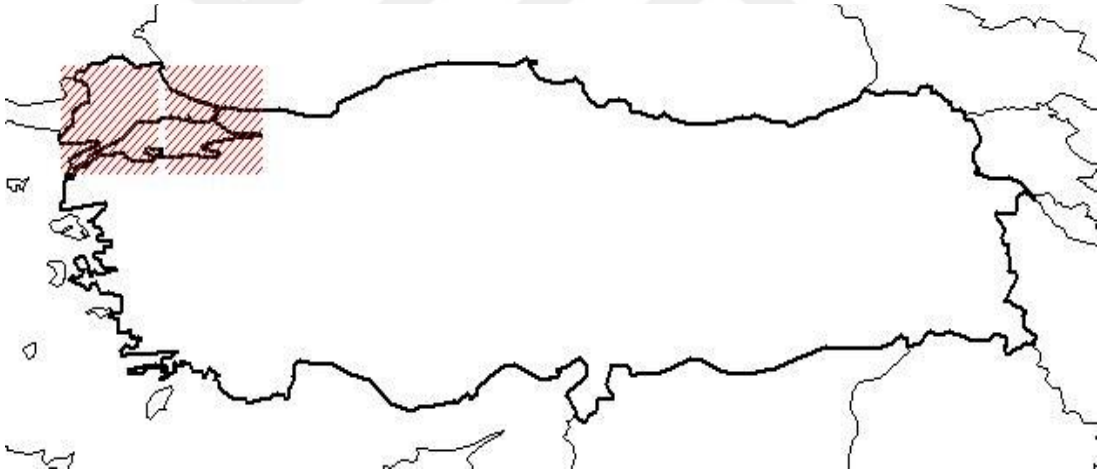
"The Complete Herbal" adlı kitapta bitkinin kalbi güçlendirmek, neşeli bir ruh hali ortaya çıkarmak ve kadın üreme sağlığını iyileştirmek için kullandığı bildirilmektedir [37]. Özellikle stresin kalp hastalıkları ile ilişkili olmasından dolayı bitki anksiyete, sinirlilik ve panik atakları azaltmak için bir sinir sistemi desteği olarak da kullanılmaktadır.

Avrupa Farmakopesi'ne göre; *L. cardiaca*'nın gövde parçaları tüylü, uzunlamasına çizgili, dörtgen, içi boş ve yaklaşık 10 mm'ye kadar genişlikte olup, yapraklar saplı, oppozit ve dekussat dizilişli, alt yapraklar ovat-orbiküler ve loblar düzensiz dişli, üst yapraklar tam veya hafif üç uçlu, lanseolat, serrat ve taban kuneattır. Üst yaprakların aksillerinde, bir spika oluşturan sapsız kıvrımlar halinde düzenlenmiş yaklaşık 6 ila 12 tane küçük çiçek taşırlar. Yaprakların üst yüzeyi dağınık tüylerle yeşil, alt yüzey soluk yeşil, yoğun tüylü olup, belirgin bir palmat ve ağsı venasyon gösterir. Kaliks 5 sert, kıvrık dişlere sahip huni şeklinde iken, korolla 2 dudaklı, üst dudak pembe ve dış yüzeyde tüylü, alt dudak morumsu lekeli, stamenler 4 tane, yoğun tüylüdür [35].

Farklı ülkelerde yayılış gösteren türlerle ilgili olarak yapılmış çalışmalarda, türlerin morfolojik deskripsiyonları yapılmış ve morfolojik özellikleri tespit edilmiştir. Buna göre; bitki çok yıllık olup, sığ lifli kökler ve rizomlardan oluşur. Gövde dik, dörtgen, çizgili, içi boş, genellikle yeşil, kırmızı-mor ve hafif tüylüdür (puberuloz). Büyüme mevsiminin sonuna doğru daha yaşlı bitkiler yayılma eğilimindedir. Oppozit yaprakların boyutu ve şekli değişkendir, ancak hepsinde seyrek tüylü uzun yaprak sapı bulunur. Gövde yaprakları genellikle ovat, üst yapraklar 3 lobludur. Üst yüzey koyu yeşil, alt yüzey açık yeşildir. Küçük, açık pembe, lila, sapsız bilabiat çiçekler, orta ve üst gövdelerde oppozit yaprakların aksillerinin üzerinde oluşur. Kaliks, dışarı doğru kıvrık, 5 mızrak şeklinde batıcı uçlu dişli olup, huni şeklindedir. Korolla yoğun bir şekilde villozdur ve kaliksten daha uzundur. Korolla boğazının yakınında mor lekeler bulunur. Stamenler korollayı aşar. Meyve, kahverengi, üçgen, 2.5-3 mm uzunluğunda bir nutlet

olup, ucu tutam şeklinde tüylüdür. Polen morfolojisi; trikolpat, subprolat, retikulat olup, polen boyutu $23.02 \pm 0.38 \mu\text{m}$ - $21.59 \pm 0.75 \mu\text{m}$ olarak bildirilmiştir. Bitkinin hoş olmayan, güçlü aromatik bir kokusu vardır ve tadı acıdır. Çiçeklenme dönemi yaz aylarında başlar ve yaklaşık 2 ay sürer. Her çiçeğin yerini üçgen ve kırmızımsı kahverengi veya kahverengi olan 4 nutlet alır. Nadiren, bitkinin *L. glaucescens* veya *Ballota nigra* L. ile tağşişinin yapıldığı bildirilmiştir [44].

Türkiye Florası'na göre *L. cardiaca*, *L. glaucescens*'ten tüm yapraklarının 3 loplu olması, hemen hemen tüysüz olması veya seyrek kısa havlı olması, loblarının genellikle derine inmeyen ve geniş olması (üst yaprakların orta lobu 20-30 x 15-25 mm); alt braktelerin 3 loplu, üstlerin de 3-dentat olması; kaliksin 6-7 mm, tüpün 3-4 mm olması, kenarlarda ince yumuşak kılsı tüylü ya da hemen hemen tüysüz olması ile ayrılır. Kuzey Batı Türkiye (Şekil 2.1), Avrupa, Güney Rusya, Kuzey Amerika'da yayılış gösteren tür, Avrupa-Sibirya elementidir [3].



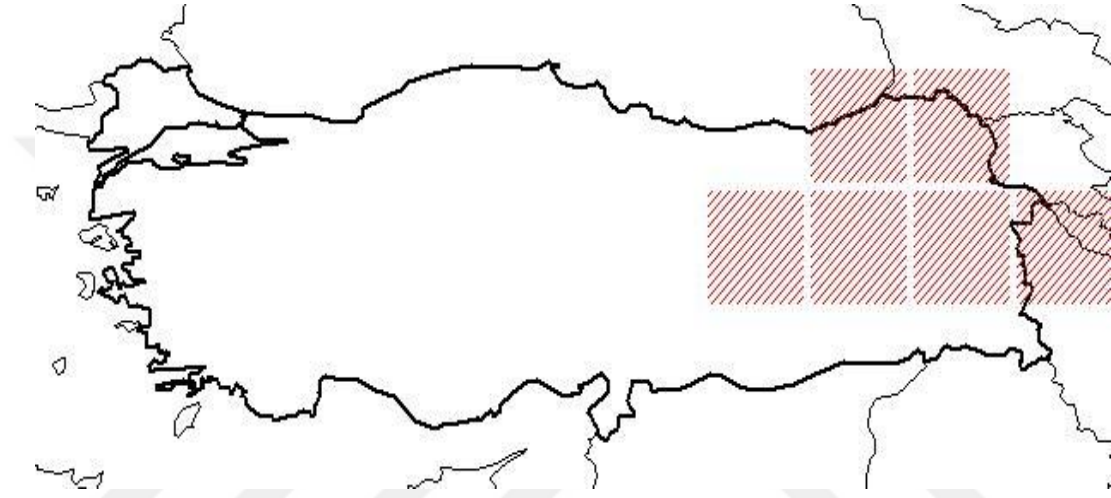
Şekil 2.1. *L. cardiaca* 'nın Türkiye'de yayılış gösterdiği kareler [45]

2.2.4. *L. glaucescens* Bunge

Türkiye Florası'na [3] göre *L. glaucescens*, çok yıllık olup, gövde morumsu, 35-75 cm ya da daha fazla, dörtgen, yoğun çok kısa tüylü 0.2-0.3 (-0.5) mm, köşelerde geriye doğru eğik tüylü ya da az tüylüdür. Ortadaki yapraklar genellikle uzun saplı (yaprak sapı 25-40 mm), lamina 40-75 x 25-75 mm, üstü koyu yeşil, altta soluk, dağınık çok kısa tüyleri olan, derinlemesine 5 loblu, orta lob yana biraz eşit olan 30-60 x 7-25 mm, dentattan pinnatifide değişir. Brakteler 3-loplu olup, alt (35) 50-65 x (11-)20-40 mm, orta lop 1.3-2 mm. Kaliks 6-9 mm, kaliks tüpü 3.5-6 mm, yoğun şekilde puberuloz tüylerle

kaplı ve 5 ayrı damarlıdır. Korolla soluk leylak rengi, 9-10.5 (-12 mm), üst dudağın arkasında ve bazen de tüp üzerinde yoğun olarak villoz tüylü; tüp içinde bir tüy halkası bulunur. Kuzeydoğu ve Doğu Anadolu (Kars, Ağrı, Erzurum) (Şekil 2.2), Güney Rusya, Kafkasya, Türkistan, Kuzey Batı ve Batı İran'da yayılış gösterir ve İran-Turan elementidir [3].

L. glaucescens türünde çiçeklenmenin uzun ve aralıklı olduğu; kaliksin dar konik, 7–8 (9) mm uzunluğunda, yoğun tüylerle kaplı; korollanın 10–12 mm uzunluğunda açık pembe renkte olduğu bildirilmiştir [46].



Şekil 2.2. *L. glaucescens*'in Türkiye'de yayılış gösterdiği kareler [45]

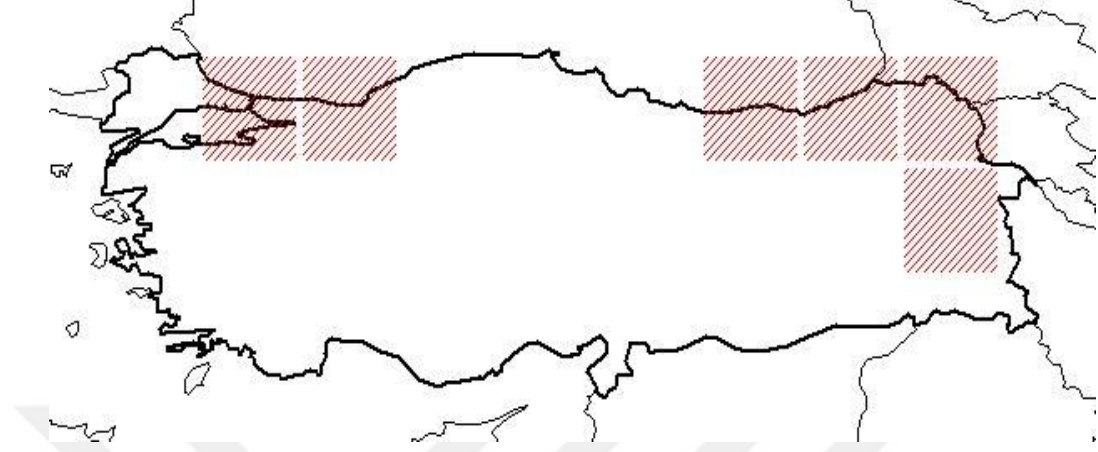
2.2.5. *L. quinquelobatus* Gilib.

L. quinquelobatus, Doğu Avrupa ve Güneybatı Asya'ya özgüdür [32, 47]. Değerli bir tıbbi bitki olarak kullanılması, Orta ve Batı Avrupa'da tanıtılmasına yol açmıştır [48]. *L. quinquelobatus* sıklıkla *L. cardiaca* ile karıştırılsa da, son yirmi yılda farklı yayılış alanlarında yapılan çalışmalarda iki ayrı tür olduklarını belirten raporlar artmıştır [32, 49, 50]. Yoğun tüylü formu ile *L. cardiaca*'dan ayırt edilen tür, ilk olarak Gilibert (1793) tarafından *L. quinquelobatus* Gilib türü olarak tanımlanmıştır [50].

L. quinquelobatus bir Avrupa-Kafkas türü olup, Avrupa, Kafkaslar, Batı ve Doğu Sibirya, Batı Asya ve Rusya'da tüm bölgelerde bulunur [51]. Genellikle boş arazilerde, yollarda, meralarda ve otlaklarda, nadas arazilerde, uçurumlarda ve nehir kıyılarında bulunan mezofit bir bitkidir [52].

Türkiye Florası'na [3] göre tür, *L. glaucescens*'e benzer. Fakat, gövde ve yapraklarda villoz tüyler yoğundur (gövdede 1-2 mm, yapraklarda 0.5-0.7 mm). Orta yaprağın sonda bulunan lobu yandakilerden belirgin biçimde büyüktür.

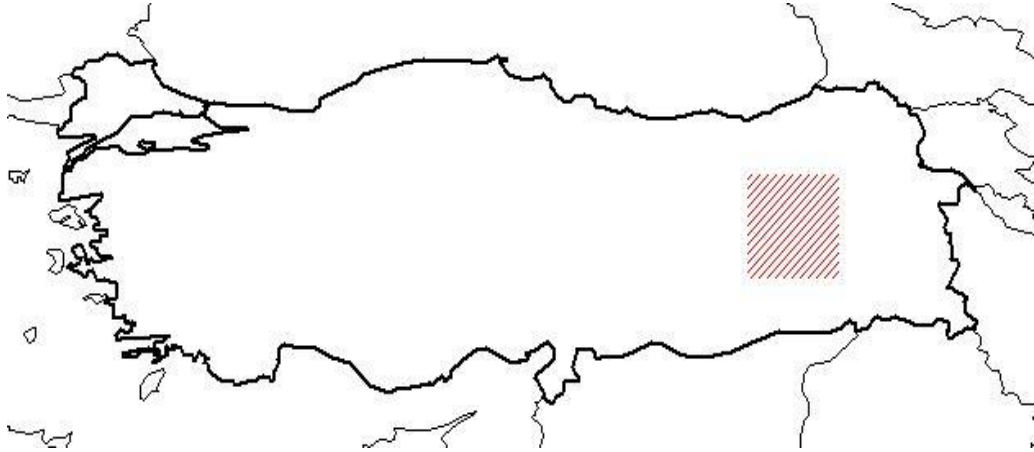
Kaliks 6-9 mm, kaliks tüpü yaklaşık 4.5 mm; korolla 10.5-12 mm'dir. Erzurum, Kars, Van, Kuzey ve Orta Avrupa, Kırım, Güney ve Orta Rusya, Kafkasya'da yayılış gösterir ve Avrupa-Sibirya elementidir. [3].



şekil 2.3. *L. quinquelobatus*'un Türkiye'de yayılış gösterdiği kareler [45]

2.2.6. *L. persicus* Boiss.

Türkiye Florası'na göre *L. glaucescens*'ten; gövdesinin her yerinin yoğun şekilde kısa havlı tüylerle kaplı (villoz) olması, yaprakların daha küçük olması (16-50 x 20-50 mm, sapları 5-15 mm) ile ayrılır. Korolla 10-12 mm'dir. Doğu Anadolu (Erzurum) (şekil 2.4), Ermenistan, Kuzey ve Batı İran'da yayılış gösterir. Türkiye ve Ermenistan  rnekleri İran örneklerinden; boylarının daha uzun olması, yapraklarının daha b y  k, korollarının daha küçük olması ile ayırt edilir. *L. glaucescens*'e geçiş gibi g r n rl r [3]. İran-Turan elementidir.



şekil 2.4. *L. persicus*'un Türkiye'de Yayılış gösterdiği kareler [45]

2.3. *Leonurus* Türlerinin Halk Arasında Kullanımı

Tıbbi bitkiler, insan uygarlığının başlangıcından beri ilaç yapımında önemli bir rol oynamakta ve günümüzde de ilaç üretimine önemli ölçüde katkıda bulunmaktadır [10]. Bitkiler zengin bir ilaç kaynağı olarak, sağlık hizmetlerinde hayati bir rol oynamaktadır. Araştırmalar, birçok gelişmekte olan ülkede çok sayıda insanın birincil sağlık ihtiyaçlarını çözmek için geleneksel şifalı bitkilere ve geleneksel uygulayıcılara büyük ölçüde güvendiğini göstermektedir.

Gelişmiş ülkelerde de, modern ilaçlar yaygın bulunmasına rağmen, alternatif tedavilere yönelik eğilimin yükselişte olduğu bildirilmiştir. Ek olarak, eczanelerde bulunan morfin, efedrin, digitoksin, aspirin, pilokarpin, reserpin ve vinblastin gibi birçok modern ilaç, doğrudan veya dolaylı olarak bitkilerden sağlanmaktadır. Ancak bazı bitkisel maddelerin (kinidin gibi) antiaritmik etkileri ya da bazılarının (*Opium* gibi) aritmojenik etkileri olabilir [53].

Tahminlere göre dünya çapında 70000 kadar bitki türü etnomedikal olarak kullanılmaktadır [7]. Anadolu tıbbi mirası incelendiğinde Lamiaceae familyasının en popüler aileler arasında kabul edildiği görülmektedir. Türkiye'de tedavide kullanılan ilaçların kontrol listesi araştırmasında, 113 familyada 1057 takson kaydedilmiş olup, Lamiaceae'nin 148 taksonla ilk sırada yer aldığı bildirilmiştir [5].

“Motherwort” olarak bilinen *Leonurus* türlerinin, eski çağlardan beri iyi bilinen tıbbi bir bitki olduğu, Tibet'te, yaklaşık iki bin yıl önceden bugüne tıbbi amaçlar için kullanıldığı, Ortaçağ'da yatıştırıcı bir preparat olarak akciğer ve kalp hastalıklarında kullanıldığı, üniversite bahçeleri ve manastırlarda pencerelerin altında yetiştirildiği, Rusya'da öksürük ve çarpıntıları hafifleten bir araç olarak kullanımının 1485 yılına kadar uzandığı, Avrupa'da ise Theophrastus ve Dioscorides'ten beri bilindiği bildirilmiştir [54]. Paracelsus ve Fuchs, taşikardi ve konvülsiyonlar için *Leonurus* infüzyonunu önermiştir. Antik Yunanistan'da bu bitkinin, hamile kadınlara endişelerini gidermek için verildiği bildirilmiştir [54].

Leonurus ilaçları, merkezi sinir ve kardiyovasküler sistemlerin işlevsel durumunu düzenlemenin bir yolu olarak yaygın şekilde kullanılmaktadır. Polonya'da sinirlilik, kalp hastalıkları, miyokardit, histeri ve solunum hastalıkları için önerilmektedir [43]. Bulgaristan'da *L. cardiaca*'nın özellikle antikonvülsan, diüretik, sedatif etkili olarak, ayrıca menopoza, ağrılı adet kanaması ve anemide kullanıldığı [55], Hindistan'da da mide uyarıcı ve terletici olarak kullanıldığı bilinmektedir. Ayrıca Çek Cumhuriyeti, Slovakya,

Macaristan ve Romanya'da *Leonurus* kalp atış hızı ve kalp ağrısı için reçete edilirken; İngiltere'de histeri, nevroz ve kalp zayıflığı için tavsiye edilmektedir [54].

Çin tıbbında *Leonurus*, uterus kanaması ve endometrit durumunda, hipotansif, kan dolaşımını iyileştiren ve uyarıcı ilaç olarak bir stiptik olarak kullanılır. Bitkinin deoksiasiyonunun, adrenalinin damarlar üzerindeki etkisini azalttığı bildirilmiştir. Bazı cilt hastalıkları için haricen herba ve tohumlar uygulanır [56].

Geçtiğimiz yüzyılın 50'li yıllarının sonlarında, Bulgar bir farmakolog ekibi, Bulgaristan topraklarında yetişen *L. cardiaca* 'nın farmakolojik özelliklerini incelemiş ve epilepsi tedavisinde antikonvülsan aktivitesini ve etkinliğini kanıtlamıştır [54]. Ayrıca Belarus Cumhuriyeti Devlet Farmakopesi, standardizasyonunun toplam iridoit miktarına göre yapılması (garpagid asetatın min. %0.4) önerilen Leonuri folia üzerine bir monograf içermektedir [57].

Leonurus cinsine ait bitkiler geleneksel olarak Doğu Asya'da yaygın şekilde antijinekolojik bozukluklar için, Avrupa'da ise daha çok sedatif etkili olarak kullanılmaktadır. Bu cins üzerine yapılan kimyasal araştırmalar, doğal ürünler kütüphanesini zenginleştirmiş ve ayrıca geleneksel kullanımı yaygın olan bitkinin farmakolojik uygulamalarını da genişletmiştir [58].

Çin'de "annelerin yararına olan bitki" (the herb to benefit the mothers) olarak bilinen *Leonurus* cinsi üyeleri, jinekolojik ve obstetrik rahatsızlıkları tedavi etmek için kullanılmaktadır. "Yi-Mu-Cao" olarak tanınan *L. japonicus* bitkisinin kurutulmuş toprak üstü kısımları, Çin tıbbında en çok kullanılan droglardan biridir ve kurutulmuş meyveler, "Chong-Wei-Zi" adı verilen ayrı bir bileşen olarak kullanılır [58].

Leonurus türlerinin geleneksel olarak kullanımlarında, sıklıkla hormonal, sinir ve kalp sistemleri üzerinde tonik etkileri olan sakinleştirici ve gevşetici bir bitkisel madde olarak tercih edildiği görülmektedir.

Leonurus, özellikle stres ve anksiyetenin sebep olduğu kalp ve kan basıncı sorunlarını (çarpıntı ve taşiaritmiler) tedavi etmek için kullanılmıştır. Bitki türleri, koroner arter hastalığı ve serebral iskemi için de kullanılmaktadır. *Leonurus* ayrıca, doğumdan önce ve sonra galaktogog ve uterus toniği olarak yüzyıllardır kullanılan bir bitkidir. Muhtemelen hem hormonal hem de vasküler etkilerden dolayı emenagog etkilere sahip olması, amenore, doğurganlık, adet rahatsızlıkları ve tiroid bozuklukları dahil olmak üzere çeşitli jinekolojik ve obstetrik durumları tedavi etmek için kullanılmıştır

[59]. *L. cardiaca*, kalbin hareketini çeşitli nedenlerden dolayı düzeltme kabiliyeti nedeniyle, genellikle kardiyotonik olarak adlandırılmaktadır.

“Bartram's encyclopedia of herbal medicine” isimli kitapta, *L. cardiaca*’nın; İngilizce’de “Motherwort”, Almanca’da “Herzgespann”, Fransızca’da “Agripaume”, İspanyolca’da: “Agripalma”, İtalyanca’da “Cardiaca” olarak bilindiği, kullanılan kısmının herbası olduğu, antispazmodik, müshil, terletici, emenagog, vazokonstriktör, hipotansif ve kardiyotonik etkilerinden dolayı halk arasında kalbi güçlendirmek, egzersiz süresini uzatmak, hiperaktif tiroidden kaynaklanan taşikardi, hipertansiyon, menstrüasyonu düzenlemek, regl ağrısını ve adet öncesi gerginliği azaltmak, menopoz sıkıntılarını hafifletmek amacıyla kullanıldığı bildirilmiştir. Ayrıca kitapta, “Motherwort çayı için ve sizi bekleyen mirasçılara sürekli bir şaşkınlık ve hayal kırıklığı kaynağı olmak için yaşayın” şeklinde bir atasözü bulunur. Bitkinin kalp hastalıkları için, *Crataegus* ve *Lilium* ile birlikte eşit ölçüde hazırlanan preparatlarının kullanılabileceği de yer almaktadır [60].

L. cardiaca Avrupa’da geleneksel olarak; kadın hastalıklarının tedavisinde, anksiyete, depresyon, sinirlilik gibi nörolojik bozuklukların tedavisinde ve uykusuzluk için bir yatıştırıcı olarak kullanılır [61-63]. Yapraklar antispazmodik, astrenjan, kardiyak, diyaforetik, stomaşik, tonik ve uterus uyarıcısıdır [64, 65]. Literatürde sıklıkla “Motherwort” olarak bilinen *L. cardiaca* aynı zamanda “kırlangıç otu, aslan kulağı veya aslankuyruğu” olarak da bilinir. Yüzyıllar boyunca, kalp ve damar hastalıklarını, özellikle anksiyete, gerginlik ve stres ile ilişkili taşikardi ve ayrıca arter kireçlenme oluşumunu engellemek için, tromboz riskini azaltmak için hipertansiyonu tedavi etmek için tıbbi bir bitki olarak kullanılmıştır [18].

L. cardiaca (Motherwort) antibakteriyel, antioksidan, kanser önleyici, immun sistem uyarıcı, emenagog, antispazmodik, hipotansif, diüretik, sedatif, antiinflamatuvar ve analjezik aktivitelere sahip olup, kalp fonksiyonunu ve kan dolaşımını iyileştirmek için tamamlayıcı bir çare olarak kullanılır. Avrupa ve Doğu tıbbında çeşitli hastalık türlerine karşı kullanılan bitki, özellikle hızlı kalp atışını yavaşlatması, kas spazmlarını azaltması ve kan basıncını geçici olarak düşürmesi nedeniyle kalp sorunları için yararlıdır. Böylesine geniş farmakolojik etkilerin, içerdiği uçucu yağlar, alkaloidler (stakidrin, leonurin), glikozitler, flavonoidler, terpenoidler (ursolik, krosolik, öksafik asitler) ve tanenlerden kaynaklandığı bildirilmiştir [43, 64, 66]. Ayrıca, literatürde *L. cardiaca*’nın toprak üstü kısımlarından hazırlanan çay preparatları ve alkollü tentürlerinin de

yüzyıllardır depresyon, anksiyete veya stres gibi çeşitli sinir rahatsızlıklarının tedavisinin yanı sıra taşiaritmi, kalp yetmezliği ve diğer kalp rahatsızlıklarına karşı bir çare olarak kullanıldığı yer almaktadır [18, 67].

İran geleneksel tıbbında *L. cardiaca*'nın tonik, antikonvülsan, büzücü, balgam söktürücü ve kardiyotonik olarak ve yaraların iyileşmesi için harici olarak kullanımları söz konusudur [42].

Geleneksel olarak, antik çağlardan beri halk hekimliğinde, Kazakistan'da yayılış gösteren ve “Turkestan motherwort” olarak bilinen *L. turkestanicus* V.I.Krecz.&Kuprian'ın toprak üstü kısmının dekoksasyonunun kalp, mide ve sinir sistemi hastalıklarının tedavisi için kullanıldığı bildirilmiştir [57]. Ayrıca infüzyonunun da sinir sistemi bozuklukları, hipertansiyon, epilepsi, taşikardi ve gastrointestinal hastalıkların tedavisinde, uykuya yardımcı, terletici, laksatif ve antiinflamatuvar ajan olarak kullanımı söz konusudur [57].

Önceleri Asya ve Güneydoğu Avrupa'ya özgü olan *L. cardiaca*, tıbbi kullanımı nedeniyle tüm dünyaya yayılmıştır [16, 17]. Kardiyovasküler hastalıkların tedavisindeki etkilerinin yanı sıra, kadınlara özgü rahatsızlıkların tedavisindeki potansiyel uygulama, *L. cardiaca*'yı hem geleneksel doğu hem de modern tıpta alternatif tedavilerin geliştirilmesi için çok iyi bir aday haline getirmiştir [16, 68]. Avrupa İlaç Ajansı (EMA), farklı ekstraksiyon yöntemleri uygulanarak seçici olarak zenginleştirilebilen *L. cardiaca* ilaçları olarak bitkinin hem sulu hem de etanol ekstraktlarını önermektedir [18, 69]. Ayrıca bu bitki Komisyon E Monografı tarafından, sinirsel kardiyak bozukluklar ve tiroid hiperfonksiyonu için bir adjuvan olarak onaylanmıştır [70].

EMA'nın “Assessment report on *Leonurus cardiaca* L., herba” başlıklı raporunda [18]; *L. cardiaca*'nın, Fransa, Almanya, Polonya, Letonya, Litvanya ve Macaristan gibi pek çok ülkede uzun yıllardır, tek başına kullanıldığı yer almaktadır. Ayrıca rapora göre, farklı ülkelerde, *L. cardiaca*'nın farklı bitki türleri ile karışımları da uzun yıllardır kullanılmaktadır. *L. cardiaca*'nın farklı ülkelerdeki kullanımları ile ilgili bilgiler Tablo 2.2'de verilmiştir.

Tablo 2.2. *L. cardiaca* 'nın farklı ülkelerdeki kullanımları [18]

Preparat	Kullanıldığı ülke	Kullanım amacı
Leonuri herba, Melissa folium, Viola herba, Crataegi inflorescentia (22 yıllık kullanım)	Polonya	Sinirsel kalp şikâyetleri
Crataegi folium, Crataegi fructus, Leonuri cardiaca herba, Meliloti herba (6 yıllık kullanım)	Polonya	Sinirsel kalp şikâyetleri
Lupuli strobulus, Melissa folium, Leonuri cardiaca herba, Lavandulae flos, Archangelicae radix, Rosae fructus (19 yıllık kullanım)	Polonya	Sinirsel aşırı heyecan
Chamomillae anthodium, Melissa folium Valerianae radix, Leonuri cardiaca herba, Crataegi inflorescentia, Lupuli strobuli (15 yıllık kullanım)	Polonya	Sinir gerginliğinde adjuvan, uykuya dalmayı kolaylaştırıcı
Crataegi folium, Crataegi fructus, Leonuri cardiaca herba, Meliloti herba (16 yıl kullanım)	Polonya	Kalp etkinliği bozukluklarının başlangıç aşamasında yardımcı madde; ileri yaşta kalp zayıflığı
Crataegi sıvı ekstresi, Passiflorae tentürü Valerianae tentürü, Melissa sıvı ekstresi, Leonuri cardiaca tentürü	Fransa	Çarpıntı, uyku bozuklukları, gerginlik
Leonuri herba, Equiseti herba (34 yıldan uzun süredir)	Almanya	Kardiyovasküler sistemi destekleme
Ribis nigri folium, Crataegi summitas, Leonuri cardiaca herba, Plantaginis folium, Menthae piperitae folium, Visci albi stipes, (26 yıllık kullanım)	Macaristan	Arteriyoskleroz, hipertansiyon, kalp fonksiyonunu düzenleme
Crataegi folium, Leonuri cardiaca herba, Melissa herba, Visci albi stipes, Valerianae radix (9 yıllık kullanım)	Macaristan	Kalp şikâyetlerini giderme, teskin etme, hafif hipertansiyon
Öğütülmüş Leonuri herba, bitki çayı, (infüzyon) (38 yıldır kullanım)	Letonya	MSS aşırı duyarlılığı, kalp ve kan sistemi nevrozunun tedavisi, hipertansiyonun erken dönemleri
Öğütülmüş Leonuri herba, bitki çayı (infüzyon) (55 yıldır kullanım)	Litvanya	Nörogülasyonla ilgili kalp fonksiyonu bozukluğu (Tiroid hiper fonksiyonu)

Raporda bunlara ek olarak *L. japonicus*'un herbasının ve meyvelerinin, *L. heterophyllus* Sweet türünün taze ve kurutulmuş toprak üstü kısımlarının ve olgun meyvelerinin geleneksel tıpta kullanımı da bildirilmiştir [18]. Gastrointestinal sistemin düz kaslar üzerindeki spazmolitik etkisi, ham maddenin spastik kolikte kullanılmasını açıklamaktadır, bu da sindirim bozuklukları, şişkinlik, karın ağrısı ve tekrarlayan kabızlık olarak ortaya çıkan bağırsak hareketliliğinin zayıflamasına neden olur. Mukoza zarları üzerinde büzücü etki gösteren tanenlerin varlığından ötürü, bitki hafif ishalde kullanılabilir. Halk hekimliğinde bazen idrar söktürücü, hipoglisemik ve antiepileptik bir ilaç olarak kabul edilen *L. cardiaca*'nın, yaralar, cilt sıyrıkları ve yanıklar için de haricen infüzyonu önerilir [71].

Geleneksel tıbbi kullanımın yanı sıra, *L. cardiaca* bazı mutfaklarda çeşitli sebze çorbası tariflerinde, özellikle mercimek veya bezelye tariflerinde çeşni olarak veya bira ve çayın tatlandırılması için kullanılmaktadır [17].

“Motherwort” esas olarak Avrupa tıbbında kullanılır, ancak diğer *Leonurus* türlerinin toprak üstü kısımlarının yanı sıra olgun kurutulmuş meyvelerinin de kullanımı söz konusudur. *L. japonicus* (sin. *L. sibiricus* L.)'un olgun kurutulmuş meyveleri geleneksel Çin tıbbında hipertiroidizm veya menopoz sırasında hormonal değişikliklerin neden olduğu kalp çarpıntısı ile ilgili olarak kullanılmaktadır [72].

Yaygın olarak “Chinese motherwort” olarak bilinen *L. japonicus*, Asya'ya özgü çiçekli bir bitki olup, toprak üstü kısımları ve meyveleri Çin'de binlerce yıldır kadınlarda menokseni, dismenore, amenore, vücut ödemi, oligürez, yaralar, ülserler ve diğer hastalıkları tedavi etmek için kullanılmaktadır. Türün, Çin Halk Cumhuriyeti Farmakopesi'nde [40] çok sayıda preparatı yer almaktadır. Herbanın, adet akışını yeniden sağlamak için kan dolaşımını teşvik ettiği, kanamaları ve döngüleri düzenlediği, uterotonik etkili olduğu, ayrıca Çin'deki kadınlarda vücudu iyileştirmek ve hastalıkları önlemek için başka ilaçlar veya yiyeceklerle birlikte sağlık ürünlerinde de kullanıldığı bildirilmiştir. Leonuri herba, Zingiberis rhizoma, Jujubae fructus ve esmer şeker ile hazırlanan karışımın, doğum sonrası karın ağrısını tedavi etmek için kullanımı söz konusudur. Ek olarak, *L. japonicus*'un kozmetolojide mükemmel bir etkiye sahip olup, yaşlanmayı geciktirdiği, Tang dynasty'de, Çin tarihindeki tek kadın imparator olan Zetian Wu'nun, cildini korumak ve gençleşmek için *L. japonicus*'tan yapılmış bir kozmetik kullandığı da bildirilmiştir [73].

Günümüzde de bu bitki kozmetikte yüz maskeleri veya merhemler gibi diğer güzellik ürünlerinde, diğer malzemelerle birlikte kan dolaşımını harekete geçirmek ve cilt hastalıklarını tedavi etmek için kullanılmaktadır [74].

Zihinsel stresi azaltma yeteneği nedeniyle, *L. japonicus* ilaçlarının, hipertansiyon ve uyku bozukluklarının erken evrelerinde artan sinir uyarılabilirliği için yatıştırıcı ilaçlar olarak kullanıldığı, doğal uykunun başlamasını kolaylaştırabildiği, *L. quinquelobatus* ilaçlarının ise sadece yatıştırıcı değil aynı zamanda antidepresan etkiye de sahip olduğu bildirilmiştir [27].

Bangladeş, Çin, Hindistan gibi ülkelerde halk arasında astım, kardiyovasküler hastalıklar, diyabet veya adet düzensizlikleri dahil bir dizi hastalığa karşı kullanılan Lamiaceae familyasındaki aromatik tıbbi bir bitki olan *L. sibiricus*' tan elde edilen preparatların antioksidatif, antiinflamatuvar, antimikrobiyal, hepatoprotektif ve antikanser etkileri gibi çeşitli farmakolojik özelliklere sahip olduğu bildirilmiştir [15, 75, 76].

Halk arasında *L. quinquelobatus*'un (beş loblu Motherwort) kalp aktivitesinin artırılması, kalp nevrozu, gastrointestinal ve sinir hastalıkları, baş ağrıları, akciğerlerde üşütmeye bağlı öksürük için, ayrıca romatizma, halsizlik, astım tedavisinin yanı sıra bir idrar söktürücü ve adet döngüsünü düzenleme aracı olarak da kullanımı bildirilmiştir [65, 77].

Doğu Anadolu Bölgesi'nde yapılan etnobotanik çalışmada, *L. glaucescens* türünün "Öküzguyruğu" olarak bilinmesinin yanı sıra, kökünün iltihaplı yaralar için lapa şeklinde, kalp hastalıkları için ise infüzyon şeklinde kullanıldığını bildirilmiştir [34].

Özbekistan'da, endemik *L. turkestanicus*'un hipertansiyon, sinir bozuklukları, histeri, epilepsi, taşikardi, influenza, gastrointestinal hastalıklar ve kadın hastalıklarını tedavi etmek için toprak üstü kısımlarının infüzyonunun hazırlandığı, ayrıca sedatif ve hipotansif ajan, antiinflamatuvar, terletici ve laksatif etkili olarak da kullanıldığı bildirilmiştir [78-81].

Cilt beyazlatma ve cilt sağlığı için yararlı olabilecek 25 geleneksel Çin bitkisel ilacının incelendiği bir çalışmada, *L. heterophyllus* Sweet türünün herbasının Çin geleneksel tıbbında, kan düzenleyici ajan olarak kullanıldığı bildirilmiştir [82].

Özbekistan'da endemik bir başka tür olan *L. panzerioides* Popov'un tentürü, Orta Asya geleneksel tıbbında sakinleştirici ve hipotansif bir ajan olarak kullanılır [81] ve

çalışmalar [79] bitkinin tentürünün kediotu tentüründen iki kat daha güçlü yatıştırıcı etkiye sahip olduğunu göstermiştir.

2.4. *Leonurus* Türleri Üzerine Yapılan Botanik Çalışmalar

L. cardiaca'nın, Avrupa Farmakopesi (European Pharmacopoeia) monografi bulunmakta ve ilgili monografda, droğun kısa anatomik karakterizasyonu sunulmaktadır. *L. cardiaca* için, Avrupa Farmakopesi monografisinde farklı tipte trikومlar, polenler, kaliks parçaları, perikarp gibi kısımlar mevcuttur. Avrupa Farmakopesi'ne göre *L. cardiaca*'nın yeşil tozu aşağıdaki teşhis karakterlerini göstermektedir:

Neredeyse merkeze kadar uzanan tek sıralı bir palizat ve gevşek bir şekilde düzenlenmiş süngerimsi bir parenkiması olan yaprak lamina parçaları; yaprak epidermisi parçalarında; düz antiklinal duvarları ve çizgili bir kütikülü olan üst epidermal hücreler; kıvrımlı antiklinal duvarlara sahip alt epidermal hücreler; alt yüzeyde daha çok diasitik tip stomalar; kısa sapı tek hücreli glandüler trikومlar ve 8, bazen 16 hücreye kadar hücreden oluşan küresel bir salgı tüyü; trikومları kaplayan konik, tek sıralı, yaklaşık 300 µm uzunluğa kadar, ara sıra 1500 µm'ye kadar, birleşme yerlerinde hafif şişlikler içeren 2 ila 8 hücreli çizgili kütikül; kaliks parçaları; yaklaşık 25 µm ila 30 µm çapında, 3 porlu ve 3 oluklu ve pürüzsüz bir ekzine sahip küresel polen taneleri; kalın duvarlı odunlaşmış lifler içeren gövde kısımları ve kahverengi perikarp parçaları içermektedir [35].

Leonurus türlerini ayırt etmek için önemli özellikleri korolla, kaliks ve yaprakların şekli ve dayanıklılığının boyutudur. Türlerin belirlenmesi için, tüylenme de dahil olmak üzere kaliks yapısının detayları, tüm bitkinin tüylenme şekli ve yaprak diseksiyonu modelinin çok önemli olduğu belirtilmiştir [29].

L. cardiaca ve *L. quinquelobatus*'un Rusya'nın orta ve güney kesimlerinde ve Batı Sibirya'da yaygın olduğu, her iki türün de konutların yakınında, çorak arazilerde ve yollar boyunca, genellikle yabani ot olarak büyüdüğü bildirilmiştir [83].

Kazakistan'da *Leonurus* cinsinin 4 tür içerdiği (*L. incanus* V. Krecz. et Kuprian., *L. panzerioides*, *L. glaucescens*, *L. turkestanicus*), *L. glaucescens*'in, Rusya, Kafkaslar, Batı Sibirya ve Batı Moğolistan'ın Avrupa kısmında yetiştiği, dağ yamaçlarında, nehir kıyısında, uçurum kenarında, evler ve yollar boyunca yayılış gösterdiği bildirilmiştir. Kazakistan'da yetişen *L. glaucescens* türü 50-100 cm boyunda, çok yıllık veya iki yıllık bir bitki olup, yapraklar, kısa akumbent indumentum nedeniyle parlak renkte; çiçek salkımları uzun, kaliks, 7-8 mm dar konik şekilde; korolla, 10-12 mm açık pembe

renktedir. Haziran sonunda çiçek açan bitki, Temmuz ve Ağustos aylarında meyve verir [84].

Kazakistan'da yetişen *L. turkestanicus*'un 70-200 cm boyunda çok yıllık bir bitki olup, gövdenin tüysüz veya kısa yassı tüylü, yaprakların kısa petiyollü, kaliksin 7-9 mm uzunluğunda, kıvrık, kısa ve basık tüylü, altta sivri dişlere sahip, tabanı üçgen şeklinde, korolla 1-1.2 cm uzunluğunda, soluk pembe, üst dudak beyaz-çok tüylü, alt 3 loblu, kısa içi tüylü, nutlet 2-2.5 mm uzunluğunda, 3 kenarlı, tüylü uçlu olduğu bildirilmiştir [57].

L. cardiaca, Avrupa'dan Güneybatı ve Orta Asya'dan Çin'in bazı bölgelerine kadar uzanan çok yıllık bir tür olup, Avrupa'da ovalar ve tepeler boyunca, ayrıca Doğu Asya'da Himalayalar ve Doğu Sibirya, Kuzey Afrika ve Kuzey Amerika'da yaygın olarak bulunur [43, 85].

Arizona'da yayılış gösteren *L. cardiaca* türünün 25-90 cm arasında olduğu, yapraklarının 2-5 cm saplı, orbikulat, ovat veya kordat olduğu, kaliksin 3-4(-7) mm, korollanın kırmızı-mor, 8-10 mm olduğu ve benekler taşıdığı, iç kısmının tüylü olduğu, nutletlerin yaklaşık 2 mm olduğu bildirilmiştir [86].

L. cardiaca ile *L. quinquelobatus* türlerinin Polonya'da yapılan morfolojik özelliklerinin karşılaştırmalı analizinde; *L. cardiaca*'da gövdenin tüysüz veya sadece kenarlarda kısa tüylü, kaliks ve yapraklardaki tüylerin 0.5 mm'den kısa olduğu gözlenirken, *L. quinquelobatus*'ta bitkinin yoğun ve 1 mm'den daha uzun tüylü formlarla (gövde, kaliks ve yapraklar) karakterize edildiği bildirilmiştir. Ölçülen 248 herbaryum örneğinde gövde tüyleri, tüylerin yoğunluğu, uzunluğu, yaprakların alt yüzündeki tüylerin yoğunluğu, uzunluğu, alt yaprakların boyutları ve şekli, kaliks morfolojisi gibi parametreler değerlendirilmiş, istatistiksel analizler için 44 *L. cardiaca*, 35 *L. quinquelobatus* ve ara form olarak 21 *L. intermedius* Didr. olmak üzere 100 örnek seçilmiştir. Ayrıca seçilen özelliklerin istatistiksel analizine dayalı olarak, iki bitkinin morfolojik formları ayırt edilmiş, dendogramı çizilmiş, genetik polimorfizmleri ve aralarındaki ilişkileri belirlemek için, nükleer, mitokondriyal ve kloroplast genomları RAPD (Rastgele Çoğaltılmış Polimorfik DNA) ve RFLP (Restriksiyon Parça Uzunluk Polimorfizmi) belirteçleri kullanılarak analiz edilmiştir. Karşılaştırılan RAPD profil çiftlerinin %87'sinin birbirinden farklı olduğu görülmüş, sonuçların bu formların ayrı türler olarak tanınmasını haklı çıkardığı bildirilmiştir [33].

Leonurus cinsinin de içinde yer aldığı Lamioideae, Lamiaceae'deki büyük alt familyalardan biri olsa da, bu alt familya ile ilgili olarak sınırlı filogenetik çalışma [87-

90] yayınlanmıştır ve Lamioideae içindeki filogenetik ilişkiler tam olarak anlaşılamamıştır.

Scheen ve diğerleri tarafından Lamioideae alt familyasının filogenetik analizini ortaya koymak için yapılan çalışmada, Lamioideae alt familyasının 9 tribusa (Gomphostemmateae Scheen & Lindqvist, Phlomideae Mathiesen, Leucadeae Scheen & Ryding, Pogostemoneae Briq., Synandreae Raf., Stachydeae Dumort., Leonureae Dumort., Lamieae Coss. & Germ. ve Marrubieae Vis.) bölünmesi, *Chaiturus*, *Lagochilus* Bunge ex Benth., *Leonurus* ve *Panzerina* cinslerinin Leonureae Dumort tribus olarak sınıflandırılması, küçük bir cins olan *Lagopsis*'in Leonureae içerisinde *Chaiturus*-*Leonurus*-*Panzerina* grubuna dahil edilmesi önerilmiştir. Ayrıca korolla tüpündeki kısa stamenler, palmat damarlanma ve sıklıkla elsi loblu yaprakların bu grup için sinapomorfiler olduğu bildirilmiştir. Üç küçük cins, *Lagopsis*, *Panzerina* ve monotipik *Chaiturus*, parafiletik *Leonurus* (yaklaşık 25 tür) içinde yuvalanmıştır [31].

Leonurus cinsinin Çin'de yayılış gösteren türlerinde de, nükleer DNA (ITS) ve kloroplast DNA'sı analizleri ile yapılan moleküler çalışmaların bu cinsteki taksonomik problemleri çözmede yardımcı olabileceği belirtilmiştir [91].

L. cardiaca, *L. japonicus* ve *L. sibiricus* türlerinin mikroskopik ve fitokimyasal olarak karşılaştırıldıkları çalışmada; morfolojik olarak türlerin, korolla üst ve alt dudağının şekil ve uzunluk oranlarında farklılık gösterdiği, anatomik karakterlerin ayırt edilmesinde ise, farklı organlardaki trikomların varlığının, yoğunluğunun ve boyutunun farklı olduğu bildirilmiştir [30].

Bir başka çalışmada *L. cardiaca* türünün tüm organlarının morfolojik ve anatomik özellikleri derlenmiştir [92].

İran'ın 6 farklı bölgesinde yayılış gösteren *L. cardiaca* türünün morfolojik karakterleri arasındaki korelasyon ortaya konmuştur. Popülasyonlar, *cardiaca* ve *persicus* alt türlerini temsil eden iki grupta toplanmıştır [63].

L. cardiaca internodlarının ontogenisi sırasında morfoloji, anatomi ve mekanik özelliklerdeki adaptif değişikliklerin değerlendirildiği bir çalışmada, önemli ölçüde fonksiyonel adaptasyon olduğu kanıtlanmışlardır. Geometrik-mekanik ölçümler ve hesaplamalar, orijinal birincil gövde hacmi içinde oldukça lokalize bir ikincil büyüme, (yani gövde çevresinde belirgin bir artış olmaksızın) ve doku olgunlaşması sırasında mekanik özelliklerde çok önemli değişiklikler olmaksızın, artan mekanik yüklemeye adaptif bir durumu göstermiştir. Daha genç ontogenetik aşamalarındaki hızlı adaptif

büyüme süreçlerinin, daha ileri farklı ontogenetik aşamalarındaki çok daha yavaş adaptif büyümenin bir sonucu olduğu bildirilmiştir [93].

Güney Amerika'da yayılış gösteren *L. sibiricus* türünün, gövde boyunun 40-60 cm arasında olduğu, korollanın 12-15 mm, kaliksin 6-8 mm, nutletin boyunun 2 mm olduğu, bir diğer çalışmada yaprakların basit, dekussat, parçalı olup, mezofilin, dorsiventral olduğu, epiderminin tek tabakalı olup, anomositik tipte stomaların bulunduğu, her iki yüzeyde glandüler ve glandüler olmayan trikomlara sahip olduğu, farklı bir çalışmada da *L. sibiricus*'un ovülleri üzerindeki trikomların sapsız ve dört hücreli yapıda olan "Lamium tipine" benzediği bildirilmiştir [94-96]. Bitki gövdesinin çeşitli kısımlarında glandüler trikomların görülmesi Lamiaceae'nin bir karakteristiğidir.

Lamiaceae familyasının nutlet morfolojisini belirlemek için yapılan çalışmada, Moğolistan'dan toplanan Ajugoideae, Scutellarioideae, Nepetoideae ve Lamioideae alt familyası üyesi olan 12 cinsin 20 türüne ait farklı karakterler taramalı elektron mikroskobu (SEM) kullanılarak incelenmiştir. Nutlet morfolojisi; boyut, renk (açık turuncu-sarı, açık kahve, koyu kahve, soluk gri, siyah), şekil (obovoid, subobovoid, eliptik), yüzey süslemesi (tip I, tip II), yüzey (tüylü, tüysüz, pürüzsüz), tepe (yuvarlak, üçgen) ve taban (trunkat, akut, yuvarlak) karakterleriyle değerlendirilmiştir. Buna göre, *L. sibiricus* ve *L. deminutus* Krecz. türlerinin yüzeyi pürüzsüz olan Tip II içerisinde bulunduğu bildirilmiştir. Yine bu çalışmada, *L. sibiricus* türünde nutletin Tip II-2 içerisinde bulunup, eliptik, 3 düzleştirilmiş yüzü, açık fındık renkli, uzunluğu 2.12 mm, genişliği 1.07 mm, tepe ve taban trunkat, yüzey pürüzsüz, tüysüz, retikulat özelliklere sahip olduğu belirlenmiştir. *L. deminutus* türünde ise, nutletin Tip II-2 içerisinde bulunup, nutletin obovoid, 3 düzleştirilmiş yüzü, orta devetüyü renkli, uzunluğu 2.12 mm, genişlik 1.07 mm, tepe ve taban trunkat, yüzey pürüzsüz, tüysüz, sadece tepe tüylü, undulat özelliklere sahip olduğu bildirilmiştir [97].

Toprakta uzun süre kalabilen polen tanelerinin morfolojisi, sınıflandırma ve bitkilerin evrimsel tarihini oluşturmak için önemli bir karakter olarak kabul edilmektedir. Genel olarak, polen tanelerinin şekli, familya, cins ve tür gibi taksonomik basamaklara özgüdür. Bu nedenle önemli bir özellik olarak, polen morfolojisi genellikle sistematik problemlerin çözümünde ve filogenetik ilişkilerin ortaya çıkarılmasında kullanılmaktadır.

Lamiaceae familyasının polen morfolojisi verilerine dayalı olarak sınıflandırılması ilk olarak Gunnar Erdtman (1945) tarafından yapılmıştır. Erdtman elde ettiği polen

morfolojisi ve sitolojik verilere dayanarak Lamiaceae familyası için daha önceki araştırmacılar tarafından oldukça farklı olan yeni bir sınıflandırma ortaya atılmıştır. Erdtman (1969) Lamiaceae familyasının tozlaşma döneminde, bazı polenlerinin 2 nukleuslu bazılarının ise 3 nukleuslu olduğunu belirtmiştir. İlk bahsedilen polenlerin 3, diğerlerinin ise 6 tane apertüre (kolpus) sahip olduğuna işaret etmiştir. Erdtman'a göre homojenite göstermesinden dolayı Lamiaceae familyasının alt familyalara bölünmesi oldukça zor olup, sitolojik (nukleus sayısı) ve polen morfolojik (kolpusların sayısı) veriler arasında oldukça sıkı bir ilişki vardır [98]. Bu ilişki familyanın sistematigine yeni bir bakış açısı getirmektedir. Erdtman'ın Lamiaceae familyasını, familyadaki polenleri üç kolpuslu (trikolpat) ve altı kolpuslu (heksakolpat) olmalarına göre Lamioideae ve Nepetoideae olarak iki alt familyaya ayırması, palinolojinin Lamiaceae'nin sistematiginde önemli bir yer tuttuğu gerçeğini ortaya çıkarmıştır [26]. Bundan sonraki çalışmalarda da yine Lamiaceae'nin sistematigi polen morfolojik verilere dayalı olarak değerlendirilmiş ve Erdtman'ın verileri ile paralellik gösteren birçok veri elde etmiştir.

Leonurus cinsindeki 9 tür ve 1 varyetenin polen morfolojilerinin LM (Işık Mikroskobu) ve SEM (Taramalı elektron mikroskobu) ile incelendiği bir çalışmada, polen tanelerinin elipsoid veya subferoid olduğu, polenlerin trikolpat olduğu, kolpusların neredeyse kutuplara kadar uzandığı, ekzin ornamentasyonunun retikulat, retikulat-mikroperforat olduğu bildirilmiştir. Ayrıca, *L. cardiaca*'nın polen boyutlarının 20.5-(21.6)-4.3×15.4-(18.2)-20.5 µm ve polen şeklinin subprolat olduğu, *L. glaucescens* polen boyutlarının 16.6-(17.2)-17.8×17.8-(18.9)-20.8 µm ve polen şeklinin oblat sferoidal olduğu bildirilmiştir [99].

2.5. *Leonurus* Türleri Üzerine Yapılan Biyolojik Aktivite Çalışmaları

Leonurus türlerinin antioksidan ve radikal temizleyici özelliklerinin sıklıkla, ekstraksiyon sırasında polar fraksiyonlarda zenginleştirilmiş fenolik bileşenlerden (flavonoidler, feniletanoidler) kaynaklandığı bildirilmiştir [100, 101]. *L. cardiaca*'dan elde edilen ekstraktlar, *in vitro* çalışmalarda antioksidan aktivite göstermiş ve polifenolik bileşiklerin, özellikle flavonoidler (rutin) ve hidroksisinnamik asit türevlerinin bu etkiden sorumlu olabileceği bildirilmiştir [100, 102-105].

2.5.1. Antioksidan aktivite

Sadowska ve diğerleri tarafından yapılan çalışmada, *L. cardiaca* ekstresinin antioksidan potansiyelini belirlemek için, ABTS^{•+}, DPPH[•] ve ferrik indirgeyici antioksidan etki araştırılmış, antioksidan kapasite değerleri 350±20- 455±17 µM Troloks/g aralığında bulunmuştur [106].

İran'da doğal yetişen *L. cardiaca* türünün kurutulmuş toprak üstü kısımlarından metanolla hazırlanan ekstresinin antioksidan potansiyeli, *Grammosciadium platycarpum* Boiss. & Hausskn. ve *Onosma demawendicum* H. Riedl. ekstreleri ile karşılaştırarak değerlendirilmiştir. *L. cardiaca*'nın metanol ekstresinin DPPH[•] testi (IC₅₀: 144 ±12.1 mg /ml), demir indirgeme testi (25-100 µg/ml konsantrasyon aralığında C vitamininden üstün sonuçlar), nitrik oksit kazıma testi (IC₅₀: 0.15± 0.01 mg/ml), hidrojen peroksit süpürme etkisi (IC₅₀: 438.2 ± 21.8 µg/ml) değerlendirilmiş, sonuçlar toplam fenol içeriği (54.3±1.8 mg gallik asit/g ekstre) ile ilişkilendirilmiştir [107].

Bir başka çalışmada, İran'da yetişen *L. cardiaca* bitkisinin toplam fenolik bileşikler ile toplam flavonoit içeriği ve nitrik oksit süpürücü özellikleri arasındaki korelasyon değerlendirilmiştir. *L. cardiaca*'nın toprak üstü kısımlarından hazırlanan metanol ekstresi için toplam fenolik içeriği (54.3±2.71 mg gallik asit eşdeğeri/g ekstre), toplam flavonoit içeriği (35.2±1.76 mg kersetin eşdeğeri/g ekst) ve nitrik oksit radikalini süpürme aktivitesi (IC₅₀: 0.15±0.007 mg/ml) arasında iyi bir korelasyon olduğu bulunmuştur [108].

İçerisinde *L. cardiaca*'nın metanollü ekstresinin de bulunduğu, Romanya Lamiaceae türlerinden elde edilen çeşitli ekstrelerin antioksidan potansiyeli DPPH[•] testi, fosfomolibdenum yöntemi ve kemilüminesans testi kullanılarak değerlendirilmiş ve 5 mg/ml konsantrasyonda üç antioksidan testiyle elde edilen sonuçlar (DPPH[•] %20, toplam antioksidan kapasitesi-yaklaşık 40 mg askorbik asit eşdeğeri/g ve kemilüminesans aktivitesi için %48 antioksidan aktivite) nispeten düşük toplam fenolik içerik (2.8 mg gallik asit eşdeğeri/g ekstre) ile ilişkilendirilmiştir [109].

Yine İran'da *L. cardiaca* türü ekstresinin farklı fraksiyonlarının toplam fenolik içeriği ve antioksidan kapasitesi (DPPH[•] testi) değerlendirilmiş, en iyi sonuçlar 50:50 (h/h) metanolik-sulu fraksiyon için elde edilmiştir (toplam fenolik içerik 70.79±4.41 mg gallik asit eşdeğeri/g fraksiyon ve IC₅₀: 53.79 µg/ml) [105].

Kurutma yönteminin etkisi *L. cardiaca* kültür bitkilerinin yapraklarında Yi ve Wetzstein tarafından üç kurutma yöntemi (serada güneşte kurutma, 40°C fırında kurutma

ve 70°C fırında kurutma) kullanılarak %80 metanol ve %80 etanol ekstraktları üzerinde çalışılmıştır. En iyi sonuçlar, 40°C fırında kurutulmuş bitkilerin etanol ekstraktları için elde edilmiştir (toplam polifenolikler-yaklaşık 70 mg/g GAE, Troloks-eşdeğer antioksidan kapasitesi yaklaşık 400 mM/g TE) [110].

Litvanya’da yayılış gösteren *L. cardiaca* türünden hazırlanan sıvı ekstrenin antioksidan aktivitesini DPPH[•] ve ABTS^{•+} testleri ile değerlendirmek ve serbest radikalleri inaktive etme yeteneklerini karşılaştırmak için Bernatoniene ve diğerleri tarafından yapılan kantitatif analizde, çalışmada yer alan *Ginkgo biloba* L. ve *Crataegus monogyna* Jacq. türleri ile karşılaştırmalı değerlendirmeler yapılmıştır. DPPH[•] testindeki radikal temizleme kapasitesinin sıralaması *Crataegus* sıvı ekstresi (70.37±%0.80)> *Ginkgo* sıvı ekstresi (82.63±%0.23)> *Leonurus* sıvı ekstresi (84.89±%0.18) şeklinde iken, ABTS^{•+} reaksiyonundaki radikal temizleme kapasitesinin *Crataegus* sıvı ekstresi (87.09±%0.55)> *Leonurus* sıvı ekstresi (88.28± 1.06%)> *Ginkgo* sıvı ekstresi (88.39± 0.72%) şeklinde olduğu bildirilmiştir. Sonuçlar, DPPH[•] reaksiyon sisteminde, *L. cardiaca* sıvı ekstresinin, diğer bitkilere kıyasla daha yüksek antioksidan aktivite gösterdiğini, ABTS^{•+} reaksiyon sisteminde ise, *Ginkgo biloba* sıvı ekstresindeki antioksidan aktivitenin daha yüksek olduğunu bildirmektedir [104].

Farklı bir çalışmada, *L. cardiaca* ekstresinden elde edilen polisakkaritler, C vitamini (IC₅₀ : 7.59 ± 0.94 mg / mL) ile karşılaştırıldığında hidroksil radikallerinin (IC₅₀: 6.98± 0.87 mg / mL) çok iyi bir süpürücü aktivite sergilediği bildirilmiştir [111, 112].

Wong ve diğerleri tarafından yapılan bir çalışmada, *L. cardiaca*’nın da yer aldığı Malezya bitkilerinden elde edilen sulu ekstraktların antioksidan potansiyeli ve fitokimyasal bileşimi değerlendirilmiştir. Ekstre, bir fitokimyasal için nispeten iyi bir antioksidan potansiyeli (16 mg/ml’de %60’ın üzerinde DPPH[•] süpürme aktivitesi, 10 mg/ml’de %80’nin üzerinde NO (nitrik oksit) süpürme aktivitesi ve 10 mg/ml’de %85’in üzerinde metal şelatlama aktivitesi) göstermiş olup, toplam fenolikler (12.13 ± 0.12 mg GAE/g kuru ağırlık), toplam flavonoidler (9.86±0.15 mg kersetin eşdeğer/g dw) ve hidroksisinnamik asitlerin miktarı (2.01±0.01 mg kafeik asit eşdeğer/g dw) belirlenmiştir [112].

Bir başka çalışmada, 2020 yılında Polonya’da toplanan *L. cardiaca*’nın toprak üstü kısımlarından hazırlanmış ham ve saflaştırılmış ekstraktlar, antioksidan yetenekleri (fosfomolibdenum, DPPH[•], ABTS^{•+}, FRAP, CUPRAC ve demirli şelatlama deneyleri) ve kolinesteraz, tirozinaz, amilaz ve glukozidaza karşı enzim önleyici özellikleri açısından

test edilmiştir. DPPH[•] ve ABTS^{•+}, bitki ekstraları ile serbest radikallerin uzaklaştırılma kapasitesini tespit etmek için kullanılmıştır. Çalışma sonucunda, toplam fenolikler, radikal temizleme aktivitesi ve ekstraların indirgeme gücü arasında doğrusal bir korelasyon bulunduğu, *L. cardiaca* ekstralarında bulunan özellikle, kersetin, kafeik asit, lavandulifoliosit, verbaskozit, klorojenik asit, rutin ve ursolik asidin biyoaktivitelerdeki ana varyasyonları etkilediği gözlenmiştir. Hem serbest radikallerdeki hem de indirgeyici güç analizlerindeki en güçlü ekstraların, en yüksek seviyede toplam fenolik içerenler olduğu ve test edilen ekstelerin antioksidan özelliklerine fenolik bileşiklerin önemli katkıları olduğu da bildirilmiştir [113].

Ziyatdinova ve diğerleri tarafından, antioksidan aktivitenin değerlendirilmesi için alternatif bir yöntem olarak DPPH[•] inhibisyonu, diferansiyel puls voltametriyi kullanarak belirlenmiş ve çeşitli tıbbi bitkiler için elde edilen değerler spektrofotometrik olarak elde edilenlerle karşılaştırılmıştır. Sonuçlar, %70 etanol tentürü ile karşılaştırıldığında; *L. cardiaca* infüzyonunun diferansiyel puls voltametri ile belirlenmiş antioksidan etkisinin (diferansiyel puls voltametri ile belirlenen 32 ± 1 iken, spektrofotometre ile belirlenen 33 ± 1), %70 etanol tentürünün spektrofotometre ile belirlenen etkisinden (diferansiyel puls voltametri ile belirlenen 16.6 ± 0.4 , spektrofotometre ile belirlenen 17 ± 2) daha iyi antioksidan etki gösterdiği şeklindedir [114].

Ziyatdinova ve diğerleri, *L. cardiaca*'nın da yer aldığı, ticari olarak temin edilebilen 42 şifalı bitki tentürünün antioksidan potansiyelinin değerlendirilmesi için kronokülometrik bir yöntem tanımlamış, ayrıca antioksidan potansiyeli ile toplam fenolik içeriği arasında bir korelasyon kurmuştur. Değerlendirme sonrasında, *L. cardiaca* tentürü için nispeten düşük bir antioksidan kapasitesi (1.7 ± 0.02 mg kersetin/mL) ortaya konmuştur [115].

Mao ve diğerleri tarafından (2018), *L. pseudomacranthus* Kitag'ın toprak üstü kısımlarından hidrodistilasyon ile elde edilen uçucu yağın kimyasal bileşimi ve *in vitro* antibakteriyel aktiviteleri araştırılmış, kimyasal bileşimi GC-FID ve GC-MS ile incelenmiştir. Ayrıca uçucu yağın antioksidan potansiyeli DPPH[•], ABTS^{•+} ve FRAP testleri ile değerlendirilmiştir. Uçucu yağ için, DPPH[•] ve ABTS^{•+} yöntemlerinde IC₅₀ değerleri 1.513 mg / mL, 0.152 mg / mL iken, FRAP yönteminde Troloks eşdeğer konsantrasyonu 33.63 μ mol Troloks/g olarak belirlenmiş, uçucu yağın, daha detaylı çalışmalardan sonra ilaç ve gıda endüstrisi için umut verici bir ürün olarak görülebileceği bildirilmiştir [116].

Diğer bir çalışmada, kültüre alınan *L. cardiaca*'nın ham özü ve toprak üstü kısımlarının 4 fraksiyonu, toplam fenolik ve flavonoit içerikleri ve antioksidan aktiviteleri açısından incelenmiştir. Fenolik ve flavonoit içerikleri Folin-Ciocalteu testi ve farmakopenin önerdiği analiz kullanılarak, örneklerin antioksidan aktivitesi ise DPPH' ve FRAP testleri ile değerlendirilmiştir. Bütanolik fraksiyon, $1.735 \pm 0.07 \mu\text{mol g}^{-1}$ FRAP değeri, %57.76 DPPH' inhıbe edici yüzdesi ve en fazla fenolik içerik ($48.37 \pm 3.76 \text{ mg GAE g}^{-1}$) ile en yüksek antioksidan aktiviteyi gösterirken, en yüksek toplam flavonoit içeriği ($50.21 \pm 0.65 \text{ mg hiperoksit eşdeğer g}^{-1}$) metanolik-sulu fraksiyonda ortaya çıkmıştır. *L. cardiaca* ekstrelerinin ana antioksidanları olarak tanımlanabilecek fenoller ve antioksidan aktiviteler arasında doğrudan bir korelasyon olduğu bildirilmiştir [117].

Bir başka çalışmada da *L. cardiaca*'nın butanolik ($256.8 \pm 7.8 \text{ GAE mg g}^{-1}$) ve metanollü ($150.1 \pm 8.9 \text{ GAE mg g}^{-1}$) ekstrelerinin yüksek fenolik içeriği Matkowski ve diğerleri tarafından bildirilmiştir [100].

Matkowski ve Piotrowska tarafından *L. cardiaca*'nın metanollü ekstresinin IC₅₀ oranı yaklaşık %70-80 olarak bildirilmiş, ekstrenin toplam flavonoit içeriği ($14.35 \text{ mg hiperoksit g}^{-1}/\text{ekstre}$) de belirlenmiştir [102].

Bazı bitki özlerinin, hidroksil radikallerini temizleme özelliğine sahip olduğu ve hücrel lipitleri serbest radikal reaksiyonlarına karşı koruyabildiği bildirilen bir çalışmada, cilt beyazlatma ve cilt sağlığı için yararlı olabilecek 25 geleneksel Çin bitkisel ilacı incelenmiştir. %95 etanolla hazırlanan ekstreler insan epidermal melanositleri (HEMn) üzerinde sitotoksikite açısından test edilmiştir. Tirozinaz ve melanin inhıbe edici aktiviteler ve serbest radikal temizleme aktiviteleri üzerindeki etkileri ayrıca değerlendirilmiştir. Bitkisel ilaçlardan biri olan *L. heterophyllus* 'ta toplam fenol miktarı 29.9 mg GA/g , DPPH' yönteminde IC₅₀ değeri $>100 \mu\text{g/ml}$, hidroksil süpürücü aktivitesi ise $4.5 \mu\text{g/ml}$ olarak bildirilmiştir [82].

Oliveira ve diğerleri tarafından, *L. sibiricus* bitkisinin etanol ekstresinde gallik aside eşdeğer toplam fenol miktarı $60.1 \text{ mg gallik asit/ g ekst}$, flavonoit miktarı ise $15.4 \text{ mg kateşin/g ekst}$ olarak bulunmuştur. Yapılan HPLC analizi ile içeriğinde klorojenik, kafeik, *p*-kumarik ve ferulik asitlerin yanı sıra kersetin tanımlanan ekstrenin, DPPH', ABTS^{•+}, nitrik oksit süpürücü aktivite ve FRAP testleri ile değerlendirmeleri sonucunda antioksidan, antinosiseptif ve topikal antienflamatuvar aktivitelere sahip olduğu ve bu sonuçların bitkinin halk tıbbında kullanımını desteklediği bildirilmiştir [76].

Leonurus türlerinin toprak üstü kısımlarının, çeşitli farmakolojik özelliklerden sorumlu olan zengin bir aktif bileşik kompleksi içerdiği, içeriğe bağlı olarak da *L. cardiaca* bitkisinin, kalp yetmezliği, basit taşikardi, hipertansiyon, efor sendromu ve kalp kasını güçlendirmek için kullanıldığı bildirilmiştir [43, 118].

L. cardiaca bitkisinin etanol ekstresindeki biyoaktif bileşenler; klorojenik asit, orientin, kersetin, hiperosit ve rutin olarak belirlenmiş ve ekstrenin kalp kaslarını patojenik süreçlerin etkilerinden korumak için yararlı olabileceği bildirilmiştir [66].

Son çalışmalarda *L. cardiaca*'nın süperoksit dismutaz ve glutatyon peroksidaz aktiviteleri üzerinde önemli bir koruyucu etkiye sahip olduğu ve *in vitro* ve *in vivo* lipid peroksidasyonu üzerinde güçlü inhibitör etkilerinin bulunduğu ortaya çıkmış olup, koruyucu mekanizmalarının henüz tam olarak aydınlatılamamış olduğu bildirilmiştir [118, 119]. Ek olarak ekstrelerde tespit edilen kersetin [118, 120] ve kemferol [118] ile terpenoit ve ursolik asit [64] gibi flavonoidlerin antioksidan etkilerden sorumlu olduğu da belirtilmiştir [121].

Zhagova ve diğerlerinin yaptığı çalışmada *L. cardiaca* ve 5 farklı lokaliteden toplanan *L. quinquelobatus* türlerinin toplam flavonoid içeriğinin tespitinin yanı sıra, antiradikal etkisi *in vitro* DPPH* testi ile değerlendirilmiştir. *L. quinquelobatus* bitkisinin toplam flavonoid içeriğinin 0.60–4.56 mg/g olup, antiradikal aktivitesinin 17.77 mg TE (troloks eşdeğer/g ile 47.36 mg TE/g aralığında olduğu, *L. cardiaca* için toplam flavonoid içeriğinin 1.17 mg/g ve antiradikal aktivitesinin ise 18.67 mg TE/g olduğu bildirilmiştir [83].

Ek olarak literatürde farklı ülkelerde *L. cardiaca* ile yapılan bazı biyolojik aktivite çalışmaları ve aktiviteden sorumlu olduğu düşünülen bileşikler Tablo 2.3'te verilmiştir.

Tablo 2.3. *L. cardiaca* ile farklı ülkelerde yapılan bazı biyolojik aktivite çalışmaları

Drog/preparat	Aktivite	Aktiviteden sorumlu bileşik	Kaynaklar
Toprak üstü kısım	Antioksidan	Rutin ve hidroksisinnamik asit türevleri	[16]
Toprak üstü kısımların ekstraları	Antianjinal, antiaritmik	Fenolik bileşikler	[122]
(su, diklorometan, %70 hidroetanollü) (Almanya)	Kardiyoprotektif	Klorojenik asit ve flavonoidler orientin, kersetin, hiperozit, rutin	[66]
%70 etanol ekstresi (Litvanya)	Antienflamatuvar, antimikrobiyal	3,4-dihidroksifenil kısmi yapılı fenolik bileşenler	[123]
%70 etanol ekstresi, Soxhlet ekstraksiyonu, Metanol ekstresi, (Almanya)	Antimikrobiyal	İridoit glikozitler, di ve triterpenoidler, flavonoidler, tanenler ve uçucu yağlar	[124]
Yaprak aseton:su ekstresi (Polonya)	Antioksidan, radikal temizleyici	Fenolik bileşenler	[107]
Toprak üstü kısımlar metanol ekstresi (İran)	Antioksidan	Fenolik bileşenler, flavonoidler	[108]
Toprak üstü kısımlar metanol ve su ekstresi (İran)	Antioksidan, serbest temizleme potansiyeli	Polifenolikler	[109]
Toprak üstü kısımlar ekstre ve fraksiyonlar (İran)	Antioksidan	Fenolik bileşenler	[105]
Yaprak %80 metanol veya %80 etanol ekstraları (Yunanistan)	Antioksidan	Fenolik bileşenler	[110]
Yaprak, polisakkarit ekstraları (İran)	Antioksidan antimikrobiyal	Polisakkaritler	[111]
Toprak üstü kısımlar su ekstresi (Malezya)	Antioxidant, antidiabetik	Fenolik bileşenler	[112]
Ticari tentürler (Rusya)	Antioksidan	Lavandulifoliosit, fenolik asitler, kafeik asit 4-rutinozit, tanenler	[115]
Metanol ekstresi	Antioksidan	Flavonoid ve fenolik glikozitler	[67]
Toprak üstü kısımlar farklı tipte ekstresi	Antiviral	Ursolik asit, kersetin, hiperosit, apigenin-7 glukozit, rutin	[125]
Leonurin	Antienflamatuvar	-	[126]
Leonurin	Gut artrit tedavisi için ajan	-	[127]
Toprak üstü kısım su ekstresi	Anti-biyofilm oluşumu	-	[128]
Toprak üstü kısımlar, çay	Sıcak basmaları, jinekolojik tonik, gevşetici	-	[129]
Toprak üstü kısımlar	Anksiyolitik, antispazmodik ve menopoza anksiyetesi	-	[130]
Toprak üstü kısımlar, çay tentür, infüzyon	Antispazmodik antiinflamatuvar anksiyolitik, tonik	-	[131]
Toprak üstü kısımlar, infüzyon, dekoksiyon	Tonik, amenore, dismenore, antispazmodik, yatıştırıcı, emenagog	-	[132]
Toprak üstü kısımlar, sulu ekstre (Çin)	Antioksidan	-	[133]
Ticari tentürler, infüzyonlar (Rusya)	Antioksidan	-	[114]
Toprak üstü kısımlar, tentür, çay	Sinir gevşetici, anksiyolitik	-	[134]
Toprak üstü kısım, 45% etanol ekst, Stakidrin, leonurin, lavandulifoliosit, Isoleosibirin, 7R-kloro-6-dezoksi-harpasit (Almanya)	Anksiyete depresyon sinirlilik yatıştırıcı	-	[61, 135]
Leonurin	Nefroprotektif, nöroprotektif	-	[136-138]

2.5.2. Antimikrobiyal aktivite

Literatüre göre, labdan tipi diterpenlerin muhtemelen *L. cardiaca*'nın antimikrobiyal aktivitesinden sorumlu olduğu düşünülmektedir [43]. Diterpen bakımından zengin *L. cardiaca* yapraklarının kloroform ekstresinin, *Staphylococcus aureus*'un büyümesini inhibe ettiği [139], toprak üstü kısımlarının metanollü ekstresinin kloroform fraksiyonunun, *Plasmodium falciparum*'un çok dirençli suşuna karşı aktivite gösterdiği bildirilmiştir [140].

Micota ve diğerleri tarafından, *L. cardiaca* aseton-su ekstresinin ve bileşen ursolik asidin antimikrobiyal potansiyelinin, minimum inhibe edici konsantrasyonu (MİK) belirlenerek saptanmasının yanı sıra, *Staphylococcus aureus* suşuna (enfektif endokarditin potansiyel etiyolojik ajanı) karşı yapışma önleyici ve antibiyofilm özellikleri belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlar (MİK değeri aseton-su ekstresi için 6 mg/ml ve ursolik asit için 0.25 mg/ml), ursolik aside kıyasla *L. cardiaca* ekstresinin zayıf biyostatik aktivite gösterdiği, ancak her iki preparatın da yapışma önleyici potansiyele sahip olduğu şeklindedir. *S. aureus* biyofilm oluşumunun, ekstre tarafından hafifçe inhibe edildiği (%5), ancak 3/4 MİK konsantrasyonlarında ursolik asit (%85) tarafından güçlü bir şekilde inhibe edildiği bildirilmiştir [124].

L. cardiaca ekstrelerinin *Escherichia coli* biyofilm oluşumu üzerindeki inhibe edici dozlarının etkisine ilişkin bir çalışmada *L. cardiaca* ekstresinin, sublethal olmayan streptomisin konsantrasyonu (30 µg/ml) ile sinerjik bir etki gösterdiği ve spesifik biyofilm oluşumunu inhibe ettiği bildirilmiştir [128].

Micota ve diğerleri tarafından [141], *Staphylococcus aureus*'un özellikleri üzerindeki etkilerini belirlemek için *L. cardiaca* ekstresinin subinhibitör dozları kullanılmıştır. Ekstrenin, stafilokok yapışma kümelerinin oluşumunda azalma, koagülaz aktivitesi, protein A ekspresyonu veya alfa-toksin sentezinde azalma gibi faydalı etkilerinin gözlemlendiği bildirilmiştir.

Ali ve diğerleri tarafından anti-enflamatuar aktiviteye sahip olan *L. cardiaca* ekstresi ve ursolik asidin, *Staphylococcus aureus*'un kümelenme, yapışma, plazma pıhtılaşması ve tam insan kanında hayatta kalma gibi farklı patojenik özelliklerini azaltmak için aktif olduğu bildirilmiştir [64].

Diğer bir çalışmada *L. cardiaca* sulu ekstresinin, hücre kültürlerinde kene kaynaklı ensefalit virüsünün gelişimini neredeyse tamamen inhibe ederek, virüs bulaşmış farelerde daha uzun yaşam beklentisine neden olduğu ve böylece bağışıklığın indüksiyonunu kanıtladığı bildirilmiştir [142].

Taşdemir ve diğerleri tarafından, *L. persicus*'un toprak üstü kısımlarından izole edilen bileşikler, Gram-pozitif ve Gram-negatif bakterilerden oluşan bir grup ve ayrıca iki mantar suşu kullanılarak antibiyotik aktiviteleri açısından test edilmiş, sadece lökoseptozid A'nın, 50 µg/spot konsantrasyonda *Staphylococcus epidermidis*'e karşı orta düzeyde antibakteriyel aktivite gösterdiği belirtilmiştir [143].

L. cardiaca'nın antiviral potansiyeli Todorov ve diğerleri tarafından değerlendirilmiş, ekstrenin farklı bileşenlerinin çeşitli virüs türlerine (ursolik asit - HCV, HPV-18; kersetin-HSV-1, poliovirüs 1, RSV; hiperosit-DHBV; apigenin-HSV-2; rutin-HIV-1) karşı aktif olduğu bulunurken, kloroform ve metanol ekstraktlarının HSV-1 ve 2'ye karşı antiherpes aktivitesine sahip olduğu sunulmuştur [125].

Mao ve diğerleri tarafından (2018), *L. pseudomacranthus* Kitag'ın toprak üstü kısımlarından hidrodistilasyon ile elde edilen uçucu yağın kimyasal bileşimi ve *in vitro* antibakteriyel aktiviteleri araştırılmış, kimyasal bileşim GC-FID ve GC-MS ile incelenmiş, ana bileşenler, sklareol (%34.8), β-karyofilen (%7.1) ve α-muurolen (%5.3) olarak belirlenmiştir. Ayrıca uçucu yağın antibakteriyel aktivitesi, disk difüzyon ve mikrodilüsyon yöntemleriyle değerlendirilmiş, uçucu yağın *Bacillus subtilis* ve *Staphylococcus aureus*' a karşı sırasıyla 0.039 mg/mL ve 0.156 mg/ mL MİK değerleri ile oldukça etkili şekilde antibakteriyel aktivite gösterdiği bildirilmiştir [116].

2.5.3. Sitotoksik aktivite

Leonurin, kardiyoprotektif etkilere sahip geleneksel bir bitki olan Leonuri herba için özel bir alkaloiddir. Kardiyoprotektif etkisi, Leonuri herba'nın diğer bileşenleri ile sinerjik bir etki olarak hareket edebilir. Xin ve diğerleri tarafından yapılan çalışmada, leonurinin H9c2 (Sıçan embriyonik ventriküler miyokardiyal hücre hattı) hücrelerinde doksorubisin (DOX) ile indüklenen kardiyomiyopatiye karşı olası koruyucu etkileri araştırılmış, kimyasal olarak sentezlenen leonurunin, antioksidanı artırarak H9c2 hücre modelinde DOX ile indüklenen hücre apoptozunu zayıflattığı bildirilmiştir [144].

Leonuri herba'nın ana bileşenlerinden biri olan flavonoidlerin de, DOX tarafından indüklenen kardiyomiyopati ve kardiyomiyosit apoptozuna karşı koruyucu etkileri olduğu bildirilmiştir [145]. Bu çalışmalar bitkisel ilaçların, kardiyoprotektif ilaç olarak

değerli birer kaynak olduğunu ve HL'nin de iyi adaylardan biri olabileceğini doğrulamaktadır.

Siterek ve diğerleri tarafından yapılan çalışmada *L. sibiricus*'un TR (transforme edilmiş) ve AtPAP1 TR transgenik kök ekstrelerinin çeşitli kanser hücre hatlarına (CCRF-CEM, K-562 ve A549) karşı hem genotoksik hem de sitotoksik aktiviteleri araştırılmış, test edilen her iki ekstrenin CCRF-CEM (akut lenfoblastik lösemi hücre hattı) ve K-562 (Kronik myeloid lösemi hücre hattı) hücre hatları üzerinde sitotoksik bir etki gösterdiği, en güçlü aktivitenin AtPAP1 TR ekstresi için gözlemlendiği bildirilmiştir. Ayrıca, test edilen konsantrasyon aralığında A549 hücre hattına karşı hiçbir sitotoksik etki gözlenmemiştir. Ekstrenin sitotoksik ve genotoksik aktivitesini araştıran bu çalışmada *L. sibiricus* ekstresinin, içsel ve dışsal yollarla ve DNA hasarı yoluyla apoptozu indüklediği bulunmuştur [146].

Bir başka çalışmada da, Güney Asya ve Sibirya'da yaygın olarak kullanılan *L. sibiricus*'un TR (transforme edilmiş) kök ekstrelerinin, glioma hücrelerinde apoptoz indüksiyonunun potansiyel mekanizması değerlendirilmiş, farklı test yöntemleri kullanılmış ve MTT [3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür] analizinde, 24 saatlik tedaviden sonra ekstrenin glioma hücrelerinin tüm derecelerinde sitotoksik bir etkiye sahip olduğu bildirilmiştir. Bu çalışmada, IC₅₀ konsantrasyonu I. ve II. derece glioma hücreleri için 1 mg/ml iken, III. derece için 1.5 mg/ml olarak bildirilmiştir [15].

Leonurin hidroklorid'in (LH) akciğer kanseri hücreleri üzerindeki etkilerini belirlemeyi ve ilgili olası moleküler mekanizmayı aydınlatmayı amaçlayan bir çalışmada, H292 (İnsan akciğer karsinomu) hücre hattında 6, 12, 24, 48 ve 72. saat canlılığı üzerindeki etkiler MTT testi ile değerlendirilmiş, LH'nin zamana ve konsantrasyona bağlı bir şekilde proliferasyonu önemli ölçüde inhibe ettiği ve H292 hücrelerinin G0/G1 fazında hücre döngüsü ilerlemesini doza bağımlı olarak durdurduğu bildirilmiştir [147].

Diğer bir çalışmada, *L. japonicus* türünün toprak üstü kısımlarından hazırlanan %70 etanol ekstresinin, meme kanserli iki hücre hattına (MCF-7 ve MDA-MB231) karşı antiproliferatif etkisi MTT testi ile değerlendirilmiş, 24 saatte hücre proliferasyonunun baskılanması için IC₅₀ değerleri sırasıyla, MCF-7 ve MDA-MB231 hücreleri için 96.2µg/mL ve 89.1µg/mL iken, ekstrenin sitotoksitesisi için IC₅₀ değerleri, MCF-7 ve MDA-MB-231 hücreleri için 48 saatte sırasıyla 67.7µg/mL ve 53.4µg/mL olarak belirlenmiştir [148].

2018'de Kore'de yapılan çalışmada *L. sibiricus* ekstresinin MCF-7 hücreleri (insan meme kanseri hücre dizisi) kullanılarak antioksidan ve antikanser etkisi araştırılmıştır. Ekstrenin yüksek toplam polifenol (198.30 mg Tae/g) ve toplam flavonoit (118.91 mg RE/g) içeriklerinin yanı sıra etkili ABTS^{•+} serbest radikal temizleme kapasitesine sahip olduğu belirlenmiş ve 0.1, 0.2, 0.4 ve 0.8 mg/mL konsantrasyonlardaki *L. sibiricus* ekstrelerinin, 24 saat ve 48 saat boyunca MCF-7 hücrelerinin çoğalmasını önemli ölçüde inhibe ettiği bildirilmiştir [149].

Chinwala ve diğerleri tarafından yapılan çalışmada, *L. heterophyllus* Sweet'in kurutulmuş toprak üstü kısmından hazırlanan ekstrenin, 7 farklı insan kanser hücre hattına karşı *in vitro* çoğalmayı önleyici olduğu ve test edilen tüm kanser hücre dizilerinin büyümesini inhibe etmede etkili olduğu bildirilmiştir. Bu çalışmada kanserli hücrelerin çoğalmasının önlenme etkisinin doza ve ilaca maruz kalma süresine bağlı olduğu, ayrıca aynı tip organ kökenine sahip kanser hücre hatları arasında da değişiklik gösterdiği bulunmuştur [150].

L. sibiricus türü biyolojik aktiviteler açısından büyük değişkenlik gösterdiğinden, potansiyel antitümör aktiviteleri için kullanılacak ilginç bir aktif sekonder metabolit kaynağıdır. Bir çalışmada *L. sibiricus* kökü ekstresinin, kafeik asit, klorojenik asit, ferrulik asitler ve p-kumarik asit dahil olmak üzere, yüksek seviyelerde fenolik bileşikleri içermesinden dolayı glioma hücreleri ve melanoma hücrelerine karşı sitotoksik aktiviteye sahip olduğu bildirilmiştir [151].

Ek olarak, *Agrobacterium* tarafından transformasyon veya spesifik transkripsiyonel faktörlerin eklenmesi gibi başka genetik manipülasyonların, fenolik asitler gibi sekonder metabolitlerin üretiminin artmasına ve dolayısıyla biyolojik özelliklerin daha da iyileştirilmesine neden olduğu bildirilmiştir [15].

Aralarında *L. turkestanicus* türünün de bulunduğu, Özbekistan'da doğal olarak yetişen 10 bitki türünden metanol, hekzan, kloroform ve su ile hazırlanan ekstrelerin sitotoksitesi, antiproliferatif özellikler açısından araştırılmıştır. Bitkilerin test edilen tüm su ekstrelerinin 200 µg/ml'nin üzerinde IC₅₀ değerleri ile hücre çoğalmasını orta derecede inhibe ettiği, kloroform ve hekzan ekstrelerinin test edilen hücrelerde (HL-60 promyelositik lösemi hücre hattı), daha yüksek sitotoksik aktivite gösterdikleri bildirilmiştir [80].

2.6. *Leonurus* Türleri Üzerine Yapılan Fitokimyasal Çalışmalar

Yaklaşık 1930'lardan beri, *Leonurus* cinsine ait türlerin kimyasal bileşenlerini ve farmakolojik mekanizmasını ortaya çıkarmak için yoğun çalışmalar yapılmıştır. Araştırmalar esas olarak *L. japonicus* (Doğu Asya), *L. cardiaca* (Avrupa), *L. persicus* (Türkiye, İran), *L. glaucescens* (Kuzeybatı Asya) ve *L. turkestanicus* (Orta ve Batı Asya) üzerinde odaklanmıştır.

İridoitler biyogenetik ve kemotaksonomik öneme sahiptir ve esas olarak yüksek bitkilerde glikozitler olarak bulunurlar. Sedatif etki [152] başta olmak üzere çeşitli biyolojik ve farmakolojik aktivitelerden bu bileşiklerin sorumlu olduğu bildirilmiştir.

Yapılan son araştırmalarda *Leonurus* türlerinin toprak üstü kısımlarında bulunan bileşenler; monoterpenler (iridoitler) [153, 154], diterpenler (furanolabdan ve labdan türleri) [155-159], triterpenler (ursolik ve oleanolik asitler) [64, 160] ve nitrojen içeren bileşikler (leonurin ve stakidrin) [161-163], fenilpropanoitlerin (lavandulifoliosit) yanı sıra flavonoitler, fenolik asitler, uçucu yağlar, steroller ve tanenler olarak bildirilmiştir [43].

Klinik uygulama olarak, *Leonurus* türlerinin uterotonik ve kardiyovasküler aktivitesinin leonurin ve stakidrin gibi alkaloitlerden [164-166], farmakolojik etkilerinin (antibakteriyel, antiplazmodiyal, kemopreventif...vb.) ise labdane diterpenoitlerden [167, 168] kaynaklandığı bildirilmiştir. Leonurin, esas olarak kardiyovasküler, hipotansif, uterotonik ve nöroprotektif etkiler gösteren, farmakolojik olarak aktif bir guanidin alkaloittir [169]. Leonurinin teorik olarak, merkezi sinir sistemi aktivitesinde önemli bir rol oynamadığı ancak kusma ve bulantı için potansiyel bir bileşik olabileceği de bildirilmiştir [58].

Literatürde, *L. cardiaca* türünün önemli miktarlarda lavandulifoliosit ve verbaskozit içerdiği bildirilmiştir [123, 170]. Diğer bileşenler arasında flavonoitler, özellikle kersetin ve kamferol O-glikozitler: rutin, hiperozit, kuersitrin, izokersitrin, astragalin ve apigenin; flavonoit C-glikozitler: viteksin ve isoviteksin; serbest aglikonlar yer alırken, bazı çalışmalarda genkvanin, *Leonurus* cinsinin kemotaksonomik bir belirtici olarak önerilmektedir [104, 171, 172]. Fenolik bileşikler arasında fenilpropanoit glikozitler: lavandulifoliosit (verbaskozitin arabinozidi) [173] ve fenolik asitler (klorojenik, rozmarinik, kafeik, *p*-kumarik, *p*-hidroksibenzoik, vanilik, ferulik asit, fenolik asit) ve fenolik glikozit olan kafeik asit 4-rutinozit içerdiği bildirilmiştir [43, 104, 174].

L. cardiaca, *L. japonicus* ve *L. sibiricus* türlerinin mikroskobik ve fitokimyasal olarak karşılaştırıldıkları çalışmada; verbaskozitin varlığının bitki materyalinin tanımlanmasında ve üç tür arasındaki ayırmda önemli olduğu, ayrıca *L. cardiaca*'da daha kuvvetlice bulunduğu bildirilmiştir [30].

Koshovyi ve diğerleri tarafından *L. cardiaca* tentürünün küçük miktarlarda arginin, valin, fenilalanin, glisin, lizin ve alanin eklenerek modifiye edilmiş kuru ekstrelerinde 15 fenolik madde bulunmuş, hidroksisinamik asitler (klorojenik, kafeik ve rosmarinik asitler) ve flavonoidler (kateşin, hiperosit ve rutin) olarak tanımlanmıştır. Ekstrelerin önemli bir ellajik asit içeriğine sahip olduğu da bildirilmiştir [175].

Bir başka çalışmada, 2020 yılında Polonya'dan toplanan *L. cardiaca*'nın toprak üstü kısımlarından hazırlanmış ham ve saflaştırılmış ekstreler, spektrofotometrik deneyler ve HPLC-DAD-MS analizleri ile kimyasal olarak karakterize edilmiştir. Özellikle fenolik asitler (klorojenik, kafeik, kafeoilmalik ve trans-ferulik asitler), flavonoidler (rutin ve kersetin), feniletanoit glikozitler (verbaskozit ve lavandulifoliosit), guanidin psödoalkaloitler (leonurin), diterpenler (forskolin) ve triterpenler (ursolik asit) olmak üzere ekstrelerin içeriği belirlenmiştir [113].

Kuchta ve diğerlerinin kantitatif HPLC ve HPTLC yöntemi kullanarak yaptığı çalışmada, *L. cardiaca*'nın dominant bileşenleri olduğu saptanan lavandulifoliosit, verbaskozit ve izokersetin incelenen *L. japonicus* örneklerinin hiçbirinde bulunmazken, hiperosit *L. japonicus*'ın baskın bileşeni olup, tek bir *L. cardiaca* örneğinde bile tespit edilmemiştir. Yani hem lavandulifoliosit hem de verbaskozitin varlığı, Leonuri cardiaceae herba için pozitif bir taksonomik belirteç iken, *L. japonici* herba için negatif bir belirteçtir. Ayrıca *L. cardiaca*'da klorojenik asit ve kafeik asit yüksek konsantrasyonlarda bulunmuştur [62]. Bununla birlikte, *L. cardiaca*'da, leonurin içeriğinin *L. japonicus* türüne göre çok düşük olduğu, bunun iki tür arasında önemli bir fark olduğu bildirilmiştir [43, 169]. *L. cardiaca*'nın toprak üstü kısımlarında %1.6 oranında stakidrin bulunduğu bildirilmiştir [169].

Diğer bir çalışmada, *L. cardiaca* ekstresinde ferulik asit, klorojenik asit, kafeik asit, sikorik asit, rutozit, lavandulifoliosit, verbaskozit, izokersetin ve stakidrin varlığı RP-HPLC ile tanımlanmıştır [169].

Başka bir çalışmaya göre, *L. cardiaca* türünün sinir sistemi üzerindeki etkilerinin yanı sıra bitkinin kan basıncını düşürme kabiliyetinden de, leonurin ve stakidrin gibi alkaloitlerin ayrıca sorumlu olduğu düşünülmektedir [72]. Ek olarak, jinekolojik

bozukluklar için, özellikle menopoz dönemi ve menstrüel bozukluklar ile ilişkili sinir semptomları için geleneksel uygulamalar vardır [176].

Leonurus cinsi üyelerinin biyolojik olarak aktif maddelerinin bileşiminin, flavonoidler (rutin), tanenler, saponinler ve uçucu yağ olduğu, bitkinin antiaritmik ve kardiyotonik etkisinin fenolik bileşiklerin varlığından kaynaklandığı, özellikle flavonoidlerden dolayı *L. cardiaca* ve *L. quinquelobatus*'un kardiyotonik ve yatıştırıcı etkilere sahip olduğu bildirilmiştir [122].

L. glaucescens' in köklerinin C vitamini ve tanen (%1.08) içerdiği; gövdenin alkaloidler (% 0.03), C vitamini, tanenler (% 1) içerdiği; yaprakların alkaloidler (%0.01), C vitamini, tanenler (%2.56) içerdiği; çiçeklerin C vitamini içerdiği; toprak üstü kısımlarından elde edilen uçucu yağın % 0.04 olduğu, ayrıca sardenolitler (%0.03), alkaloidler (%0.009-1.97), C vitamini, tanenler (%2.32-8.29), flavonoidler (%3.59) içerdiği; tohumların yağ bileşiminde palmitik asit (%4.6), stearik asit (%2.2), oleik asit (%20.7), linoleik asit (%70.1) ve linolenik asit (%2.4) bulunduğu bildirilmiştir [177].

L. glaucescens'in toprak üstü kısımlarından iki yeni fenilpropanoid glikozit, (leonosit A ve B) ve bilinen iki glikozit (lavandulifoliosit ve verbaskozit) izole edilmiştir [178]. *L. glaucescens*'te tespit edilen fenilpropanoid glikozitler [178] ve bunların farmakolojik aktiviteleri gösterilmiştir [179]. Bunların arasında verbaskozitin farmakolojik aktivite ve oluşumla ilgili baskın bir rol oynadığı bildirilmiştir [173].

Milkowska-Leyck ve diğerleri tarafından Polonya'dan toplanan *L. cardiaca* türünden farmakolojik aktiviteye sahip olduğu varsayılan bir fenilpropanoid glikozit olan lavandulifoliosit izolasyonu yapılmış ve farmakolojik aktivitesi bildirilmiştir [173].

Literatürde, *L. quinquelobatus* ve *L. persicus* türlerinin fitokimyasal bileşimi ve içerikleri hakkında çok az bilgi mevcuttur.

L. quinquelobatus türünden bir kumarolapigenin glikozit izole edildiği ve kuinkulozit olarak adlandırıldığı bildirilmiştir [46].

Zhogova ve diğerleri tarafından, Rusya ve Bulgaristan'ın çeşitli bölgelerinden toplanan 5 tanesi *L. quinquelobatus*, 1 tanesi *L. cardiaca* olmak üzere 6 örneğin toprak üstü kısımları ve üç endüstriyel motherwort preparatı (öğütülmüş bitki, poşet çay, tentür) incelenmiştir. *L. cardiaca* ve *L. quinquelobatus* türlerindeki iridoit glikozitlerinin; ajugol, ajugosit, galiridosit, harpagit ve harpagit asetat olduğu, ayrıca her iki türün, dihidroksisinamik asit türevleri ve flavonoidler için benzer HPLC profillerine sahip olduğu ve klorojenik asit (*L. quinquelobatus*'ta 0.34-3.20mg/g; *L. cardiaca*'da 0.90mg/g),

lavandulifoliosit (*L. quinquelobatus* 0.28-4.00 mg/g; *L. cardiaca* 0.11 mg/g), verbaskozit (*L. quinquelobatus* 0.20-4.50 mg/g; *L. cardiaca* 0.64 mg/g), rutin (*L. quinquelobatus* 0.43-2.90 mg/g; *L. cardiaca*, 0.88 mg/g), hiperozit (*L. quinquelobatus* 0.01- 0.36 mg/g; *L. cardiaca* 0.16 mg/g), izokuersitrin (*L. quinquelobatus*, 0.10-1.10 mg/g; *L. cardiaca*, 0.13mg/g) ve apigenin-7-*O*-glukozit içerdiği bildirilmiştir. Bulgaristan'dan toplanan *L. cardiaca* bitkisine ajugol (6.88 mg/g), galiridosit (4.59 mg /g) ve ajugosit (3.94 mg/g) hâkim olmuştur ve toplam iridoit içeriği 15.65 mg/g'dır. Rusya'dan toplanan *L. quinquelobatus* bitkisinden elde edilen başlıca iridoit glikozitler harpagit (0.1- 0.37 mg/g), galiridosit (0.14-0.29 mg/g) ve harpajid asetat (0.13-0.37 mg/g) olup, hammaddedeki toplam iridoit içeriği 0.53-1.24 mg/g'dır. Ayrıca bu çalışmada incelenen tıbbi preparatların iridoit profilinin *L. quinquelobatus*'un profiline karşılık geldiği bildirilmiştir [83].

Batı Sibirya bölgesinde yetişen *L. quinquelobatus*'un 3 bölgeden (Novosibirsk, Kemerovo ve Kamlak köyü) toplanan örnekleri incelenmiştir. *L. quinquelobatus* türün %70 etanol ekstresinde 9 ana fenolik bileşenin tanımlandığı çalışmada; çeşitli bölgelerden elde edilen hammadde özlerinin kalitatif bileşimlerinin benzer olduğu, rutin, klorojenik asit ve türevleri, apigenin metil esteri, kafeik ve malik asitlerin esterlerinin bulunduğu bildirilmiştir [46].

Taşdemir ve diğerleri tarafından *L. persicus*'un toprak üstü kısımlarından bilinen beş iridoit glukozite (galiridosit, ajugosit, 10-deoksijeniposidik asit, 7-deoksi-8-*epi*-loganik asit, 8-*O*-asetilharpagit) ek olarak, 6-*O*-asetillajugol ve 7,8-epoksi-8-*epi*-loganik asit ve ayrıca lökoseptosit A , öjenil β -rutinozit ve kamferol 3-*O*-glukosit izole edilmiştir [143].

Leonurus cinsi Özbekistan'da, Tien Shan ve Pamir-Alay dağlarında taşlı, sıg topraklı yamaçlar, taşkınlar, nehir kenarları, ağaçlar veçalılar arasında yetişen çok yıllık endemik çalılar olan *L. panzerioides* ve *L. turkestanicus* ile temsil edilmektedir [79, 180]. Mamadalieva ve diğerleri [81] bu iki türün q-NMR analizlerinin, metanol ekstraktlarındaki bilinen ana bileşenlerin 8-asetilharpagit, harpagit, leonurin ve stakidrin olduğunu ortaya koymuştur.

2.7. *Leonurus* Türleri Üzerine Yapılan Diğer Çalışmalar

Farmakolojik çalışmalar antibakteriyel, antioksidan, antienflamatuar ve analjezik aktivitenin yanı sıra bitkinin kalp ve dolaşım sistemi üzerindeki etkilerini doğrulamıştır. Sedatif ve hipotansif aktivite klinik çalışmalarda gösterilmiştir. *Leonurus* türlerinin kullanımı, farmakolojik çalışmalar sınırlı olduğundan, esas olarak geleneksel endikasyonlara dayanmaktadır [43].

Romm *L. cardiaca* bitkisini, doğum sonrası depresyon da dahil olmak üzere çeşitli rahatsızlıkların tedavisi için doğal bir çare olarak sınıflandırırken, epilepsi tedavisinde *L. cardiaca*'nın geleneksel dahili kullanımı Adams ve diğerleri [181] tarafından bildirilmiştir [134].

Anksiyete ve depresif bozuklukların tedavisine yönelik potansiyel olarak, Rauwald ve diğerleri tarafından *L. cardiaca* ekstresi ve bileşenlerinin nöronal reseptör gamma-aminobutirik asit (GABA) üzerindeki etkisi incelenerek ortaya konmuştur [61, 135].

L. cardiaca bitkisinin toprak üstü kısımlarından elde edilen etanolü ekstre, Rezaee-Asl ve diğerleri tarafından farelerde potansiyel bir analjezik olarak değerlendirilmiştir. Ekstrenin formalin kaynaklı ağrıyı erken aşamada azaltabildiği, antinosiseptif aktiviteyi arttırdığı ve analjeziyi desteklediği kanıtlanmıştır [182].

Bir başka çalışmada da, "Hot plate" testinde (53°C), *L. cardiaca*'nın sulu etanol ekstresinin, farelerde ağrı algısını azalttığı bildirilmiştir [43].

Furanolabdan tipi diterpenlerin yanı sıra izole edilmiş diterpenler içeren ekstrenin fraksiyonunun da, asetik asitin neden olduğu abdominal krampları, paralel verilen aspirin veya asetaminofenden daha etkili bir şekilde inhibe ettiği bildirilmiştir [183].

L. cardiaca'dan izole edilen ursolik asidin, pozitif bir prob olarak kullanıldığında indometazin ve asetilsalisilik aside göre daha güçlü anti-inflamatuar aktiviteye sahip olduğu bildirilmiştir [64].

Leonurus ekstrelerinin fotosensitif ve fotoprotektif etkisinin olduğu, bu özelliğin UV ve görünür spektral aralıkta ışığı absorbe edebilen maddeler (özellikle kumarin) ile ilişkili olduğu bildirilmiştir [54].

He ve diğerleri *L. japonicus*'tan türetilen Çin patentli ilaçların doğum sonrası uterus subinvölüsyonunu ve miyokardiyal, serebral iskemik yaralanmalar üzerindeki etkilerini hafiflettiğine dair artan kanıtların bulunmasından dolayı, bitkinin bu yararlı etkilerinin anjiyogenez ile ilişkili olabileceğini varsaymış ve bitkide bulunan alkaloidlerinin, uçucu yağının ve bunların birincil bileşenlerinin zebra balığı embriyoları üzerindeki anjiyojenik

etkilerini araştırmıştır. Toplam alkaloidlerin ve bitki tarafından en çok üretilen alkaloid olan stakidrinin zebra balığı embriyolarında anjiyogenezi önemli ölçüde arttırdığı, ancak beklenmedik bir şekilde, uçucu yağın embriyolar için zehirli olduğu gözlenmiştir. *L. japonicus* alkaloidlerinin güçlü anjiyojenik ajanlar olduğu, ancak düşük konsantrasyonlarda bile uçucu yağın toksik olduğu bildirilmiştir. Anjiyogenez, doğum sonrası iyileşmenin kritik bir yönü olduğundan, bu sonuçlar, doğum sonrası iyileşmeyi desteklemek için bitkinin dekoksilyonunun ve Çin patentli ilaçlarının geleneksel uygulaması için kanıt oluşturmuştur [184].

Sezaryen geçiren 165 kadın üzerinde yapılan randomize bir çalışmada ise, oksitosin ile kombinasyon halinde *L. cardiaca*'nın doğum sonu kanamayı önlemede etkili olduğu ortaya konmuştur [185].

Denham ve diğerleri tarafından Birleşik Krallık'ta yürütülen klinik araştırmada 35 denekte menopozla ilişkili semptomların tedavisi için uygulanan 80 bitkiyi (en çok karşılaşılan *L. cardiaca* %77) kapsayan toplam 141 bitkisel reçeteleme belgelenmiştir. *L. cardiaca*'nın kullanıcılar tarafından, jinekolojik tonik ve bir gevşetici olarak, sıcak basmalarını kontrol etmek için tercih edildiği bildirilmiştir [129].

L. sibiricus ekstresinin insülinotropik etkiye sahip olduğu bulunmuştur [186]. Bir flavonoid olan kersetinin hem kısa hem de uzun etkiyle INS-1 (sıçan insülinoma beta-hücreleri) hücrelerinde insülin salgılanmasını uyarabildiği, bununla birlikte, kersetinin glikozitinin ve rutin bilesinin böyle bir aktivitesinin olmadığı bildirilmiştir [187].

Alkaloidlerin anti-diyabet aktivitesi rapor edilmiştir. Leonurinin, açlık kan şekeri seviyesini düşürüp, *db/db* farelerde plazma insülin konsantrasyonunu artırarak Tip 2 diyabetin ilerlemesini önleme potansiyeline sahip olduğu bildirilmiştir [188].

Romanya'dan toplanan *L. quinquelobatus* bitkisinin sulu ekstresinin, köpeklere intravenöz olarak verilen nörepinefrinin presör aktivitesini toplam iki kez sürekli olmayan perfüzyonlarla antagonize ettiği bildirilmiştir [189].

Qi ve diğerleri tarafından yapılan çalışmada, sentetik leonurinin iskemik inme modelinde (sıçanlarda) sinir hücreleri üzerindeki nöroprotektif etkisi, inme alanının azaltılması ve *in vivo* beyin hasarını gösteren motor ve davranışsal değişiklikler ile gösterilmiştir. Leonurinin nöroprotektif etkisinin, esas olarak, mitokondrinin düzgün işleyişinin sürdürülmesi ve sonuç olarak apoptozun engellenmesi sayesinde ROS oluşumunun azalmasından kaynaklandığı, ayrıca leonurinin antioksidan ve apoptotik

mekanizmaları nedeniyle iskemik inmelerin önlenmesinde ve tedavisinde faydalı olabileceği bildirilmiştir [190].

Tanı ve tedavi yöntemlerinde son yıllardaki ilerlemelere rağmen kardiyovasküler hastalıklar (KVH), morbidite ve mortalitenin en yaygın nedeni olmaya devam etmektedir. KVH'ye bağlı ölüm oranının 2030 yılına kadar dünya çapında 24 milyondan fazla olacağı tahmin edilmektedir. Kardiyak aritmiler, KVH kaynaklı ölümlerin önde gelen nedenlerinden biridir ve ayrıca ani kalp durmalarının en az yarısından sorumludur. Kardiyak aritmiler veya disritmiler, taşikardi veya bradikardi olarak görülebilecek düzensiz hız veya ritmi içeren, kalbin elektriksel aktivitesindeki bozukluklardır [191, 192].

Kardiyak aritmilerin tedavisinin önemli bir kısmı anti-aritmik ilaçlardır. Bu ilaçlar esas olarak zar iyonik akımlarını etkilemek, elektriksel iletim hızını değiştirmek veya tetikleme aktivitesini bloke etmek için hareket ederler [193]. Klasik antiaritmik ilaçların uzun süreli kullanımı kalp dışı komplikasyonlara neden olabileceği gibi ilaca direnç oluşturabilmektedir. Bu sayede de terapötik etkinlik azalabilmektedir. Ek olarak, bazı antiaritmik ilaçların önceden var olan aritmileri kötüleştirebilmesi, diğer ilaçlarla oluşabilecek etkileşimler ve olası yan etkileri sebebiyle, daha fazla terapötik etkiye ve daha az yan etkiye sahip yeni antiaritmik ilaçların bulunması kaçınılmazdır. Buna kaynak olabilecek en önemli grup da bitkilerdir. Ancak, ilaç etkileşimlerinin yönetiminin, özellikle dar terapötik indeksi olan digoksin gibi kardiyovasküler ilaçların farmakolojik etkilerini arttırabilen veya azaltabilen bazı bitkisel ajanlarla birlikte uygulandığında önemli olduğu da unutulmamalıdır [53].

Yapılan çalışmaların sonuçları, bazı bitkilerin zengin bir antiaritmik ajan kaynağı olduğunu ve çeşitli hayvan aritmi modellerinde farklı aritmi türlerini baskılayabileceğini göstermektedir [122, 194].

İngiliz Bitkisel Farmakopesi *L. cardiaca*'nın sedatif ve antispazmodik olduğunu, ayrıca kardiyak güçsüzlük, basit taşikardi, efor sendromu, amenore gibi endikasyonlarda da etkili olduğunu bildirmektedir [195].

Literatürde *Leonurus* bitkisi ekstresinin, fenolik bileşiklerin (özellikle flavonoidler) serbest radikal reaksiyonlarının mekanizmalarını inhibe etme kabiliyetiyle ilişkili iskemik miyokardiyum üzerindeki antioksidan ve kardiyoprotektif etkisinin bulunduğu bildirilmiştir. Bu bileşiklerin mitokondriyal solunum üzerinde etkili olduğu, seçici olarak süperoksit dismutaz ve glutatyon peroksidaz aktivitesini sürdürdüğü ve ayrıca

mitokondrilerde serbest radikal oluşumunu etkin bir şekilde engellediği, böylece kalp kasına kardiyoprotektif etki sağladığı belirtilmiştir [66, 104, 196].

Ritter ve diğerleri *L. cardiaca* ekstresinin elektrofizyolojik etkileri üzerine bir çalışma gerçekleştirmiştir. Ekstrenin güçlü kardiyovasküler ve antiaritmik etkileri, voltaj kıskacı düzeneğinde *ex situ* Langendorff tavşan kalpleri ve kültürlenmiş kardiyomiyositlerle yapılan bir çalışmada deneysel olarak doğrulanmıştır [122].

Milkowska-Leyck ve diğerleri tarafından Polonya'dan toplanan *L. cardiaca* türünden hazırlanan ekstrenin, kalp atış hızını düşürdüğü bildirilmiştir. Ayrıca intragastrik olarak verildiğinde BuOH ekstresinin, farelerde spontan lokomotor aktiviteyi önemli ölçüde azalttığı, sulu ekstreya benzer şekilde negatif bir inotropik etkiye neden olduğu ve güçlü yatıştırıcı özelliklere sahip olduğu da belirtilmiştir. Ek olarak, izole edilen lavanduliofoliosidin Langendorff sıçan kalbinde önemli negatif kronotropizm ve koroner çıkış ile inhibe edici bir etkiye aracılık ettiği, ancak hipotansif etkinin verbaskozitten biraz daha zayıf olduğu bildirilmiştir [173].

Sinirsel kardiyovasküler rahatsızlıklar, hipertiroidizm, ateroskleroz ve kalp ile ilgili şikâyetleri olan 100 hastadan oluşan bir grupta (18-65 yaş) kullanılan çeşitli *L. cardiaca* preparatları (tentür, etanol ekstresi, kuru ekstre ve infüzyon) üzerine yapılan bir çalışmanın sonuçlarında, sıvı ve kuru özler içeren tabletlerle 3-4 günlük tedaviden sonra, kalp bölgesinde çarpıntının ve gerginlik hissinin azaldığı, hipertiroidizm görülen kişilerde ise taşikardinin zayıfladığı ve sinirsel uyarılma gözlemlendiği bildirilmiştir. Ayrıca, *L. cardiaca* preparatları ile yapılan tedavide, sinirsel kalp rahatsızlığı ve hipertiroidizm şikayeti olan grupta en iyi sonuçların elde edildiği, hipertansiyonu olan hastalarda 8-10 günlük tedaviden sonra kan basıncında 8-20 mmHg azalma olduğu, baş ağrısı ve baş dönmesinin hafiflediği gözlenmiştir [197].

Wartofsky ve Nostrand tarafından yapılan çalışmada hipertiroidizm ile ilişkili semptomlara (çarpıntı ve anksiyete) karşı etkisinden dolayı aşırı aktif tiroid tedavisinde potansiyel bir adjuvan olarak *L. cardiaca* önerilmiştir [198]. Tiroid uyarıcı hormonun inhibisyonu ve fazla tiroid hormon üretiminin azaltılması da bazı araştırmacılar tarafından, özellikle *L. cardiaca* bitkisinin rozmarinik asit içeriğine atanmıştır [199].

Geleneksel olarak yaygın şekilde yatıştırıcı, hipotansif ve kardiyotonik etkilerinden dolayı kullanılan *L. cardiaca* bitkisinin hastalardaki etkisine ilişkin klinik verilerin eksikliğinden dolayı, anksiyete ve uyku bozukluklarının eşlik ettiği arteriyel hipertansiyon evre 1 ve 2 olan hastalarda *Leonurus* yağı ekstresinin klinik etkinliğini

değerlendirmek için Shikov ve diğerleri tarafından bir çalışma yapılmıştır. Elli hasta 28 gün süreyle günde 1200 mg *Leonurus* yağı ekstresi ile tedavi edilmiş, evre 1 hipertansiyonu olan hastalarda *Leonurus* yağı ekstresinin psiko-duygusal durum ve arteriyel kan basıncı üzerindeki olumlu etkilerinin, evre 2 hipertansiyonlu hastalara göre 1 hafta önce gözlemlendiği, Klinik Global İzlenim ölçeğine göre hastaların %32'sinde anksiyete ve depresyon belirtilerinde anlamlı iyileşme, %48'inde orta derecede iyileşme ve %8'inde zayıf etki gözlemlendiği; hastaların %12'sinin ise tedaviye yanıt vermediği, bunlara ek olarak tüm gruplarda yan etkilerin minimal olduğu belirlenmiştir. Bu nedenle *Leonurus* yağı ekstresinin, arteriyel hipertansiyonu ve eşzamanlı psiko-nörolojik bozuklukları olan hastalar için potansiyel olarak etkili bir terapötik ajan olabileceği bildirilmiştir [119].

Liu ve diğerleri tarafından *L. cardiaca* bitkisinden izole edilen ve sentezle elde edilen leonurinin, lipid peroksidasyonunu ve apoptozu azaltarak sıçanlarda (*in vivo*) iskemi kaynaklı hasar modelinde miyokardiyum üzerinde koruyucu bir etki gösterdiği, ayrıca leonurinin (15 mg), kan serumundaki artmış seviyeleri kalbe zarar veren laktat dehidrojenaz ve kreatin kinaz enzimlerinin seviyesini düşürdüğü bildirilmiştir [138].

Leonuri herba infüzyonunun, kardiyovasküler nevrozlar, kardiyoskleroz, anjina pectoris, miyokardit, serebral vasküler skleroz, hipertansiyonun ilk aşaması, Graves hastalığının hafif formları ve epilepsi için kullanılabileceği, bitki preparatlarının yatıştırıcı özelliklerinin yanı sıra, kan basıncını düşürücü ve kalp kasılma hızını yavaşlatıcı etkilerinin bulunduğu bildirilmiştir. Ancak uterusun düz kaslarını uyardığından, düşük veya erken doğum tetiklenebileceğinden hamilelik sırasında kullanımları sakıncalıdır [200].

Klinik bir çalışmada, *L. cardiaca* ve *L. quinquelobatus*'tan elde edilen iridol yağı ekstresi, içindeki iridoitlerin içeriğine göre standardize edilmiş ve yumuşak jelatin kapsüller içinde paketlenmiştir. Erkek sıçanlar üzerinde yapılan deneylerde, iridolün anksiyolitik aktivitesi, diazepamın etkisiyle karşılaştırılabilir düzeyde tespit edilmiştir. Klinik gözlemler sırasında, incelenen ilacın, psiko-duygusal bozuklukların eşlik ettiği arteriyel hipertansiyonun tedavisinde karmaşık tedavinin etkinliğini arttırdığı, antihipertansif ilaçların dozunu düşürdüğü bildirilmiştir [27].

Leonurus türleri özünün sedatif etkisinin, *Valeriana officinalis* L. bitkisi uygulamasının indüklediği etkiye benzer olduğu [36, 71, 176] hatta daha güçlü olabileceği değerlendirilmiştir.

Arka ayaklarına elektrotlar yerleştirilmiş tavşanlar üzerinde yapılan bir çalışmada, *L. cardiaca* ve *Valeriana officinalis* kökü tentürlerinin yatıştırıcı aktivitesi karşılaştırılmış, tentürlerin uygulanmasından sonra fleksör kaslarının kasılmasına neden olan doğru akım yoğunluğunun ölçülen değerlerindeki artışın, *L. cardiaca* tentürü uygulamasında, kediotu kökü tentürüne göre daha güçlü engelleyici bir etki gösterdiği bildirilmiştir [201].

L. cardiaca'nın %30 etanollü ekstresinin uygulandığı hayvanlarda, labirentte koşarak geçirdikleri süreyi dört kat uzattığı, barbitüratların neden olduğu uyku süresini üç kat arttığı ve spontan aktiviteyi ise yarı yarıya azalttığı için önemli bir yatıştırıcı etki gözlemlendiği bildirilmiştir [36].

Klinik bir araştırmada *L. cardiaca* herbası (50 mg), kediotu kökü (170 mg), limon otu yaprakları (50 mg) ve şerbetçiotu peletleri (50 mg) içeren tabletlerin fitoterapötik yatıştırıcı etkileri, uykusuzluk çeken 50 erkek alkol bağımlısında test edilmiştir. Etki aynı görünümlü 5 mg kediotu kökü içeren tabletlerle bir plasebo ile karşılaştırıldığında, ertesi sabah uyku kalitesinde önemli bir iyileşme ve hafif bir uyku hali gösterdiği, ilaveten ilaç tedavisinin, gece uyanışlarında kayda değer bir azalma sağladığı bildirilmiştir [202].

Ovanesov ve diğerleri tarafından, *L. cardiaca* tentürü de dahil olmak üzere yatıştırıcıların uygulanmasının, bir kaygı durumunun neden olduğu renkleri ayırt etme yeteneğinin, retinanın sınırlamasını azaltıp azaltmadığını belirlemek için bir çalışma yapılmıştır. Hem tofizopam (benzodiazepin türevi) hem de *L. cardiaca* tentürü uygulamasından sonra (10 gün), anksiyetede bir azalma ve renkleri ayırt etme becerisinde bir artış kaydedilmiş ve tedavinin görme üzerindeki olumlu etkisinin, retinadaki GABAerjik sistem ve buna bağlı beyin yapıları üzerindeki etkiden kaynaklanmış olabileceği bildirilmiştir [203].

Bir başka çalışmada da, hafif anksiyete ve depresyon semptomları olan 21 genç hastaya 10 gün boyunca melatonin, *L. cardiaca* tentürü uygulanmış, hastaların uyku kalitesi ve emosyonel durumları ile retina fonksiyonları, yani uyarıcı ışıklara uyarılma eşiği ve görme sürecinin sensomotorik tepki süresi değerlendirilmiş, *L. cardiaca* tentürlerinin anksiyolitik aktivitesi doğrulanmış, ancak melatonininkine kıyasla daha zayıf olduğu ortaya çıkmıştır [204].

Komisyon E, 4.5 g kuru *L. cardiaca* bitkisinden hazırlanan infüzyonların sinirsel kardiyak koşullarda ve tiroid hiperfonksiyonu için bir adjuvan olarak günlük kullanımını (1-3 kez) önermektedir. Öngörülen terapötik dozajlar uygun şekilde uygulanırsa sağlık

tehlikesi veya yan etkisi bilinmemektedir. Aşırı kullanım, kardiyak glikozitler gibi mevcut kardiyak bozukluk tedavisine müdahale edebilir. Hassas kişiler alerjik reaksiyon yaşayabilir. Bitkinin adet döngüsünü etkilediği bilinmektedir. Belgelenen *in vitro* uterotonik aktivite göz önüne alındığında, hamilelik ve emzirme döneminde kullanımından kaçınılmalıdır. Ayrıca 18 yaşın altındaki kişilere tavsiye edilmez [176].

Uçucu yağ bakımından zayıf olduğu bilinen *Leonurus* türleri ile yapılan çalışmalar sınırlı sayıda olup, bu çalışmalarda yağ eldesi fazla miktarlarda bitkiden temin edilmiştir.

Kuzey Kazakistan'da doğal olarak yetişen *L. glaucescens*'ten elde edilen uçucu yağın bileşimi, GC-MS yöntemi ile analiz edilmiş, *L. glaucescens* uçucu yağının ana bileşenleri germakren D (%15.8-27.5), α -pinen (%6.0-13.0), (*E*)- β -karyofilen (%4.7-9.3), α -humulen (%3.7-8.8), büyüme yerlerine bağlı olarak *cis*- β -osimen (%2.3-6.5) olarak bulunmuştur. *Leonurus* türlerinden 10 farklı uçucu yağın bileşimine dayanan hiyerarşik küme analizi ile, Kuzey Kazakistan'da yetişen *L. glaucescens* bileşiminin Litvanya'da yetişen *L. cardiaca*'ya benzer olduğu belirlenmiş ve seskiterpen hidrokarbonların (*-E*)- β -karyofilen, germakren D ve α -humulen) *Leonurus* cinsinin uçucu yağlarının majör bileşenleri olduğu bildirilmiştir [84].

İran'a endemik bir tür olan *L. cardiaca* L. subsp. *persicus* (Boiss.) Rech.'un, toprak üstü kısımlarından elde edilen uçucu yağ GC ve GC-MS kullanılarak analiz edilmiş, uçucu yağın %90.03'ünü temsil eden 46 bileşen tespit edilmiştir. Ana bileşenlerin timol (%35.25), germakren D (%7.62), borneol (%6.69), *trans*-karyofilen (%4.83), γ -gayakol asetat (%4.43) olduğu bildirilmiştir [205].

İran'da yapılan bir başka çalışmada da *L. cardiaca*'nın kurutulmuş toprak üstü kısımlarından elde edilen uçucu yağın bileşimi GC ve GC/MS ile analiz edilmiş, 12 monoterpenoit (%33.9), 19 seskiterpenoit (%60.5) ve 10 terpenoit olmayan (%3.8) bileşik içerdiği ve tanımlanan 41 bileşendeki ana bileşenlerin *epi*-sedrol (%9.7), α -humulen (%9.2), dehidro-1,8-sineol (%8.9), germakren D (%8.9) ve spatulenol (%8.8) olduğu bildirilmiştir [42].

Mockute ve diğerleri tarafından Litvanya'da 6 habitattan tam çiçek açarken toplanan *L. cardiaca* türünden elde edilen uçucu yağları analiz edilmiş, uçucu yağların yaklaşık yarısının (%48.8-62.2) seskiterpen hidrokarbonlardan oluştuğu, ana bileşenlerin ise germakren D (%26.6-35.1), β -karyofilen (%5.8-9.0) ve α -humulen (%6.4-9.2) olduğu bildirilmiştir [41].

L. japonicus bitkisinin kurutulmuş ve toz haline getirilmiş herba ve meyvelerinden hidrodistilasyon ile elde edilen uçucu yağların bileşenleri GC-MS ile incelenmiş, esas olarak diterpenler (%32.77) ve seskiterpenlerin (%45.37) bulunduğu (fiton %19.02, fitol %13.75, karyofilen oksit %11.49, β -karyofilen %9.89) ve uçucu yağların çeşitli Gram-pozitif bakterilere karşı antibakteriyel aktivite gösterdiği bildirilmiştir [206].

Brezilya’da yapılan bir çalışmada da *L. sibiricus* türünün yapraklarından elde edilen uçucu yağ analiz edilmiş ve ana bileşenlerin α -pinen (%25.40), β -karyofilen (%19.01), β -selinen (%11.19) ve α -terpinen (%4.71) olduğu belirlenmiştir [207].

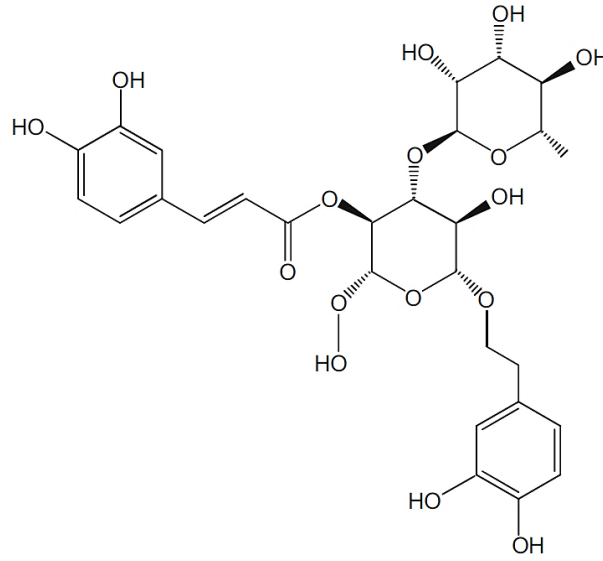
Özbekistan’a endemik türler olan *L. panzerioides* ve *L. turkestanicus*’un toprak üstü kısımlarında elde edilen uçucu yağlarından GC-MS yöntemi kullanılarak yapılan analizde sırasıyla toplam 24 ve 39 bileşen tanımlanmıştır. *L. panzerioides* uçucu yağının ana bileşenleri öjenol (%30.9) ve *p*-vinil gayakol (%15.8) iken, *L. turkestanicus*’un ana bileşenleri timol (%40.1) ve okten-3-ol (%13.1) olarak bildirilmiştir [81].

2.8. Leonurus Türlerinde Tanımlanmış Bazı Bileşikler ile İlgili Genel Bilgiler

2.8.1. Verbaskozit

Fenilpropanoit glikozitler (PPG), bitkiler aleminde yaygın olarak rastlanan en büyük doğal polifenol grubu olan fenilpropanoitlerin (PP) suda çözünür türevleridir. Lamiaceae, Asteraceae, Oleaceae, Liliaceae ve diğerler familyalara ait bitkilerin toprak üstü kısımlarından ve köklerinden elde edilen 200’den fazla farklı PPG bilinmektedir.

Verbaskozit, PPGs grubuna aittir ve yapısal olarak bir kafeik asit (PP kısmı) ve β -(D)-glukopiranozide bağlı 4,5-hidroksifeniletanol (feniletanoid kısım) ile karakterize edilir. Scarpati ve Monache (1963) feniletanoit glikozidi ilk olarak *Verbascum sinuatum* L.’den ekstre edilmiş ve tanımlanmıştır [208]. Verbaskozit, kimyasal yapısı nedeniyle hidrofilik ortamda oldukça çözünürdür.



Şekil 2.5. Verbaskozitin kimyasal yapısı

Genel olarak diğer bitki polifenoller ve özellikle PP'ler gibi PPG'lerin de ya doğrudan reaktif oksijen ve nitrojen türlerini süpüren ya da zincir kırıcı peroksil radikal temizleyicileri rolü oynayan güçlü antioksidanlar olduğuna dair artan kanıtlar vardır [209, 210]. Son zamanlarda, PPG'lerin birçok yararlı etkiye sahip olduğu bildirilmiştir. Yapılan çalışmalarda, verbaskozitin tümörlerin kimyasal olarak önlenmesinde (kemoprevensiyon) etkili olduğu [211, 212] anti-inflamatuar [213, 214], antitrombotik [215], yara iyileştirici [209, 216, 217], fotoprotektif [218] ve kardiyoprotektif etkilere sahip olduğu bildirilmiştir [219]. Bunun yanında verbaskozitin, birçok deneysel çalışmada antioksidan aktivite gösterdiği, doğrudan antioksidatif serbest radikal temizleyici etkilere sahip olduğu bildirilmiştir [218, 220-223].

Verbaskozitin antioksidan etkisi, Aleo ve diğerleri tarafından, çeşitli belirleme yöntemleri kullanılarak yapılan ve çok sayıda doğal antioksidan maddeyi karşılaştıran deneysel bir çalışmada belirtilmiştir [224].

Burgos ve diğerleri tarafından verbaskozitin *in vitro* olarak toplam antioksidan kapasitesi DPPH[•] testi ile belirlenmiş ve referans maddeden (askorbik asit) (284.9 ± 1.2 μ M) daha iyi değerler (58.1 ± 0.6 μ M) gösterdiği bildirilmiştir. HepG2 (insan hepatokarsinoma) ve SH-SY5Y (insan nöroblastoma) hücre hatlarının hücre içi reaktif oksijen türleri (ROS) seviyeleri üzerindeki etkisi de incelenmiş ve verbaskozitin nöroprotektif aktivitesinin kısmen serbest radikal süpürme kabiliyeti ile ilgili olduğu ileri sürülmüştür [225].

Sheng ve diğerkleri verbaskozitin nöroprotektif etkilerini belirlemek için, MTT testini, flow sitometriyi kullanmışlar ve kaspaz-2 aktivitesi ile hücre dışı hidrojen peroksit seviyelerini ölçmüşlerdir. Verbaskozitin, apoptotik ölümü azalttığı ve hücre dışı hidrojen peroksit seviyelerini arttığı sonucuna varmışlardır [226].

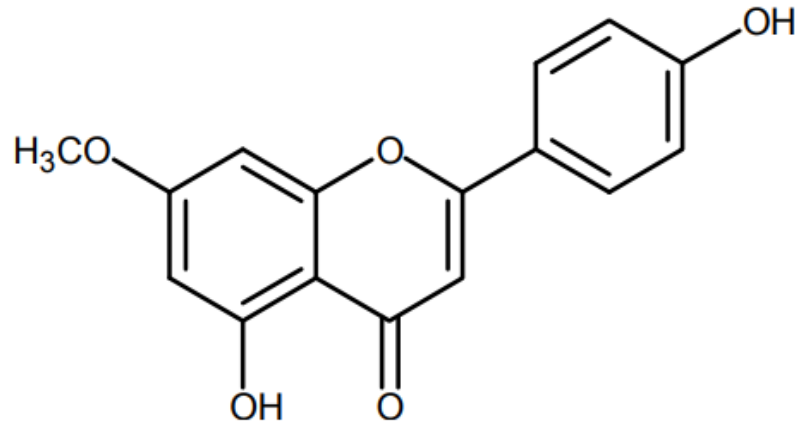
Bir başka çalışmada, verbaskozitin hücre içi bir radikal temizleyici olarak işlev gördüğü ve dolayısıyla sıçandaki kolitin mikroskobik ve makroskopik belirtilerini azalttığı, inflamatuvar bağırsak hastalığının tedavisi için faydalı olabileceği ileri sürülmüştür [227].

Deng ve diğerkleri de yaptıkları benzer bir çalışmada, verbaskozitin Parkinson hastalığını tedavi etmek için kullanılabileceğini, çünkü apoptozu azalttığını öne sürmüşlerdir [228].

Esposito ve diğerkleri verbaskozitin, nöronal nitrik oksit sentazın ekspresyonunu inhibe ederek ve glioma hücrelerinde COX-2'nin aktivasyonunu önleyerek, merkezi sinir iltihabı üzerindeki nöroprotektif etkilerini ortaya koymuşlardır [229]. Verbaskozitin antimikrobiyal etki gösterdiğini bildiren birçok çalışma vardır [230-232].

2.8.2. Genkvanin

Flavonoit ailesi bileşiklerinin temsilcileri arasında yer alan genkvanin, birçok bitkide (*Rosmarinus officinalis* L., *Cistus laurifolius* L., *Aquilaria sinensis* (Lour.) Gilg., *Origanum x intercedens*) mevcuttur. 5,4'-dihidroksi-7-metoksiflavon olarak da adlandırılan genkvanin, ilk olarak geleneksel Çin bitkisi *Daphne genkwa* Siebold & Zucc'dan 1932'de izole edilmiş bir flavondur ve Çin Farmakopesinde Genkva flos'un kalite kontrolü için kullanılmaktadır [233].



Şekil 2.6. Genkvaninin kimyasal yapısı

Birçok çalışmada, genkvaninin tümör hücresi proliferasyonunu inhibe ederek ve antioksidan potansiyelini artırarak tümör büyümesini baskıladığı gösterilmiştir [234-236]. Literatürdeki farmakolojik çalışmalarda, genkvaninin antibakteriyel [237, 238], antiplazmodiyal [239], radikal süpürücü [240] ve kemopreventif [241] olmak üzere çeşitli farmakolojik etkilere sahip olduğu bildirilmiştir.

Gao ve diğerleri tarafından yapılan çalışmada, genkvaninin çok güçlü antienflamatuvar etkiye sahip olduğu da bildirilmiştir [242].

Bir başka çalışmada, *D. genkwa*'dan izole edilen genkvaninin, sıçanlarda iltihaplanma ve eklem yıkımı üzerinde önemli bir terapötik etkiye sahip olduğu bildirilmiştir [233].

Bouzaiene ve diğerleri tarafından yapılan çalışmada ise, genkvaninin B16F10 fare melanoma hücrelerine karşı doza bağlı bir şekilde önemli bir antiproliferatif aktivite sergilediği, ayrıca genkvaninin cilt beyazlatma gibi kozmetik preparatlarda kullanılabileceği bildirilmiştir [243].

Ticari olarak temin edilen genkvaninin, doza bağlı olarak önemli ölçüde ASFV (Afrika domuz gribi virüsü) inhibisyonu gösterdiği, güçlü antiviral aktivite sergilediği ve antiviral ilaç geliştirme adayı olarak değerli olduğu vurgulanmıştır [244].

Wang ve diğerleri tarafından yapılan çalışmada, genkvaninin *in vitro* HT-29 ve SW-480 insan kolorektal kanser hücre dizileri üzerinde bariz bir antiproliferatif ve anti-inflamatuvar aktivite gösterdiği, ayrıca farelerde bağışıklık tepkisini arttırarak ve *in vivo* bağırsak iltihabını azaltarak tümör gelişimini ve ilerlemesini önemli ölçüde engellediği bildirilmiş, genkvaninin kolorektal karsinom kemoprevansiyonunda terapötik bir rol oynadığı ve kanser hastalarının hayat kalitesini iyileştirmek için potansiyel bir ajan olabileceği öne sürülmüştür [245].

2.9. Biyolojik Aktiviteler ile İlgili Genel Bilgiler

2.9.1. Antioksidan aktivite

Oksijen, yaşam için vazgeçilmez bir unsurdur. Oksijenin oksidatif özelliği, çeşitli biyolojik olaylarda hayati bir rol oynarken, oksidatif olaylarla hücre içindeki hasarı da arttırabilir. Oksijen hücre tarafından enerji üretmek için kullanılır ve mitokondri tarafından ATP (adenozin trifosfat) üretimi sonucunda serbest radikaller oluşur. Bir veya birden fazla eşleşmemiş elektronu bulunan atom ya da moleküller olan serbest radikaller, reaktif olup, biyolojik sistemlerde önemli rollere sahiptirler. Oksijen türevi serbest radikaller proteinlere, yağlara, karbonhidratlara ve nükleik asitlere zarar verebilir.

Antioksidanlar ise radikal oluşumunun sınırlandırılması, radikal reaksiyonlarının sona erdirilmesi, oluşan radikallerin etkisiz hale getirilmesi ve hasarlı moleküllerin ortadan kaldırılmasından sorumlu moleküllerdir [246]. Reaktif oksijen türleri (ROS) ve reaktif nitrojen türleri (RNS), hücrel redoks işleminden kaynaklanan yan ürünlerdir. Bu reaktif türler, hem toksik hem de faydalı bileşikler olarak insanda ikili bir rol oynar. İki zıt etkisi arasındaki hassas denge, kuşkusuz hayatın kilit bir yönüdür [247, 248]. Reaktif oksijen türlerinin üretimi ve çeşitli antioksidan savunmaları arasındaki dengesizlik, antioksidanların yetersizliğinden ve/veya reaktif oksijen türlerin artan oluşumundan çıkan oksidatif stresle sonuçlanır. Normal fizyolojik durumda reaktif türlerin oluşumu, farklı enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidanlar tarafından sıkı bir şekilde düzenlenir, ancak aşırı ROS üretimi, lipidler ve zarlar, proteinler ve DNA dahil hücre yapılarına verilen hasarın önemli aracı olan oksidatif stres ile sonuçlanır. Oksidanlar vücutta biyolojik işlevi bozabilirler.

Endojen ve ekzojen maddelerden üretilebilen serbest radikallerin vücutta üretimi ise sürekli olup, normal fizyolojinin bir parçasıdır. ROS düzeylerini ve bunların meydana getirdiği hasarı sınırlandırmak için vücutta birçok savunma mekanizması geliştirilmiştir. Süperoksit dismutaz, katalaz ve glutatyon peroksidaz gibi enzimlerin serbest radikallere karşı savunmada önemli rolleri vardır. C vitamini, E vitamini, selenyum, β -karoten, likopen, lutein ve diğer karotenoitler de yardımcı antioksidanlar olarak kullanılmakta olup, flavonoidler gibi sekonder metabolitler ve terpenoidler de sayılabilir.

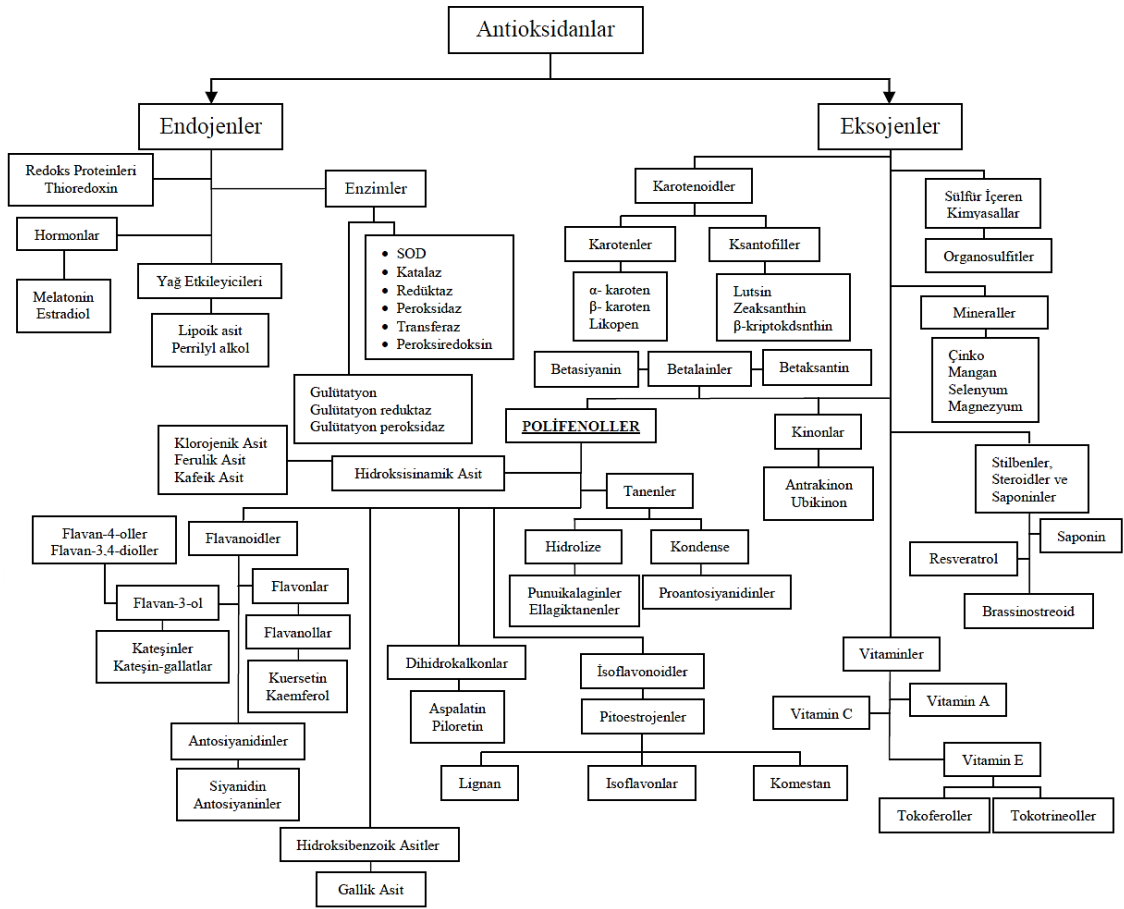
Bitki, hayvan ve mineral kaynaklarından antioksidan tüketiminin insan sağlığı için faydalı olduğu ve serbest radikal kaynaklı hastalıkların görülme sıklığını azaltmada etkili olduğu kanıtlanmıştır. Antioksidanlar aynı zamanda serbest radikal oluşumunun azaltılmasıyla da ilişkili olup, hastalıkların tedavisi için de faydalı olabilmektedir [249,

250]. Bazı çalışmalarda, düşük antioksidan alımının veya düşük antioksidan seviyelerinin farklı hastalık riskini artırdığı, kanser riskini iki katına çıkardığı bildirilmiştir. Bu nedenle, sağlıklı bir yaşam tarzının parçası olarak sağlıklı ve doğal antioksidan takviyeleri, sağlığı oksidatif stresten korumak için kabul edilmektedir [251].

Serbest radikallerin neden olduğu oksidatif stresin, günümüzde kardiyovasküler, nörolojik ve diğer bozukluklarının altında yatan temel bir mekanizma olduğuna inanılmaktadır. Antioksidanlar, serbest radikal kaynaklı hasara karşı önemli savunmamızdır ve optimum sağlığın devamlılığı için kritik öneme sahiptir. Düşük veya orta seviyelerde, reaktif türler hücrel redoks sinyalizasyonu ve bağışıklık fonksiyonu üzerinde faydalı etkiler gösterir, ancak yüksek konsantrasyonlarda, hücre fonksiyonuna ve yapılarına zarar verebilecek zararlı bir süreç olan oksidatif stres üretirler.

Tıp alandaki son gelişmeler, serbest radikallerle ilişkili bir dizi hastalığı bildirmektedir. Günümüzün modern dünyasında, oksidatif strese bağlı hastalık riski, sağlıksız yaşam tarzı, kimyasallara maruz kalma, kirlilik, sigara içme, uyuşturucular, çeşitli hastalıklar ve stres ile birleşmektedir. İnsan sağlığı açısından büyük risk oluşturan başta kanser olmak üzere kalp ve damar hastalıkları gibi pek çok hastalığın ortaya çıkma riskini azaltan veya olumlu etkiler gösteren antioksidanlar, serbest radikalleri temizleyebilen ve oksidatif stres kaynaklı hasar oluşumunu azaltmaya yardımcı olan maddelerdir. Geleneksel bitkisel ilaçlar ve bazı gıdalar, geçmiş yıllardan beri serbest radikallerin neden olduğu hasardan koruyan ana antioksidan kaynağı olarak kullanılmıştır. Bununla birlikte, aşırı antioksidan tüketimi de ciddi yan etkilere neden olabileceği için, dikkatli olunması da önerilmektedir.

Antioksidanlar, düşük konsantrasyonda oksidatif süreci önemli ölçüde inhibe eden veya geciktiren, ancak çoğu kez kendi kendilerine oksitlenen madde olarak tanımlanır ve endojen ve eksojen olmak üzere iki büyük gruba ayrılırlar. Birçok besinsel kaynaktan elde edilebilen endojen (enzimatik) antioksidanların besinlerde en yaygın bulunanları polifenol bileşenlerdir. Vitaminler, karotenoitler, organosülfür bileşenleri ve mineraller ise besinlerden alınan diğer antioksidanlardır [252]. Antioksidanların ayrıntılı olarak sınıflandırılması Şekil 2.7’de verilmiştir.



Şekil 2.7. Antioksidan bileşenlerin sınıflandırılması [253]

Endojen ve eksojen antioksidanlar, redoks dengesini koruyarak serbest radikalleri nötralize etmek ve vücudu serbest radikallerden korumak için kullanılır [254, 255].

Süperoksit dismutaz (SOD), önemli bir endojen antioksidan enzimdir ve birkaç yaygın formda bulunabilir. Süperoksit radikallerini temizleyen ROS'a karşı ilk savunma sistemi olarak hareket eder. Glutasyon ise, bir tripeptid olup, sitozol, çekirdekler ve mitokondride oldukça bol miktarda bulunan güçlü bir enzimatik antioksidandır. C vitamini ve E vitamini, serbest radikallerle reaksiyona giren önemli enzimatik olmayan antioksidandır [256]. β-karoten lipid yönünden zengin dokulara koruma sağlayan güçlü bir antioksidandır. Likopen ise, antioksidan aktiviteye sahip başka bir karotenoit olup, prostat kanserine karşı faydalı bulunmuştur. Selenyum, glutasyon peroksidad dahil çeşitli antioksidan enzimlerin aktif bölgesini oluşturmak için gerekli olan eser bir mineral olup, düşük dozda antioksidan, anti-kanserojen ve immünomodülatör aktivitesi açısından önemlidir [257].

Beta-karoten, kateşinler, koenzim Q10, flavonoidler, lipoik asit, lutein, likopen, selenyum ve C ve E vitaminleri gibi antioksidanlar sebzelerde, meyvelerde, tahıllarda, baklagillerde bolca bulunur ve birçok antioksidan, diyet takviyesi olarak da mevcuttur. Antioksidan takviyeleri genellikle sentetiktir ve bu sentetik formların bazıları, üretimle ilgili kapsamlı işlemlerden dolayı gıdalarda oluşan doğal antioksidanlarla vücut üzerinde aynı etkilere sahip olmayabilir. Antioksidan moleküller, laboratuvar deneylerinde oksidatif hasarı sıklıkla önlese de, antioksidanların (gıda veya takviye formunda) tüketilmesinin gerçekten sağlığa ve antioksidan ihtiyacına faydası olup olmadığı konusunda bazı tartışmalar vardır. İnsanlarda yapılan klinik araştırmalara dayanarak, hastalığı önlemek için antioksidan takviyelerinin kullanımını destekleyen sınırlı bilimsel veri vardır.

Gıdalardaki antioksidanlar genellikle güvenli kabul edilir ve antioksidan takviyeleri ile ilgili çalışmalarda genellikle olumsuz etkiler bildirilmemiştir. Bu nedenle sentetik antioksidan takviyesinin güvenlik yönlerini daha iyi anlamak için daha fazla araştırmaya ihtiyaç vardır ve antioksidan takviyelerinin, hekim konsültasyonu olmaksızın sağlıklı bir diyet veya geleneksel tıbbi bakımın yerine kullanılmaması tavsiye edilmektedir [247].

Hint, Çin, Mısır, Yunan ve Roma geleneksel tıbbi, farklı hastalıkların tedavisi için esas olarak bitkilerden elde edilen doğal maddeleri kullanan çok eski ve tanınmış tıbbi sistemleri içermektedir. Antik çağlardan beri, insanlar bilerek veya bilmeyerek, antioksidan bileşen içeren ve çeşitli yararlılardan sorumlu olan bitki, hayvan ve mineral kaynaklarından yararlanmışlardır. Doğal kaynaklardan elde edilen birçok bileşik, orijinal veya yarı sentetik formlarında ilaç olarak kullanılmıştır.

Bitkilerden türetilen bileşenlerden ilaç öncüleri, ilaç prototipleri ve farmakolojik problemler olarak yararlanılmaktadır. Modern çağda geleneksel tıbbın farklı farmakolojik etkisini keşfederken, fitobileşenlerin izolasyonu ana araştırma ilgi alanıdır. Yapılan birçok çalışmada, geleneksel tıpta kullanılan çok çeşitli bitkilerde antioksidan aktivite tanımlanmıştır [249, 258].

Fitokimyasallar veya bitki bileşenleri, antioksidanların ana kaynağıdır. Bu fitokimyasalların çoğu, redoks aktif moleküllerdir; dolayısıyla redoks dengesini korumak için aktiftirler ve bu nedenle antioksidanlar olarak tanımlanırlar. Bitkilerden elde edilen kimyasallar, bitki metabolizmasındaki rollerine bağlı olarak genellikle birincil veya ikincil bileşenler olarak sınıflandırılmaktadır. Birincil bileşenler; şekerler, amino asitler, proteinler, nükleik asitlerin pürin ve pirimidinleri vb. iken, ikincil bileşenler arasında

alkaloitler, terpenler ve fenolikler yer almaktadır. Fitobileşenler canlı floranın fizyolojik işlevlerinin bir parçası olduğu için, insan vücuduyla daha iyi uyumluluğa sahip olduğu ve sebeple de, bitki bazlı antioksidanların, sentetik antioksidanlardan daha iyi bir biyolojik etkiye sahip olduğuna inanılmaktadır. Son araştırmalarda, serbest radikal temizleyici özelliklere sahip bitki kökenli antioksidanların, oksidatif strese bağlı birçok hastalıkta profilaktik ve tedavi edici ajan olarak büyük önem taşıyabileceği bildirilmiştir [248, 259].

Polifenoller, fitokimyasalların en geniş sınıflarından biri olup, güçlü antioksidanlardır ve aktiviteleri kimyasal yapılarına bağlıdır. Çok fonksiyonlu olup hidrojen atomu verici, singlet oksijeni süpürücü ve indirgeyici olarak davranabilen bitki polifenollerinden bazıları da antioksidan özelliklerini metal iyonlarını şelatlama özelliklerine borçludurlar [260].

Flavonoitler, çoğu bitkide bulunan antioksidan aktiviteye sahip polifenolik bileşiklerdir. Bitkilerin yaprak, tohum, kabuk ve çiçek kısımlarında 4000'den fazla flavonoit tanımlanmış ve flavanoller, flavanonlar, flavonlar, izoflavonlar, kateşinler, antosiyaninler, proantosiyanidinler gibi farklı alt bölümlere ayrılmıştır. Kanser, kardiyovasküler hastalıklar, artrit, yaşlanma, katarakt, hafıza kaybı, felç, Alzheimer hastalığı, iltihaplanma, enfeksiyon gibi bir dizi kronik ve dejeneratif rahatsızlığın farklı flavonoitler tarafından önlediği veya geciktirildiği bildirilmiştir [251, 256, 257].

Flavonoit ve fenolik bileşikler, doğal kaynaklardan sağlanan antioksidanlar olarak faydalı olabilirler. Fenolik bileşiklerin dağılımı, bitkinin farklı kısımları arasında değişiklik gösterir. Fenolik bileşiklerin içerdiği çeşitli fenolik hidroksil grupları, bu yapıların antioksidan aktivite göstermelerini sağlar. Fenolik içerik, hidrojen verme kabiliyeti ile antioksidan etkiye katkıda bulunabilir.

Flavonoitler; antosiyaninler ve antoksantrinler şeklinde sınıflandırılır. Antoksantrinler renksiz veya beyazdan sarıya dönük renktedirler (flavonol, flavanol, flavon, flavanon ve izoflavonlar). Antosiyaninler ise, antosiyanidinlerin glikozitleri olup çiçeklere ve meyvelere kırmızı, mavi ve mor renkleri veren, suda çözülebilen en önemli bitki pigment sınıfıdır. Flavonoitlerin en yaygın sınıfı flavonollerdir (kersetin, rutin, kamferol, mirisetin). Apigenin ve luteolin flavon sınıfına ait temel bileşiklerdendir. Flavonoller ise flavonların indirgenmiş türevleridir. En bilinenleri kateşin ve epikateşindir [260].

Oksidasyonu azaltan veya önleyen kimyasal maddeler olarak bilinen antioksidanlar, serbest radikallerin dokularda zararlı etkilere neden olmasına karşı

koyabildiklerinden, genellikle serebrovasküler hastalıklardan korumak için kullanılırlar [261]. Hücresel düzeyde meydana gelen oksidatif stres, kardiyovasküler hastalıklar için ana patojenik faktör olarak işlev görmektedir. Kardiyovasküler hastalıklar, reaktif oksijen türlerinin (ROS) lipoproteinler, lipitler, protein ve DNA gibi çeşitli biyomoleküllere saldırarak oksidatif hasara neden olmasından kaynaklanmaktadır [262]. Bu oksidatif zarar, farklı birçok hastalığın ortaya çıkmasına sebep olmaktadır.

Kardiyovasküler hastalıkların yanı sıra, romatizma, diyabet, serebrovasküler enfeksiyonlar ve hücrelerin kontrolsüz büyümesi bunlardan bazılarıdır. DNA hasarı ve oksidatif stres, bireysel beslenme ve yaşam tarzına bağlı olarak da ortaya çıkabilmektedir [263].

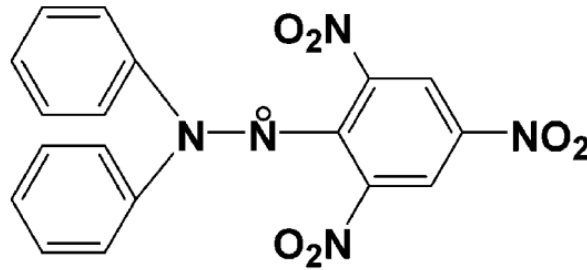
Bitkiler, günümüzde tıbbın tamamlayıcısı olarak oldukça geniş kullanım alanı bulmaktadır. Ucuz olmaları, kolaylıkla elde edilebilmeleri ve ham olarak ya da basit preparatları halinde kullanılabilmeleri bitkilerin en önemli üstünlükleridir. Bitkilerin farklı kısımları (kökleri, yaprakları, dalları/gövdeleri, kabukları, çiçekleri ve meyveleri) genellikle fenolik bileşikler (flavonoidler, fenolik asitler, stilbenler, tanninler, kumarinler, lignanlar ve ligninler) bakımından zengin olup, antioksidan aktivite de dahil olmak üzere pek çok biyolojik etkiye sahiptir [264].

Lamiaceae familyasındaki bitkilerin çoğunun, 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH') deneyi gibi *in vitro* testlerle antioksidan etkiye sahip olduğu kanıtlanmıştır [265-276]. Familya üyelerinin sahip oldukları içerik sebebiyle gösterdikleri antioksidan özellikler çoğunlukla serbest radikalleri temizleme eğilimleri nedeniyle fenolik bileşikler tarafından sergilenmiştir. Fenolik bileşikler, metal iyonlarını şelatlayarak, endojen antioksidan sistemi geliştirerek ve serbest radikallerin oluşumunu önleyerek etki etmektedirler. Ayrıca bu bitkilerdeki antioksidan aktivitesine esas olarak katkıda bulunan diğer kimyasal bileşikler flavonoidler, flavonoller ve diterpenlerdir. Bu nedenle, bitki kaynaklı doğal antioksidan arayışına yönelik çalışmalar son yıllarda daha yoğun hale gelmiştir [277].

Klinik deneyler ve epidemiyolojik çalışmalar, gıda olarak antioksidan alımı ile iltihaplanma, kardiyovasküler hastalık, kanser ve yaşlanmaya bağlı bozukluklar gibi hastalıkların oluşumu arasında ters bir ilişki kurmuştur. Polifenolik bileşiklerin, E ve C vitaminleri ve karotenoidlerin oksidatif stres ile ilgili hastalıkların önlenmesinde etkili bileşikler olduğuna inanılması, antioksidanları artan ilgi konusu haline getirmiş ve antioksidanlar ve oksidatif stres ile ilgili yayınların sayısının son on yılda neredeyse dört katına çıktığı bildirilmiştir [278].

Bu çalışmada bitki örneklerinin toplam antioksidan kapasitesinin belirlenmesine yönelik olarak, maliyeti düşük, uygulanması basit ve kolay tekrarlanabilen DPPH[•] radikal süpürme kapasitesi yöntemi ve karşılaştırma yöntemi olarak da antioksidan kapasitenin belirlenmesinde yaygın kullanımı olan Troloks eşdeğeri antioksidan kapasite (TEAK, TEAC) yöntemi kullanılmıştır.

Sentetik ya da doğal bileşiklerin DPPH[•] radikalini süpürücü etkileri 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil stabil radikalinin menekşe/mor rengini giderme yetenekleri ile ölçülmektedir. DPPH[•] radikali, birkaç kararlı organik azot radikalinden bir tanesidir. Koyu menekşe renktedir. Bu metod, maddelerin DPPH[•] ile oluşturdukları rengin 517 nm’de ölçümüne ve standart madde ile karşılaştırılmasına dayanmaktadır [279].

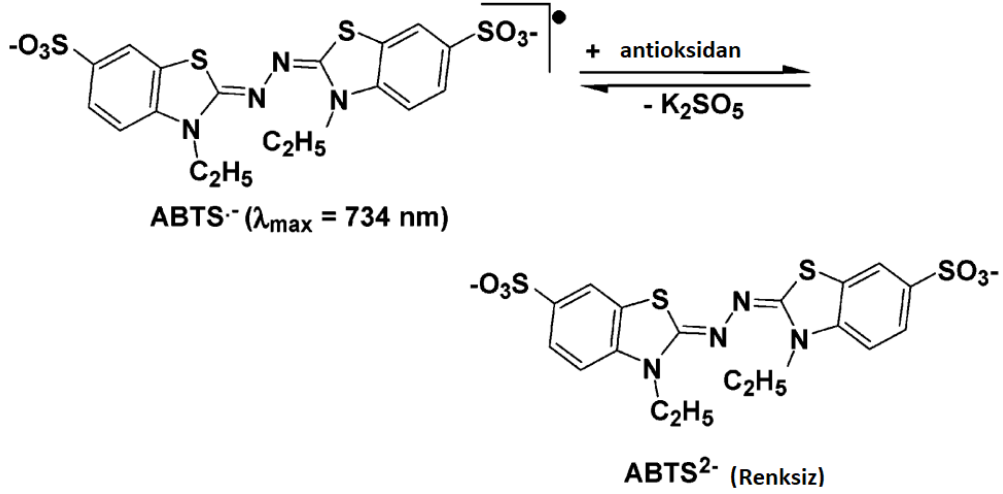


Şekil 2.8. DPPH[•] radikali [278]

DPPH[•] radikalinin antioksidanlar tarafından bir redoks reaksiyonuna bağlı olarak süpürülmesi temeline dayanan bu yöntem, kolay ve hızlı yapılabilir olması ayrıca doğru ve tekrarlanabilir sonuçlar vermesi sebebiyle tercih edilmektedir. Çok sayıda örnek analizi mikroparka kullanılarak yapılabilir. Fenolik bileşiklerin ve gıdaların antioksidan kapasitesini ölçmek ve karşılaştırmak için geniş ölçüde kullanılmakta olan metotta, ölçümlerde ışığın etkisi göz ardı edilmemelidir. Başlangıç DPPH[•] derişiminde %50 azalmaya neden olan derişim EC₅₀ (IC₅₀) olarak tanımlanmaktadır. EC₅₀ denge derişimine ulaşması için gerekli olan zaman, kinetik eğrilerden hesaplanmaktadır. Bu çalışmada, iyi bilinen güçlü bir antioksidan olan gallik asit, DPPH[•] süpürme aktivitesi için pozitif kontrol olarak kullanılmıştır [279].

Karşılaştırma amaçlı olarak uygulanan Troloks (6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilroman-2-karboksilik asit) eşdeğeri antioksidan kapasite yöntemi, antioksidan bileşikler tarafından ABTS^{•+}’nin (2,2’-azinobis (3-etilbenzotiyazolin-6-sülfonik asit)

rengini kaybetmesi temeline dayanır. ABTS'in persülfatla oksidasyonu, $ABTS^{*+}$ radikali oluşturulur.



Şekil 2.9. ABTS'nin persülfatla oksidasyonu [278]

Hem sulu hem de organik çözücülerde çözünebilir olması sebebiyle lipofilik ve hidrofilik bileşiklerin antioksidan kapasitesini ölçmek için kullanılabilen $ABTS^{*+}$ radikali, toplam radikal süpürme kapasitesini ölçmek için kullanılır. Moleküllerin kararlı serbest radikali süpürme kabiliyeti, vitamin E'nin suda çözünebilen bir analogu olan Troloks'un, antioksidan standardı olarak kullanılarak karşılaştırılması ile belirlenir. Uygulamasının kolay olması nedeniyle, TEAC yöntemi antioksidan kapasite çalışması için sıklıkla tercih edilmektedir [279].

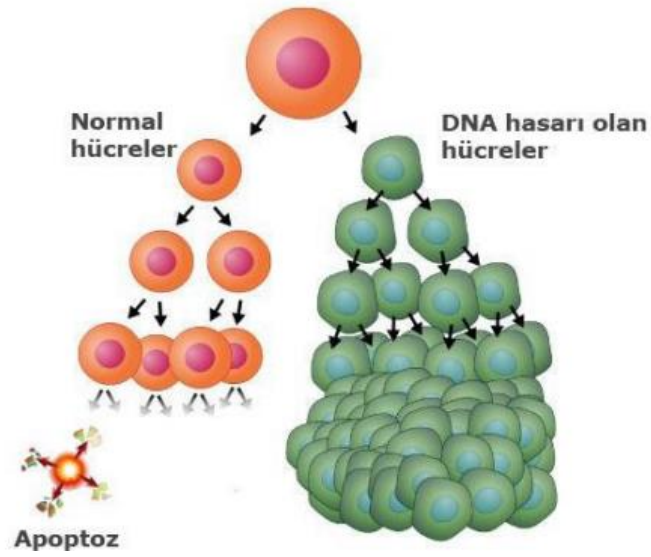
2.9.2. Kanser

2020'de küresel olarak yaklaşık 10 milyon kişinin ölümüne neden olan kanser, kardiyovasküler hastalığı takiben dünya çapında morbidite ve mortalitenin önde gelen nedenlerinden biri olmaya devam etmektedir [280]. Geniş bir hastalık grubunu ifade eder ve bir başlangıç bölgesinden vücudun diğer bölgelerine yayılarak, hücrelerin anormal büyümesi ile karakterizedir. Kanserin ana nedeni hücresel büyüme, olgunlaşma ve programlanmış hücre ölümü üzerindeki normal kontrolleri azaltan veya ortadan kaldıran DNA'daki değişiklikler yani mutasyonlardır. Kanser hücreleri yakınlardaki dokuları istila etmeye ve vücudun uzak bölgelerine metastaz yapmaya devam eder. Metastaz karsinogenezin en ölümcül yönü olup, bu süreç durdurulmazsa, organizmanın ölümüne neden olana kadar ilerleyebilmektedir.

Erkeklerde en sık görülen kanser türleri prostat, akciğer, kolorektal, karaciğer ve mide iken; kadınlar arasında meme, akciğer, tiroid, kolorektal ve serviks kanserleri en sık görülen kanser türleridir. 100'den fazla kanser türü vardır ve her birinin doku kaynağından dolayı ayırt edici özellikleri de farklıdır. Epitel hücrelerinden kaynaklanan kanserler karsinom, mezoderm hücrelerden (kemik ve kas) kaynaklanan kanserler sarkom ve glandüler dokudan (meme) kaynaklanan kanserler adenokarsinom olarak adlandırılır [281].

Kanserlerin kökenlerine bağlı olarak kendine özgü özellikleri ve ayrıca her türün farklı bir ana nedeni bulunmaktadır. Normal gelişim ve hücre farklılaşması, genlerle düzenlenen ve yönetilen biyolojik bir süreç olup, genetik değişim sonucu bu regülasyon bozulduğunda, son nokta malignant görünümün ortaya çıkmasıdır. Çeşitli hücre sinyal yollarındaki değişiklikler, apoptozun düzenlenememesine ve kansere yol açabilmektedir. Hücre döngüsünü düzenleyen ve insan tümörlerinin oluşumunda en yaygın mutasyona uğramış gen olan P53 tümör baskılayıcı geni, bir transkripsiyon faktörüdür. P53'ün kritik rolü, tüm insan kanserlerinin %50'sinden fazlasında mutasyona uğradığının ortaya konulması ile anlaşılabilir. Karsinogenezin temelinde, hücrenin yaşlanması, çoğalmanın kontrolü ve farklılaşma gibi biyolojik olayları etkileyen mutasyonların aşamalı olarak bir araya gelmesi yer almaktadır.

Kanser gelişim sürecinde tümör hücrelerinin kazandığı birçok fenotipik özellik, bu hücrelerin hızlı ve sınırsız çoğalmalarına ve çevre dokuya yayılmalarına neden olmaktadır. *In vitro* kültür koşullarında, kanser hücreleri normal hücrelerden farklı özellikler gösterir.



Şekil 2.10. Normal hücre ve kanser hücresinin çoğalması

Tüm tümörler, iltihaplı immün hücreleri içerir. İltihaplanma, kanserin temel özelliklerinin kazanılmasını kolaylaştırır. Çünkü bu hücreler, enzimler ve büyüme faktörleri sağlayarak anjiyogenezi ve yayılımı teşvik ederler. Normal hücreler, harici sinyaller olarak bölünmek için büyüme faktörlerine ihtiyaç duyar, ancak kanser hücreleri buna ihtiyaç duymaz çünkü kısa devre büyüme faktörü yolları ve ayrıca edinilmiş mutasyonlar düzensiz büyümeye neden olur (Büyüme sinyali otonomisi).

Gen baskısı ve edinilmiş mutasyonlar, inhibe edici yollara müdahale ettikleri için, kanser hücreleri inhibe edici sinyallere yanıt vermez (Evasion of Growth inhibitor signal) ve bağışıklık sistemi tarafından tahrip edilmekten kaçınmak için bir bağışıklık tepkisi başlatmayıp, bağışıklık tahribatından kaçınırlar [282]. Normal hücreler 50 kez bölünebilir (Hay Flick Limit) daha sonra yaşlanabilir çünkü DNA replikasyonunun her turundan sonra kromozomal uçlar (telomerler) kısalır, ancak kanser hücrelerindeki telomerler kısalmaz ve bu da sınırsız replikatif potansiyele (Sınırsız replikatif potansiyel) neden olur [282].

Kanser hücreleri, kökenlerinden vücudun diğer bölgelerine hareket edebilir, ancak normal hücrelerde bu durum gözlenmez. Bunun nedeninin, kanser hücrelerinin genomdaki değişiklikleri olabileceği düşünülmektedir. Bu durum, hücresel-hücre dışı veya hücre-hücre yapışmasına dahil olan yayılıma veya moleküllere dahil olan enzimlerin seviyelerini ve aktivitelerini etkilemeye neden olur. Tümör hücreleri yayılır, intravazasyon yapar, taşınır, ekstrasvazasyon ve metastatik kolonizasyon yaparlar. Kanser hücreleri ve göç eden tümör hücreleri matris metaloproteinazlar ve serin proteazlar

salgılar ve bazal membranı bozar. Serin proteazlar daha sonra endotel hücreleri yoluyla kan dolaşımına geçer (transendotelyal göç). Kan damarları, tümör hücreleri tarafından uyarıldığında kıvrımlı ve sızdıran hale gelir [282].

Normal hücrelerin aktif olmayan süreçleri vardır. Bu aktif olmayan süreçler apoptotik sinyaller tarafından uyarılır. Tümör hücreleri, edinilmiş mutasyonlar nedeniyle kusurlu apoptotik yola sahiptir. Apoptozun düzenlenmesi kanser biyolojisinde çok önemlidir, çünkü bu durumda çok sayıda kanser hücresi kusurludur. DNA hasarı, hücre döngüsünün durmasına veya apoptoz yoluyla hücre ölümüne neden olmaktadır [283]. Hücrelerin genetik olarak belirlenmiş ve ortadan kaldırılmasını içeren programlanmış hücre ölümünün önemli ve ayırt edici bir formu olarak tanımlanan apoptoz, belirli morfolojik ve biyokimyasal özellikler ile karakterize edilen, birçok molekülün rol aldığı enerji bağımlı bir süreçtir. Uygun olmayan apoptoz nörodejeneratif hastalıklar, iskemik zarar, otoimmün rahatsızlıklar ve birçok kanser türü ile sonuçlanmaktadır. Normal hücreler eğer antikanser ilaçlar ve radyasyon gibi fizyolojik olmayan stres tipleri ile karşılaşırse ölüm için programlanırlar. DNA onarımı, mutasyonlara karşı bir savunma türüdür. DNA lezyonları hücre replikasyonundan önce onarılır. Aksi takdirde, bu karsinogenez oluşumuna katkıda bulunur [281].

İnsanlarda kanser için ana tedavi yöntemleri cerrahi, radyasyon ve kemoterapötik ajan kullanımı temeline dayanmaktadır. Kemoterapi uygulamaları, hastaları önemli ölçüde zorlayabildiğinden ve sağlıklarına daha fazla zarar verebildiğinden, alternatif tedavilerin kullanımına odaklanılmaktadır [284]. Kemoterapötik ilaçların çoğu sadece kanser hücrelerine değil aynı zamanda sağlıklı hücrelere de sitotoksik olup, bu ajanların klinik kullanımı doz sınırlayıcı toksisite ve ilaç direnci nedeniyle daralmaktadır. Bu yüzden düşük toksite profiline, az yan etkiye ve uygulama kolaylığına sahip olan doğal ürünlerin kanser tedavisinde kullanımına ihtiyaç duyulmaktadır.

Ortaya çıkma sıklığı yıldan yıla artmakta olan akciğer kanseri, dünya genelinde kanser kaynaklı ölümlerin çoğunu oluşturan ölümcül bir yetişkin kanseri türüdür. Küçük hücreli olmayan akciğer kanseri (NSCLC) insanların hayatını tehdit eden en yaygın insan malignitelerinden biridir ve insidansı artmaya devam etmektedir. Akciğer kanserinin en yaygın nedeni sigara içmektir ve akciğer kanseri vakalarının yaklaşık %87'si sigaradan kaynaklanmaktadır. Bu kanser tipinde metastaz, tedavinin başarısızlığına yol açan en önemli neden olarak bildirilmektedir. Akciğer kanseri tedavisi için terapötik stratejiler arasında ameliyat, radyoterapi, kemoterapi ve hedefe yönelik ve kombine terapiler

bulunmaktadır. Birçok çalışmada bazı bileşiklerin potansiyel kemoterapötik etkileri ortaya konulmuş olmasına karşın, tüm vakaların %80' inden fazlasını temsil eden küçük hücreli olmayan akciğer kanseri tedavisi için kanıtlanmış etkinliğe ve minimal toksisiteye sahip yeni ajanlara ihtiyaç duyulmaktadır ve ilerlemiş küçük hücreli olmayan akciğer kanseri mevcut tedavilere yanıt vermemektedir. Bununla birlikte, NSCLC'nin iyileşme oranı postoperatif komplikasyon, yan etkiler ve nüks nedeniyle çok düşüktür [147, 285].

Meme kanseri, dünya çapında akciğer kanserinden sonra en sık görülen ikinci kanser türüdür ve kadınlarda en yaygın görülen türdür [286]. İnsan meme kanserinin tedavisi için olağan yaklaşımlar arasında ameliyat, radyoterapi, hipertermi, hormon tedavisi ve adjuvan kemoterapi yer almaktadır. Bununla birlikte, meme tümörü oluşumunun biyolojik temelini karmaşıklığı sebebiyle, meme kanserinin geleneksel tedavisinin etkisi her zaman tatmin edici değildir [148].

Bir diğer kanser türü olan gliomlar, beynin destekleyici dokusu olan glial hücrelerde oluşan bir grup tümörü tanımlamak için kullanılan genel bir isimdir. Gliomlar tüm beyin tümörlerinin yaklaşık %30'unu oluşturur ve sıklıkla kötü huyludur. Beyin tümörlerinin oluşum nedeni kesin olarak bilinmemekle birlikte, az sayıda insanda nörofibromatozis ya da tüberöz skleroz gibi genetik hastalıkların gliomlara neden olabileceği bilinmektedir. Fazla radyasyona maruz kalmanın da tümör oluşumuna neden olduğu düşünülmektedir. Gliomlar ya da diğer beyin tümörleri çocukluk çağı dahil her yaşta gelişebilmektedir. Gliomların tedavisi tümörün tipine, büyüklüğüne, hangi evrede olduğuna ve beyindeki yerine göre belirlenmekte olup, yaş ve sağlık durumu gibi faktörler de dikkate alınarak değerlendirilir. Gliomlar dahil tüm beyin tümörlerinin öncelikli tedavisi cerrahi olup, bunun mümkün olmadığı durumlarda tümör yerinde bırakılıp, sadece ışın tedavisi (radyoterapi) ve ilaç tedavisi (kemoterapi) uygulaması yapılabilir. Ancak ilaçların kullanımı heterojenlikleri, kötü prognozları, kan-beyin bariyerinden zayıf penetrasyonları, kullanılan ilaçlara karşı zaman içerisinde kanser hücrelerinin direnç kazanması ve başarısız kemoterapi ve radyoterapi rejimleri nedeniyle daha da karmaşık hale gelmektedir. Gliomaların tedavisi için, mevcut klinik tedaviye tamamlayıcı olabilecek yeni ve güçlü tedavi çözümleri geliştirmek önemlidir. Bu nedenle, etkili ve alternatif terapötik stratejiler ve reaktifler geliştirmek için güçlü bir talep vardır. Kanser tedavisinde güvenli ve daha etkili terapötik ajanlar geliştirmek için fitobileşiklerin kullanımına olan ilgi son yıllarda artmaktadır [15].

Bilim insanları son yıllarda, vücudun bağışıklık hücrelerini kansere karşı güçlendirmek için bitkisel ilaçlar üzerinde yoğunlaşmaktadırlar. Antikanser etkili olan bitkilerin çeşitli bileşenlerinin kompleks sinerjistik etkileşimi değerlendirilerek, bitkisel formülasyonlar hazırlanıp, kanserli hücrelere, vücudun normal hücrelerine zarar vermeden etki edecek şekilde tasarlanmaktadır. Bilinen kanser kemoterapötik ajan sınıfının yüzlerce kimyasal varyantı sentezlenmiştir, ancak bunların büyük bir kısmı ciddi yan etkilere sahip olduğundan, kanser hastaları tedaviye devam ederken ciddi yan etkilere maruz kalmaktadırlar. İdeal bir antikanser ilacı, normal hücrelere zarar vermeden veya en az zararlar kanser hücrelerini öldürmelidir. Bununla birlikte, çok fazla sayıda sentetik ilaç çalışması, prototip ilaçlar üzerinde nispeten küçük iyileştirmelere neden olmuştur. Potansiyel kemoterapötik ajanların tasarımında kullanılacak yeni prototiplere ihtiyaç duyulması, son zamanlarda bitkisel tümör inhibe edici bileşik ortaya koyma çalışmalarının ve yararlı olabileceği düşünülen yeni bileşenlerin ortaya çıkmasına yol açmıştır.

Tıbbi bitkiler ve içerdikleri doğal aktif bileşikler, ilaç keşfinde önemli bir rol oynamış ve bitkilere terapötik ajanlar olarak kullanılma potansiyeli sunmuştur, ancak yaklaşık 300000'den fazla bitki türünün sadece küçük bir yüzdesi fitokimyasal ve biyolojik aktivite çalışmalarında rapor edilmiştir [287].

Bitkiler, kemoterapötik ajan arayışında yeni maddeler ortaya koymak için neredeyse sınırsız bir kapasiteye sahiptir. Mevcut ilaçların büyük bir kısmı hala doğal kaynaklardan elde edilmektedir ve fito-farmasötiklerin modern tıpta kullanımına dünya çapında artan bir ilgi vardır [288].

Son birkaç yılda, antimitojenik ve antikarsinojenik özelliklere sahip doğal ürünlerde önemli ilerlemeler kaydedilmiştir. Ek olarak, bitki kaynaklı antikanser ajanlarının daha güvenli olduğu ve mevcut sentetik antikanser ajanlarından daha az yan etki sağladığı bilinmektedir [289]. Kemopreventif ürünler olarak bilinen doğal bileşikler, çeşitli hücresel modellerde test edilmiş olan antioksidan aktivite, antimitojenik aktivite, enzim modülasyonu, gen ekspresyonu ve apoptoz gibi çeşitli mekanizmalar yoluyla kansere karşı mücadelede büyük bir potansiyel sunmaktadır [290].

Bitkilerde yeni antikanser bileşiklerin arayışının devam etmesi, kanserin önlenmesi ve tedavisi için gerçekçi ve umut verici bir strateji olarak kabul edilmektedir [291]. Ayrıca, antikanser bileşiklerin ve terapilerinin uygulanmasında kullanılması tasarlanan nanopartiküller gibi yeni teknolojilerin kullanıldığı çalışmalar da sürekli ilaç salımını

kontrol etmek için uygulanabilecek ve tedavilerin ciddi yan etkilerini azaltarak dokuya özgü ilaçların yaratılmasına yardımcı olabilecek yöntemlerdendir. Bu nedenle, antikanser etkili bitkilerden doğal olarak türetilen antikanser ajanlar ile alternatif etkin tedavilerin geliştirilmesine ihtiyaç vardır.

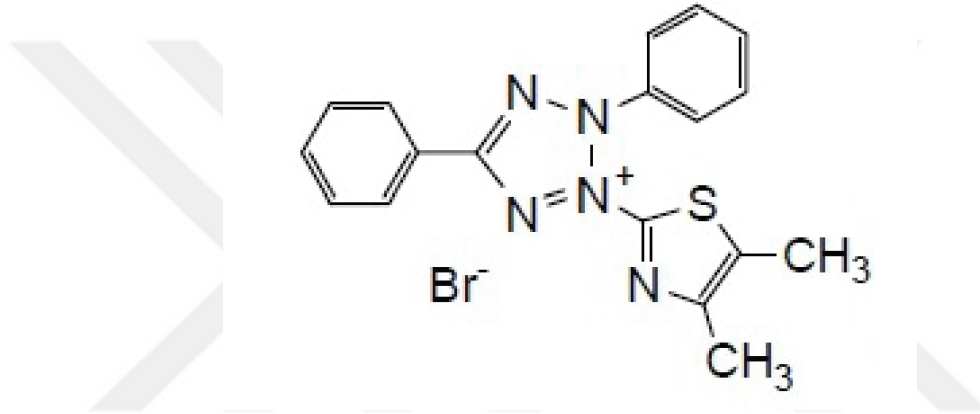
2.9.2.1. Sitotoksik aktivite

Fiziksel etkenler, kimyasal ve biyolojik maddeler, hücreleri farklı derecelerde etkileyerek sitotoksositeye yol açabilmektedir. Sitotoksik terimi, hücre ölümüne neden olan anlamına gelirken, sitotoksosite; canlı hücreler üzerindeki toksik etki oranını ifade etmektedir [292]. Maddelerin ya da bileşenlerin biyolojik etkilerinin değerlendirilebilmesi için, hücreler üzerindeki toksik ya da non-toksik etkisinin belirlenmesi amacıyla yapılan sitotoksosite araştırmaları, toksik olduğu düşünülen maddenin, uygun hücre kültüründe, hücre çoğalma oranı ve hücre üzerindeki toksik etkisi dikkate alınarak değerlendirmesi ile yapılmaktadır [292]. Hücre kültürü, çok hücreli organizmalara ait hücrelerin, laboratuvar ortamında, ısı, nem, besin gibi ortam şartlarının kontrol edilerek kontaminasyondan uzak bir şekilde yaşatılması ve çoğaltılmasıdır [293]. *In vivo* veya *in vitro* olarak yapılabilen test sistemleri ile hücresel hasarın çeşitli ölçüm yöntemleri ile belirlenmesi ve/veya hücresel metabolizmadaki herhangi bir değişikliğin saptanması mümkündür. *In vitro* sitotoksosite testleri, ilaç niteliği taşıyan veya toksik profili araştırılan maddelerin artan konsantrasyonlarda hücrelere uygulanmasıyla, hücre kültüründe gerçekleştirilen ölçüm metodları olup, bu metodlarla çok sayıda madde kısa sürede analiz edilmekte ve ileriki aşamada yapılacak hayvan denemeleri için temel veriler elde edilebilmektedir.

Hücre temelli sitotoksosite çalışmaları, gerek uygulama kolaylığı, gerekse *in vivo* çalışmalardan elde edilen verilerle uyum göstermesi nedeniyle, hayvan deneylerine alternatif olarak doğmuş olup, sıkça tercih edilir hale gelmiştir [292]. Sitotoksosite, incelenen maddenin dozuna ve maruziyet süresine bağlı olarak hücrelere değişik derecelerde zarar veren bir olay olduğundan, hücreler sitotoksik maddeye maruz kalma durumlarına göre apoptoz, otofaji ve nekroz gibi olaylar sonucu ölebilir ya da sitostazis nedeniyle proliferasyon özelliklerini kaybedebilirler [294].

Farklı aşamalara ve duyarlılığa sahip çok sayıda sitotoksosite testi bulunmakla birlikte bu tez çalışmasında, birçok araştırmacı tarafından sıkça tercih edilen kolorimetrik bir metod olan, MTT (3-(4,5-Dimetiltiyazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür) testi tercih edilmiştir.

Tetrazolyum tuzlarının elektron alarak indirgenmeleri, formazan denilen yapıya dönüşmelerini sağlayarak, renk değişikliğine sebep olmaktadır. Sadece aktif mitokondri tarafından kırılabilen tetrazolyum halkası sebebiyle, renk reaksiyonu yalnızca canlı hücreler tarafından meydana getirebilmektedir [295]. Ölü hücreler tetrazolyum bileşiklerini indirgeme yeteneklerini kaybettiklerinden herhangi bir renk değişimine neden olmazlar [292]. Bu değişimin, *in vitro* ortamda yalnızca canlı hücreler tarafından yapılabilmesi, tetrazolyum bileşiklerini biyolojik anlamda oldukça önemli kılmıştır [296]. Bu temele dayanan MTT tesitinde MTT formazana indirgenir, bu esnada oluşan renk kolorimetrik olarak ölçülür. Oluşan formazan miktarı canlı hücre sayısını verir.



Şekil 2.11. MTT bileşiğinin kimyasal yapısı [297]

MTT bileşiği sarı renkli iken, oluşan formazan ise mor renkli olup suda çözünmez niteliktedir ve absorbansın ölçülebilmesi için uygun bir çözücüde (DMSO) çözdürülmelidir [298]. Ancak çözücü olarak genellikle tercih edilen DMSO'nun hücreler üzerine olan toksik etkisi bilinmektedir ve bu da yöntemin dezavantajlarından biri olabilmektedir [299].

2.10. Tez Kapsamında Kullanılan SPSS Teknikleri

2.10.1. Kümeleme analizi

Çok değişkenli analizlerde gruplandırma, tek değişkenli analizlere göre daha karmaşıktır. Çok değişkenli istatistik tekniklerden olan kümeleme analizi, grup sayısı bilinmeyen ve gruplandırılmamış verilerin benzerliklerine göre sınıflandırılması amacıyla kullanılmakta olup, verilerin birimlere veya değişkenlere göre birbirlerine benzerlikleri bakımından ayrık kümelerde toplanmasını sağlayan özetleyici bilgiler sunmayı amaçlayan bir tekniktir. Kümeleme analizi birbirine benzer olan bireylerin aynı

gruplarda toplanmasını amaçlaması bakımından diskriminant (ayırma) analizi ile benzerlik göstermekte olup veri indirgeme özelliği vardır [300].

2.10.2. Ayırma analizi

Bağımlı çok değişkenli istatistik yöntemlerden biri olan diskriminant (ayırma) analizinin amacı ise, birçok popülasyondan gelen gözlemlerin en yüksek olasılıkla hangi popülasyondan geldiğini tahmin etmektir. Yani, bağımsız değişkenler yardımı ile oluşturulan diskriminant fonksiyonları, gözlemleri iki veya daha fazla gruba ayırmakta ve yeni gözlemleri en uygun gruba atamayı sağlamaktadır [301]. Bireylerin gruplandırılmasında kullanılması nedeniyle, diskriminant analizi ile kümeleme analizi de benzerlikler gösterir. Ancak diskriminant analizinde grup ya da küme sayısı bilinmemekte ve bu sayı analiz süresince değişmemektedir. Analizden, bireyleri bu kümelere yerleştirmesi ya da ataması beklenmektedir. Oysaki kümeleme analizinde başlangıçta küme sayısı bilinmemektedir. Ayrıca, diskriminant analizi sonucunda elde edilen diskriminant fonksiyonlarının gelecekte de kullanılması mümkünken, kümeleme analizi sadece mevcut duruma (gruba) ilişkin sonuçlar ürettiğinden, gelecekte kullanılabilirliği yoktur [302].

2.11. Moleküler Sistemik Çalışmaları

Son yıllarda bitki türlerinin tanımlanmasında ve doğal akrabalıklarının belirlenmesinde morfolojik karakterlerin yanı sıra moleküler verilerin kullanılması yaygınlaşmıştır [303]. Türe özgü gen bölgelerinin belirlenmesi, bitki türlerinin tanımlanmasındaki güvenilirliği arttırmaktadır. Bitki teşhislerinde kullanılan geleneksel teşhis anahtarları, türlerin morfolojik, anatomik ve nadiren kimyasal özelliklerine göre çalışılır. Ancak doğru teşhis için farklı türler arasındaki morfolojik ve anatomik farklılıklar yeterli olmayabileceği gibi, farklı habitatlarda yaşayan türlerde birbirlerinden farklı değişimler de gözlenebilmektedir. Yani aynı türlere ait taksonlar farklı morfolojik ve anatomik özellikler gösterebilirler. Bu nedenle genotip fenotipten daha stabildir. Morfolojik olarak ortaya çıkan çeşitlilik, genetik çeşitliliğin küçük bir kısmını oluştururken, genetik çeşitliliğin büyük bir kısmı da morfolojiye yansımaya bilemediğinden, morfolojik tespitler her zaman yeterli olmamaktadır. Bu sebeple DNA'ya bağlı olarak gelişmiş olan moleküler teknolojiler ve markırlar kullanılmaktadır. Moleküler markır; DNA'nın bir parçası, diğer bir deyişle belirli bir genle beraber kalıtılan bir DNA parçası olup, canlı popülasyonundaki çeşitlilik veya o popülasyon içindeki canlı genotipleri arasındaki ilişkilerin tespitinde yüksek güvenilirlikle değerlendirilir [304].

Nüklear (çekirdek) ve sitoplazmik (mitokondri ve kloroplast) kalıtmından sorumlu genetik materyale sahip olan yüksek yapılı bitkilerde bu genetik materyallerin replikasyon modeli ve tamiri birbirinden farklılık gösterir. Mitokondri DNA'sı oldukça değişken olduğu için sistematik çalışmalarda daha çok nüklear DNA ve kloroplast DNA'sı kullanılmaktadır [303].

Moleküler sistematikte; DNA-DNA hibridizasyonu, Protein markırları ve PCR (Polymerase Chain Reaction)'ye dayalı teknikler kullanılmakta olup, son zamanlarda PCR'ye dayalı teknikler sistematik çalışmalarda daha yaygın hale gelmiştir. Bunlar RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA), AFLP (Amplified Fragments Length Polymorphisms), Mikrosatellit gibi özel tekniklerdir [305].

2.11.1. Polimeraz zincir reaksiyonu (PZR)

Polimeraz Zincir Reaksiyonu, spesifik bir DNA parçasının kopyalarının uygun primerler tarafından yönlendirilerek *in vitro* şartlarda enzimatik olarak sentezlenmesi esasına dayanan, moleküler biyolojide uygulanan *in vitro* bir tekniktir [305]. Hızlı, hassas ve ucuz bir teknik olup, çok az miktarda DNA ile dahi çalışmaya olanak sağlamaktadır. PCR belirteç sistemlerinde kullanılan primer olarak adlandırılan oligonükleotidler, genomda bağlandıkları yerlerin arasını çok defa çoğaltırlar. Genomdaki değişik yerlerdeki polimorfizmi bulmak için farklı primer ve primer kombinasyonları tasarlanarak, farklı belirteçler geliştirilebilir. PCR çalışmalarında; DNA (genomik DNA, kloroplast DNA'sı veya mitokondri DNA'sı), primerler (çoğaltılacak olan bölgeyi sağdan ve soldan sınırlayan 18-30 nükleotidlik sentetik oligonükleotid), dNTP'ler (deoksinükleotittrifosfat) (dATP, dCTP, dGTP ve dTTP), DNA-Polimeraz (*Thermoaquaticus*'dan izole edilen yüksek sıcaklığa dayanıklı enzim) ve ihtiyaç duyulan pH ve iyon koşullarını (Mg^{2+}) sağlayan tampon karışımı gerekmektedir [306, 307].

PCR döngüsü aşağıdaki basamaklardan oluşur;

-Denatürasyon (Denaturation): DNA'nın iki zincirinin yüksek ısı ile birbirinden ayrılması (94-95°C).

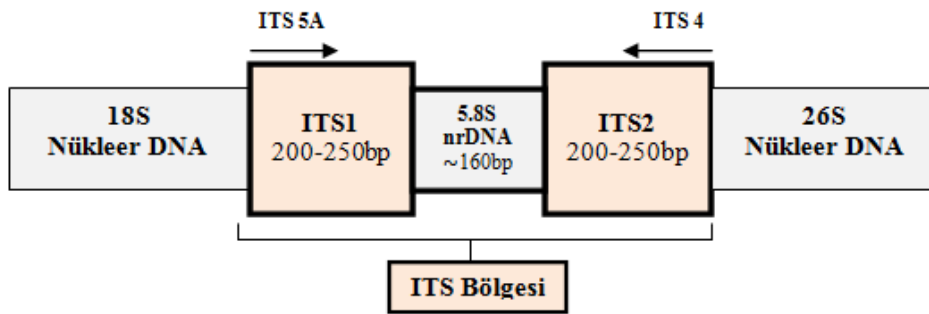
-Primerlerin Bağlanması (Annealing): Ayrılan DNA iplikleri üzerinde hedef bölgeye primerlerin bağlanması (37-65°C).

-Uzama (Extension): Primerlerin bağlandığı istenen bölgelerin uzaması (72°C) ve bu döngülerin belirli sayıda tekrarlanması esasına dayanır.

PCR reaksiyonları sırasında DNA ve magnezyum (MgCl₂) konsantrasyonu, primerlerin DNA dizinine en uygun yapışma sıcaklığı ve primerlerin uzunluğu gibi koşullar, üretilen bantları ve bantların tekrarlanabilirliğini etkiler.

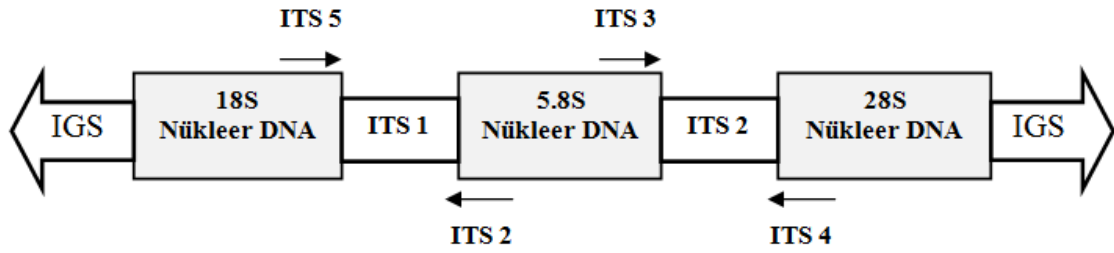
2.11.2. ITS (Internal Transcribed Spacer) bölgesi

Bilinen klasik taksonomik yöntemlerle çözüme kavuşturulamayan birçok sistematik problem, moleküler verilerden elde edilen sonuçlar sayesinde çözümlenmektedir. Bu amaçla kullanılan yöntemlerden birisi nrDNA bölgesi üzerinde bulunan ITS (Internal Transcribed Spacers) PCR'dir. ITS bölgeleri, PCR ile çoğaltılarak bitkilerdeki moleküler sistematik çalışmalarda son yıllarda sıklıkla kullanılan bir bölge haline gelmiştir [305]. Bu tür çalışmalarla, taksonların nrDNA ITS bölgeleri çoğaltılıp baz polimorfizmine bakılarak, taksonlar arasındaki akrabalık dereceleri belirlenebilmektedir. ITS bölgelerinin cins ve tür düzeyinde yapılacak filogenetik bir çalışma için en güvenilir metotlardan olmasının yanısıra, baz dizilerinin, çok daha fazla değişkenlik gösterdiği ve daha bilgilendirici olduğu, ayrıca Angiosperm'lerde değişik seviyelerde filogenetik açıdan daha kullanışlı olduğu bildirilmiştir [308]. Genomik DNA üzerindeki rDNA (ribozomal DNA) bölgeleri, çoklu gen yapılarından oluşur ve ardışık sıralanmış tekrarlı diziler şeklindedir. rDNA tekrarları; genomik DNA'nın nükleolar organizler bölgelerinde yerleşmiş durumda olup, 18S küçük alt birim, 5.8S ve 28S büyük alt birim rDNA'ları kodlayan genlerden oluşmaktadır. ITS bölgeleri, genomik DNA üzerindeki cins ve tür içi seviyelerde ileri derecede korunmuş olan rDNA tekrarları içinde yerleşmişlerdir. Bu bölgeler, rDNA'nın alt birimleri ile transkribe edilmektedir ve korunmuş bölgeleri (18S, 5.8S ve 28S) birbirinden ayıran iki kısımdan (ITS1 ve ITS2) oluşmaktadır (Şekil 2.12) [305].



Şekil 2.12. nrDNA'nın ITS bölgesi [309]

ITS bölgeleri, rDNA gen bölgelerine bağlanabilen evrensel primerler kullanılarak PCR çalışmalarıyla kolayca elde edilebilir. Bu amaçla kullanılan evrensel ITS (ITS2, ITS3, ITS4 ve ITS5) primerlerinin rDNA üzerindeki bağlanma bölgeleri Şekil 2.13'te gösterilmiştir.



Şekil 2.13. ITS Primerlerinin rDNA üzerindeki bağlanma bölgeleri [310]

ITS bölgeleri yeterli veri sunacak kadar uygun bir büyüklüğe (600–700bp) ve genomik DNA üzerinde yüksek kopya sayısına sahiptirler. rDNA'nın olgun 18S, 5.8S ve 28S alt birimlerinin oluşumu sürecinde görev almaktadırlar [305]. Ökaryotik organizmalarda 5.8S gen bölgesi, çoğunlukla ITS bölgeleri ile birlikte değerlendirilir. ITS1 ve ITS2 bölgelerinin filogenetik açıdan sundukları veriler farklı düzeydedir. Bu bölgelere dayalı analizlerde ITS1 verileri, daha fazla filogenetik çözümler sunmaktadır ve nükleotid içeriği ITS2'ye göre %29 daha değişkendir. Bu değişkenlik familya altı seviyelerde özellikle türler ve alttürler arası ya da tür içi ve populasyonlar arası farklılığın ortaya çıkarılmasında sıkça kullanılmaktadır [311].

2.11.3. DNA dizileme

DNA dizi analizleri ya da sekanslama, DNA birincil yapılarının tayininde ve nükleotid baz diziliminin belirlenmesinde kullanılan yöntem olup, bir nükleik asit dizisinin diğerine hibridizasyonuna dayanır. Bu hibridizasyon sırasında radyoaktif ya da radyoaktif olmayan maddelerle işaretleme yapılır. Sıklıkla gen mutasyonları tespiti ya da rekombinant DNA oluşum yapılarının tayininde kullanılır. Nükleotid dizilerinin belirlenmesinde Maxam ve Gilbert'in kimyasal kırılma yöntemi [312] ve Sanger-Coulson'un zincir sonlanma yöntemi [313] olmak üzere iki temel teknik kullanılmaktadır.

2.11.3.1. Sanger dizileme (Cycle Sequencing) yöntemi

Dideoksi ya da zincir sonlanması reaksiyonları olarak da bilinen Sanger Dizileme (Cycle Sequencing) Yöntemi tehlikeli kimyasallardan uzak ve hızlı bir yöntem

olduğundan Maxam-Gilbert yöntemine tercih edilir. Tek iplikçi kalıp DNA'ya, dNTP'lere, ddNTP'lere, DNA polimeraza ve serbest OH grubu içeren primere ihtiyaç duyulan yöntemde analiz için kullanılacak kalıp DNA asimetrik amplifikasyon yöntemiyle hazırlanıp, daha fazla kalıp DNA elde edilir. Reaksiyon sonunda oluşacak ürünlerin rahat görüntülenebilmesi için, ya gama pozisyonunda yapısında bulunduran nükleotitleri kullanarak, ya da alfa pozisyonunda işaretli dNTP'leri kullanarak DNA molekülü işaretlenir. DNA polimeraz, primer kalıp DNA ve dNTP'ler ortama konulup, işaretli nükleotitin yapıya katılması sağlanır. Her tüpe gerekli enzim faktörleriyle birlikte düşük derişimli farklı ddNTP'ler konulur ve inkübe edilir. Sentezin herhangi bir noktasında yapıya dideoksi girdiğinde reaksiyon durur. Her tüpte aynı anda birbirinden bağımsız birçok reaksiyon olur ve sonuçta primer sonundan başlayıp sonlanmaların olduğu bölgelere kadar çeşitli uzunlukta DNA parçaları oluşur.

Oluşan ürünlerin ayrıştırılabilmesi için denatüre edici poliakrilamid jel elektroforezi kullanılır. Elektroforez sonunda jel kurutularak otoradyografi ile fotoğrafı çekilir. İşaretleme yöntemine göre jel üzerinde, tespit edilen parçacıklar reaksiyon karışımına konulan ddNTP'nin tipine göre okunur. Otoradyogramdaki bu bant verilerinden yararlanılarak 5'-3' yönüne doğru olan baz dizilimi saptanmış olur [313, 314].

2.11.4. Filogenetik analiz

Filogenetik analizlerde ilk adım incelenecek dizinin elde edilmesidir. Daha sonra bu diziler referans dizi denilen daha önce saptanmış ve doğruluğuna karar verilmiş dizilerle karşılaştırılabilir. Biyoinformatik; bilgisayar sistemlerini kullanarak veritabanları oluşturmakta, bu veritabanlarını biyolojik verileri daha iyi anlamak için uyarlamaktadır [315, 316]. En önemli birincil veritabanları GenBank NCBI (National Center for Biotechnology Information, Ulusal Biyoteknoloji Bilgi Merkezi, Gen Bankası; ABD-Maryland), The European Molecular Biology Laboratory (Avrupa Moleküler Biyoloji Laboratuvarı; İngiltere-Hinxton) ve The DNA Data Bank of Japan (Japonya veri tabanı; Japonya-Mishima) gen bankası veritabanlarıdır [316-318]. Filogenetik çalışmalarda birincil veritabanları ile oluşturulan gen bankaları hemen hemen her organizmaya ait genomik DNA, mRNA, cDNA gibi nükleik asitlerin yüksek miktarda ham dizi verilerini ve dizi polimorfizm içeriğini kapsamlı olarak bulundurur ve kullanıcıların hizmetine sunar [316-319].

Veritabanı çalışmalarında kullanılan iki büyük algoritma vardır. Bunlar FASTA ve BLAST (Basic Local Alingment Search Tool) algoritmalarıdır. Blast; Blast Stephen Altschul tarafından 1990 yılında NCBI (Ulusal Biyoteknoloji Bilgi Merkezi)'da geliştirilmiş en yaygın programlardan biri olup, sorgulanacak bir dizinin diğer tüm dizilerle hizalanmasını ve karşılaştırılmasını sağlar [316-318]. BLAST analizi ile hedef gen bölgesine ait kısmi veya tüm sekans dizisi dünyanın değişik merkezlerindeki çeşitli araştırmacılar tarafından GenBank veri tabanına girilen sekanslar ile karşılaştırılır. Aynı ve en yüksek benzerliğe sahip olan eşleşmelerdeki benzerlik oranı yüzde olarak verilir [320].

FASTA ise birçok biyoinformatik program tarafından okunabilen, en sık kullanılan, en kolay dizi formatı olup, 1985 yılında David J. Lipman ve William R. Pearson tarafından açıklanan bir DNA ve protein dizisi hizalama yazılım paketidir [316]. Çalışmalarda elde edilen sonuçlar gen bankalarındaki verilerle BLAST programı kullanılarak karşılaştırılırken, tüm verilerin aynı formatta olması gerektiği için, en çok FASTA formatı kullanılır [316, 318]. Dizilerin hizalanması ile dizilerin hangi kısmının korunmuş ve hangi kısımlarının ortak diziden farklılaşmış olduğu belirlenir. Farklılaşma ne kadar fazla ise ortak atadan uzaklaşmaya başlama noktası da o kadar uzaktır. Hizalama için ikili ya da çoklu hizalama programları kullanılır. En sık kullanılan hizalama programları ClustalX, MEGA X (The Molecular Evolutionary Genetics Analysis) ve BioEdit'tir [316, 321, 322]. MEGA X, homolog gen dizilerini çoklu gen aileleri veya farklı türler arasındaki analizler ile DNA'daki ve proteindeki değişim modeline ve evrimsel akrabalığa bağlı sonuç çıkarmak için oluşturulmuş bir yazılımdır [321]. Hizalamanın doğruluğu filogenetik ağacın doğru oluşmasını sağlar.

Filogenetik analizlerde türler arasındaki evrimsel ilişkiyi göstermede, elde edilen verilerin çeşitli akış şemaları ve istatistiksel analizleri filogenetik ağaca dönüştürülmektedir. Filogenetik ağaçlar, yapılan tüm dizileme çalışmalarının sonuçlarının daha net bir şekilde anlaşılması için oldukça önemlidir. Bir filogenetik ağaçtaki gözlenen dallanmalar, dallanma olaylarının modelini ya da bu dallanmanın zamanını tanımlamakta ve meydana gelen türleşmelerin sırasını ve taksonların akrabalık derecelerini kaydetmektedir. Ağaçtaki dış dallar taksonları ifade ederken, iç dallar ve düğümler taksonlar arasındaki ilişkiyi belirtmede, dalların uzunlukları da dalda meydana gelmiş değişikliklerin sayısını belirtmede kullanılmaktadır. Birbiri ile yakın ilişkili olan türler ağaç üzerinde birbirine komşu dallarda yer almaktadırlar [315].

3. GEREÇLER

Bu bölümde çalışmalarda kullanılan bitkisel materyaller ve yapılan deneysel çalışmalarda kullanılan gereç ve yöntemler hakkında bilgi verilmiştir.

3.1. Deneysel Çalışmalarda Kullanılan Materyaller, Kimyasal Madde ve Gereçler

3.1.1. Bitkisel materyal

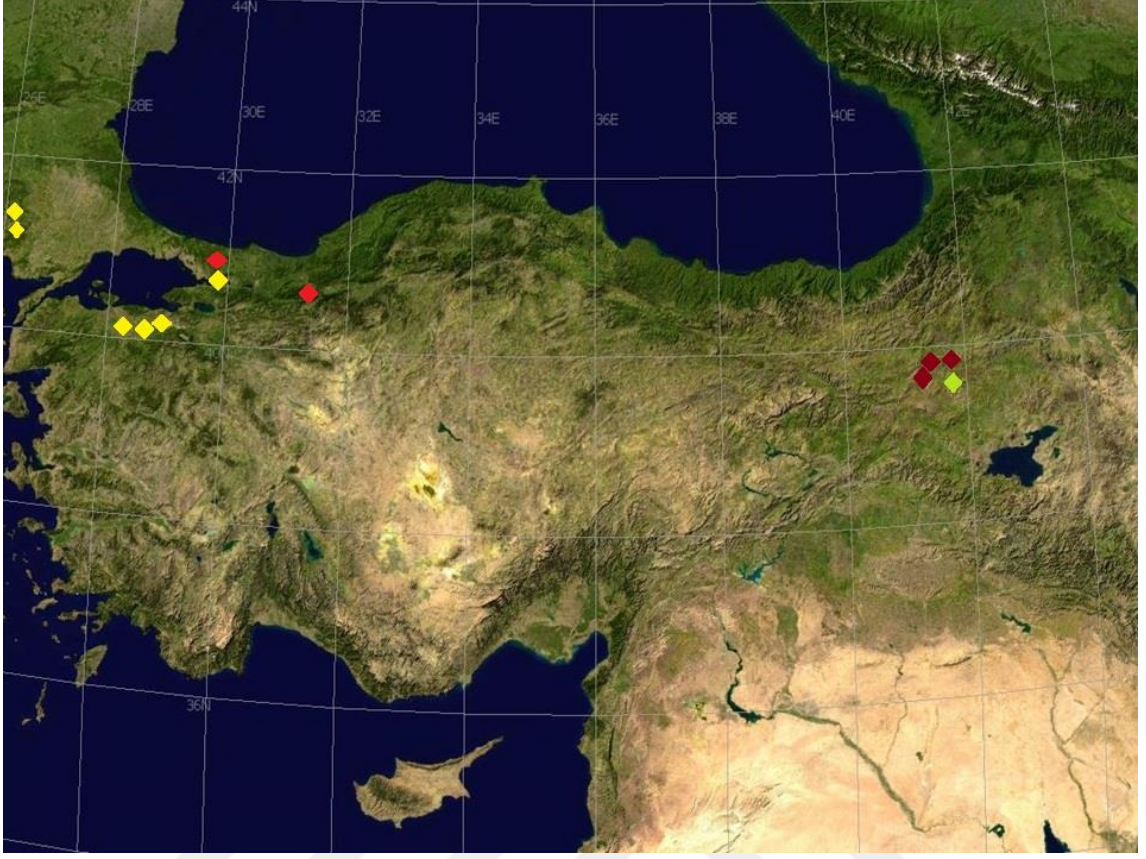
Yapılan arazi çalışmalarıyla Kocaeli, Edirne, Bursa, Bolu, Erzurum ve çevresindeki lokalitelerden tez konusunu oluşturan *Leonurus* cinsine ait tüm türler, çiçekli ve meyveli olarak toplanmıştır (Şekil 3.1). Örnekler popülasyonları temsil edecek şekilde tam gelişmiş ve sağlıklı bireylerden toplanmıştır. Teşhiste P.H. Davis'in "Flora of Turkey and the Aegean Islands" adlı eserinden yararlanılmıştır [3]. Arazi çalışmaları sırasında toplanan tüm türler doğal ortamlarında fotoğraflanmıştır. Toplanan bitkiler, daha sonra yapılacak çalışmalarda kullanılmak üzere gölgede kurutulmuştur. Analizlerde kullanılması planlanan ekstrelerin hazırlanması için gerekli olan materyaller de uygun şartlarda kurutularak çalışma anına kadar saklanmıştır.

Her bir lokaliteye ait olmak üzere, bitkilerin bir kısmı uygun şekilde preslenerek herbaryum örneği haline getirilip, lokalite bilgileri ile birlikte kayıt altına alınmış ve Anadolu Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Herbaryumu'na (ESSE) yerleştirilmiştir. Bitkilere ait lokalite bilgileri ve ESSE numaraları Tablo 3.1'de verilmiştir. Ayrıca, Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Herbaryumu (AEF), Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Herbaryumu (ANK), Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Herbaryumu (HUEF) ve Gazi Üniversitesi Fen Fakültesi Herbaryumu (GAZİ) ziyaret edilerek, *Leonurus* cinsine ait örnekler incelenmiştir.

Tablo 3.1. Bitkilerin lokaliteleri ve ESSE numaraları

Bitki	Lokale Bilgisi/Toplayan	Tarih	ESSE
<i>L. cardiaca</i>	Bursa, İnegöl Süleköy, köy içi 550 m. 40° 2' 21" K 29° 23' 57" D / N. Saltan	22.06.2019	15775
	Bursa, İnegöl Sarıpınar Köyü, köy içi 576 m. 40° 1' 59" K 29° 28' 3" D / N. Saltan	22.06.2019	15776
	Bursa, İnegöl Turgutalp Köyü, köy içi 725 m. 40° 2' 27" K 29° 23' 15" D / N. Saltan	21.07.2019	15777
	Kocaeli, Kandıra Arıklar Göleti yakını 40° 57' 48" K 30° 14' 1" D / N. Saltan	17.07.2019	15778
	Edirne, Tavuk Ormanı, orman içi 41° 41' 32" K 26° 33' 34" D / N. Saltan	27.07.2019	15779
	Edirne, Lalapaşa Kalkansöğüt, köy içi 41° 58' 15" K 26° 48' 48" D / N. Saltan	28.07.2019	15800
	Kocaeli, Çilekli köyü, köy içi 40° 32' 22" K 30° 2' 49" D, / N. Saltan	17.07.2019	15781
	Bolu, Karacasu Köyü, köy içi, 526 m. 40° 35' 32" K 31° 0' 42" D / N. Saltan	19.07.2019	15780
<i>L. quinquelobatus</i>	Erzurum, 39° 44' 35" K 41° 23' 16" D, 2080 m. / YB. Köse	23.07.2019	15783
	Erzurum, 39° 41' 41" K 41° 29' 6" D, 1950 m. / YB. Köse	23.07.2019	15784
	Erzurum, Tortum Kırmalı Köyü, Yayla deresi mevki / YB. Köse	06.08.2019	15785
<i>L. persicus</i>	Erzurum, 39° 42' 1" K 41° 26' 55" D, 1960 m. / YB. Köse	23.07.2019	15782

ESSE: Anadolu Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Herbaryumu



Şekil 3.1. *Leonurus* türlerinin Türkiye'deki yayılışı

3.1.2. Kullanılan kimyasallar

Deneylerde kullanılan kimyasal maddeler ile ilgili bilgiler Tablo 3.2’de verilmiştir.

Tablo 3.2. Deneylerde kullanılan kimyasallar

Kimyasal Madde	Marka
Etanol absolü	Erba pharm.
Metanol	Carlo-Erba
3-(4,5-dimetiltiyazol-2-il)-2,5-Difeniltetrazolyum bromür (MTT)	Sigma
4-Dimetil aminobenzaldehit	Merck
RPMI-1640 medium	Sigma-Aldrich
Fetal bovine serum	Sigma
Dimetil sülfoksit (DMSO) ekstra saf	Sigma-Aldrich
Penisilin/streptomisin çözeltisi	Sigma
Etil asetat	Riedel-de Haen
Folin-Ciocalteu reaktifi	Merck
Distile su	Merck
Gallik asit	Sigma
2,2'-Azino-bis(3-etilbenzotiyazolin-6-sülfonik asit)	Sigma
Trolox, %97	Acros organics
1,1-Difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH [•])	TCI
Potasyum klorür (KCl)	Sigma
Potasyum iyodür	Kimetsan
Potasyum persülfat	Carlo Erba
Hekzametilen tetramin	Carlo Erba
Aseton	Merck
Hidroklorik asit (HCl)	Riedel
Etil asetat	Sigma
Alüminyum klorür (AlCl ₃)	Sigma
Sodyum karbonat (Na ₂ CO ₃)	Merck
TLC Silica Gel 60 F ₂₅₄	Analytical Chromatography
Kloralhidrat	Merck
4-Dimetil-aminobenzaldehid	Merck
Sodyum sülfat	Tekkim
DNA izolasyon kiti	EurXGeneMATRIX Plant& Fungi
DNA Polimeraz Tag polimeraz	Solis Biotek, Estonya
Saflaştırma kiti	Magbio HighPrep™
Dizileme kiti, BigDye Terminator v3.1 Cycle	Applied Biosystems

3.1.3. Kullanılan cihaz ve apareyler

Deneylerde kullanılan cihaz ve apareylere ilişkin bilgiler Tablo 3.3’de verilmiştir.

Tablo 3.3. Deneylerde kullanılan cihaz ve apareyler

Cihaz	Marka
Hassas terazi	Radwag
Çalkalayıcı	Orbital
ELISA Okuyucu	ELx808 IU
İnkübatör	MMM Medcenter™ Incucell
Karbondioksit inkübatörü	Heraeus INSTRUMENTS
Ultrasonik banyo	ELMA S100H (Elmasonic)
Binoküler mikroskop	Nikon SMZ645
Işık mikroskobu ve görüntüleme sistemi	Olympus BX51T ve Kameram
HPLC/MS-MS	Shimadzu HPLC Sistem/ 3200 Q TRAP AB Sciex mass spektrometre, 20A ve 10AVp
Isıticılı manyetik karıştırıcı	Heidolph MR 3001
Liyofilizatör	Labconco
Steril kabin	Nükleon Laboratory Equipment
Rotavapor	Heidolph
Su banyosu	Bandelin Sonorex
UV-Spektrofotometre	Shimadzu
Vortex	Heidolph
TM3030 Plus Tabletop Microscope	Hitachi
Nanodrop	Thermo Scientific Nanodrop 2000
PCR Thermal Cycler	Kyratec
Sanger dizileme cihazı	ABI 3730XL Applied Biosystems

4. YÖNTEMLER

4.1. Botanik Çalışmalar

4.1.1. Morfolojik çalışmalar

Teşhisi tamamlanan bitkilerin morfolojik özelliklerinin bazıları arazi çalışmaları esnasında, büyük bir kısmı da Nikon SMZ645 binoküler mikroskop altında taze örnek kullanılarak tanımlanmıştır. Bitkileri morfolojik olarak görüntülemek için habitatlarındaki görünüşleri ve hazırlanan herbaryum örneklerinin fotoğrafları çekilmiştir. Her türün deskripsiyonu için ortalama 30 örnek üzerinden ölçüm yapılmıştır. Tanımlarda verilen ölçümler, gövde ve yaprakların en geniş bölgelerinden alınmıştır. Türlerle ait olarak verilen deskripsiyonda, gövde özellikleri, yaprak özellikleri, tüy durumu gibi cinse ait taksonomik değeri olan karakterler belirtilip, çiçeklenme zamanı ve habitat bilgileri deskripsiyon sonuna eklenmiştir. Ölçümler stereomikroskop altında milimetrik kâğıtla yapılmıştır. Ayrıca gövde, kaliks ve meyve karakterlerinin *Leonurus* cinsi taksonomisindeki öneminden dolayı, bu kısımların mikromorfolojik yüzey özellikleri de taramalı elektron mikroskobunda (SEM) incelenmiştir.

Bitkinin gövde, kaliks ve meyve yüzeyleri için örnekler direkt olarak çift taraflı yapışkan banda (stap) alınıp, Anadolu Üniversitesi Bitki İlaç ve Bilimsel Araştırmalar Merkezi'nde bulunan taramalı elektron mikroskobunda (SEM) (Hitachi TM3030 Plus Tabletop Microscope) fotoğrafları çekilmiştir.

4.1.2. İstatistiksel çalışmalar

Morfolojik veriler istatistiksel olarak kümeleme analizi ve ayırım (diskriminant) analizi teknikleri ile, IBM SPSS Statistics Base 22.0 programı kullanılarak değerlendirilmiş, türlerin dendogramı çizilmiştir.

4.1.3. Anatomik çalışmalar

Türlerin anatomik özelliklerini belirlemek amacıyla, arazi çalışmaları sırasında gövde ve yaprak numuneleri %70'lik alkole alınmıştır. Her tür için doğal ortamlardan toplanan ergin bitkilerin gövde ve yaprakları kullanılmıştır. Yaprakların orta bölgelerinden enine ve yüzeysel, gövdelerin orta bölgelerinden enine kesitler elle alınmıştır. Tüm kesitler Sartur reaktifi (Laktik asit, Sudan III, anilin, iyot, potasyum iyodür, alkol, su) ile boyanarak, gliserin-jelatin içine alınıp, Kanada Balsamı ile daimileştirilerek ışık mikroskobunda fotoğrafları çekilmiştir (Olympus BX51T ve Kameram Programı).

4.1.4. Palinolojik çalışmalar

Leonurus türlerinin polen yüzeyi için örnekler direkt olarak çift taraflı yapışkan banda (stap) alınıp, polenlerin ayrıntılı yüzey taramalarına ait fotoğraflar Anadolu Üniversitesi Bitki İlaç ve Bilimsel Araştırmalar Merkezi'nde bulunan taramalı elektron mikroskobunda (Hitachi TM3030 Plus Tabletop Microscope) çekilmiştir. Polen terminolojisinde literatürden [323-326] yararlanılmıştır.

4.2. Deneysel Çalışmalar

4.2.1. Ekstrelerin hazırlanışı

Literatür bilgileri göz önünde tutularak, bitkilerden çeşitli ekstraktlar hazırlanmıştır. Bitkisel materyallerin kurutulmuş toprak üstü kısımları kaba toz haline getirildikten sonra %70 etanol ve metanol çözücüler ile 24 saat (8x3) oda sıcaklığında çalkalamalı maserasyona tabi tutulmuştur. Elde edilen ekstraktlar vakum altında rotavaporu (<40°C) yoğunlaştırılarak, çözücüler uzaklaştırılmıştır (Şekil 4.2). Etanollü ekstraktlardaki su ise, liyofilizatörde uzaklaştırılmıştır. Ayrıca bitkinin toprak üstü kısımlarından %5 infüzyon örnekleri, 80°C'deki 100 ml distile su içinde 5 g bitki ile hazırlanmıştır. Sonrasında, su liyofilizatörde uzaklaştırılmış ve tüm ekstraktlar analiz anına kadar -18°C'de koyu renkli şişede saklanmıştır (Şekil 4.1).



Şekil 4.1. Bitki ekstraktları



Şekil 4.2. Rotavapor

4.2.2. Avrupa Farmakopesi'nde belirtilen yöntemler kullanılarak yapılan analizler

Tüm lokalitelerden toplanan bitkilerin toprak üstü kısımları toz edilip, Avrupa Farmakopesi'ndeki [35] prosedürlere göre hazırlanarak, ince tabaka kromatografisi (İTK) yöntemi kullanılmış ve farmakopede belirtilen bantlar ile elde edilen sonuçlar karşılaştırılmıştır. Ek olarak tüm türlerin flavonoit tayini de yapılmıştır.

4.2.2.1. *İnce tabaka kromatografisi (İTK) ile analiz*

Avrupa Farmakopesi'nde [35] yer alan metoda uygun olarak ince tabaka kromatografisi (İTK) ile analiz için, 0.5 g toz edilmiş bitki üzerine 5 mL metanol eklenmiştir. 65°C'deki su banyosunda 5 dk çalkalanıp soğutulmuş ve süzölmüştür.

Mobil faz: glasiyel asetik asit: su: etil asetat (20:20:20, h/h/h)

Üzerine 20 µl numune uygulanan plak tanka alınmıştır. Mobil faz front çizgisine geldiğinde plak alınmıştır. Çözücü plaktan uzaklaştırıldıktan sonra, hazırlanan reaktif (dimetilaminobenzaldehid) plağa püskürtölmüştür. 100-105°C ısıtıcıda 10 dk bekletilip, gün ışığında spotlar değerlendirilmiştir.



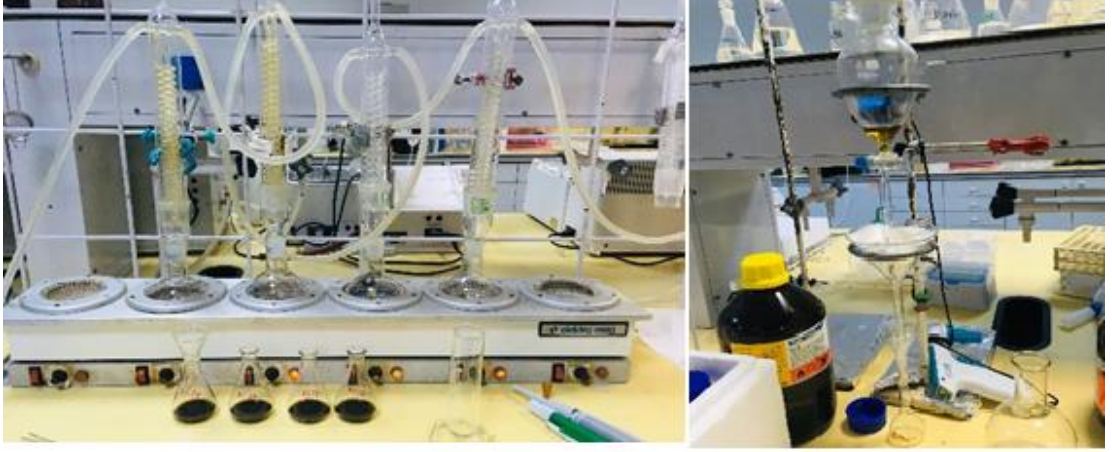
Şekil 4.3. İTK plağı ve numuneler

4.2.2.2. Flavonoit Tayini

Avrupa Farmakopesi'nde [35] önerilen yöntem uygun olarak bitki örneklerinden stok solüsyonu, test solüsyonu ve kontrol solüsyonu hazırlanmıştır.

Stok solüsyonu için;

1 g toz edilmiş drog üzerine 1ml heksametilentetramin eklenmiştir. Üzerine 20 ml aseton ve 2 ml HCl eklenmiş, ısıtıcıda 30 dk kaynatılıp, soğutulmuş ve süzölmüştür. 20 ml aseton eklenip, 10 dk kaynatılıp, soğutulmuş ve süzölmüştür. Tüm süzöntöler bir arada toplanıp, aseton ile 100 ml'ye tamamlanmıştır. Hazırlanan bu karışımından 20 ml alınıp, üzerine 20 ml distile su ve 15 ml aseton eklenmiştir. Çalkalanıp, ayırma hunisine alınmış, üstteki etil asetatlı kısım, toplama kabına alınarak, suyun uzaklaştırılması sağlanmıştır. Sulu kısma 10 ml etil asetat eklenerek, tekrar ayırma hunisine alınmış ve bu işlem 3 kez tekrarlanarak, etil asetatlı kısımlar toplama kabında birleştirilirken, yıkama işlemi yapılmıştır. Karışım 50 ml distile su eklenip, ayırma hunisi ile son yıkama yapılmıştır. Filtre kağıdına sodyum sülfat konup, ayırma hunisinin çeşmesi yavaşça açılarak, karışım süzölmüş ve süzölen karışım, etil asetat ile 50 ml'ye tamamlanmıştır (Şekil 4.4).



Şekil 4.4. Stok solüsyonlarının hazırlanışı

Test solüsyonu için;

Daha önceden hazırlanan stok solüsyonundan 10 ml alınıp, üzerine 1 ml $AlCl_3$ ve metanolde hazırlanmış %5 glasiyel asetik asit eklenmiştir (Şekil 4.5).



Şekil 4.5. Test solüsyonları

Kontrol solüsyonu için;

10 ml stok solüsyonun üzerine metanolde hazırlanmış %5 glasiyel asetik asit eklenmiştir. Numuneler 30 dk bekletildikten sonra 425 nm’de okuma yapılmıştır.



Şekil 4.6. Kontrol ve test solüsyonları

4.3. Biyolojik Aktivite Çalışmaları

4.3.1. Antioksidan etkinin araştırılması

4.3.1.1. 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH[•]) radikalini süpürücü etki tayini

Bu yöntem çok aşamalı ve fazlaca reaktife ihtiyaç duyulan bir yöntem olmayıp, diğer yöntemlerle karşılaştırıldığında ucuz ve hızlıdır. Taze hazırlanan DPPH[•] çözeltisi koyu mor renkli olup, 517 nm’de maksimum absorbands vermektedir. Ortama antioksidan bir madde ilave edildiğinde koyu mor rengin yerini renksiz bir görünüm alır. Böylece antioksidan moleküller, hidrojen veya elektron vererek DPPH[•] molekülüne atak eder ve onu renksiz 2,2-difenil-1-hidrazin ya da başka bir sübstitüye hidrazin analoguna dönüştürür. Bu dönüşüm 517 nm’lik bantta absorbands düşüşüne neden olur. Bu sayede hızlı bir şekilde bileşiklerin/ekstrelerin serbest radikal süpürücü etkileri belirlenmektedir. DPPH[•] radikal süpürücü etki tayini için Kumarasamy ve diğerlerinin yöntemi kullanılmıştır [327].



(A, antioksidan madde; R, radikal madde)

DPPH[•] stok çözeltisi, DPPH[•]’ın son konsantrasyonu 80 µg.mL⁻¹ olacak şekilde hazırlanmıştır. 96 kuyucuklu plakların ilk sütununa sırasıyla 100’er µL metanol (MeOH) ve sırasıyla ekstreler aktarılmıştır. Çok kanallı pipet aracılığıyla, eşit miktarda MeOH

içinde seri seyreltme yapılmıştır. Her kuyucuğa 100 µL DPPH[•] çözeltisinden eklenerek tepkime başlatılıp 30 dakika süreyle karanlıkta inkübe edilmiştir. Gallik asit pozitif kontrol, DPPH[•]+MeOH negatif kontrol, sadece MeOH ise kör olarak aynı mikro plağa uygulanmıştır. UV absorbans 517 nm’de mikropate spektrofotometre kullanılarak, oda sıcaklığında okunmuştur. Sonuçlar, ortalama ± standart sapma (n=8) olarak ifade edilmiştir. % inhibisyon yüzdesi aşağıdaki formül ile hesaplanmıştır [327]. IC₅₀ değerleri nonlineer regresyon eğrileri kullanılarak (Sigma Plot 13. version, SPSS Inc., Chicago, IL) belirlenip, değerler üç paralel deneyin ortalaması olarak verilmiştir.

$$\% \text{ İnhibisyon} = [(\text{Abskontrol} - \text{Absörnek}) / \text{Abskontrol}] \times 100 \quad (4.2)$$

4.3.1.2. ABTS radikal süpürücü etki tayini (Troloks Eşdeğeri Antioksidan Kapasite-TEAK)

Maddelerin total antioksidan aktivitelerini ölçmede kullanılan spektrofotometrik metotlardan birisi de ABTS^{•+} (2,2’-Azino-bis(3-etilbenzotiyazolin-6-sülfonik asit) diamonyum tuzu) radikal katyonu ile yapılan deneylerdir. TEAK analizi, ABTS^{•+} radikal katyonunun antioksidanlar tarafından absorbansının engellenmesi temeline dayanır. Radikal katyon formunda üretilen ABTS^{•+}, temel spektrofotometrik olarak çeşitli maddelerin toplam antioksidan aktivitesini ölçmede uygulanır. Bu yöntem ile potasyum persülfat ve ABTS^{•+}’in reaksiyonu sonucu mavi/yeşil ABTS^{•+} kromoforu meydana gelmektedir. Bu madde, 645, 734 ve 815 nm dalga boylarında maksimum absorbans vermektedir. ABTS çözeltisi seyreltilir ve yaklaşık 10 dakika içinde absorbansı ölçüldükten sonra farklı konsantrasyonlardaki ekstrelerin ilk karışımları ölçülür. Ortama antioksidan ilavesiyle okside haldeki mavi/yeşil ABTS^{•+} antioksidan tarafından zaman ve konsantrasyona bağlı olarak redüklenir ve renk düşüşüne bağlı olarak absorbans değerlerinde azalma kaydedilir. Troloks, Vitamin E’nin suda çözünen analogu olup referans standart olarak kullanılır ve sonuçlar Troloks eşdeğeri olarak verilir [328]. Analiz geniş bir şekilde bitkilerin antioksidan özelliklerini tespit etmek için kullanılmaktadır.

36 mg (7 mM) ABTS ve 6.6 mg (2.5 mM) K₂S₂O₈ (potasyum persülfat) tartılıp, 10 mL distile suda mavimsi-yeşil renkte ABTS çözeltisi hazırlanmıştır. Daha sonra 16 saat boyunca karanlık ortamda reaktifin aktif hale gelmesi için beklenmiştir. Potasyum persülfat etkisi ile ABTS oksitlenir ve aktif ABTS^{•+} radikal katyon oluşur. Hazırlanan stok çözelti karanlık serin ortamda kapağı kapatılarak muhafaza edilmiştir. Daha sonra bu stok çözeltiden 1 ml alınarak spektrofotometrede 734 nm’de absorbansı 0.700-0.800 arasında olana kadar absolü etanol ile seyreltilmiştir (UV-Spektrofotometre, Shimadzu)

(Şekil 4.7). Standart olarak Troloks çözeltileri (mM) 3; 2; 1; 0.5; 0.25 konsantrasyonlarında hazırlanmıştır (absolü etanolde). 10 µL Troloks çözeltisi 990 µL ABTS^{•+} ile karıştırılarak 734 nm’de 30 dakika sonra absorbansı ölçülmüştür. Troloks için linear doğru denklemi elde edilmiş, bu doğru denklemi kullanılarak numunelerin 30. dakikada ortaya koyduğu inhibisyon etkileri ile Troloks eşdeğeri antioksidan süpürücü etki hesaplanmıştır.



Şekil 4.7. UV-spektrofotometre

4.3.1.3. Folin-Ciocalteu Reaktifi (FCR) ile Toplam Fenolik Yöntemi (Toplam Fenol Miktar Tayini)

Ekstrelerdeki toplam fenol miktarı mg Gallik Asit’e eşdeğer olarak Folin-Ciocalteu reaktifi yöntemiyle tayin edilmiştir. Toplam fenolik ayırıcı olarak bilinen Folin-Ciocalteu reaktifi (FCR) bazlı yöntem, örneğin indirgeme kapasitesini tayin etmektedir. Standart bileşik olarak genellikle gallik asit kullanılır ve sonuçlar gallik asit eşiti (mg/mL) olarak verilir. Gallik asitin 0.5-0.03 mg/mL konsantrasyon aralığında farklı çözeltileri hazırlanıp, 760 nm’de absorbans değerleri kaydedilmiş, gallik asitin konsantrasyon-absorbans grafiği çizilerek kalibrasyon denklemi belirlenmiştir. 20 uL numune üzerine, 1560 uL saf su ve 100 uL Folin-Ciocalteu reaktifi eklenmiştir. 1-8 dakika beklendikten sonra 300 uL %20’lik Na₂CO₃ çözeltisi ilave edilip, 2 saat 25 °C’de inkübasyona bırakılmıştır. Süre sonunda 760 nm’de absorbans ölçümleri alınarak gallik asit kalibrasyon eğrisiyle karşılaştırılmıştır. Toplam fenolik madde miktarı gallik asite

eşdeğer olarak hesaplanmıştır. Kontrol olarak ekstre içermeyen reaktif karışımı ve çözücü kullanılmıştır. Üç paralel deney yapılarak sonuçlar ortalama değerler olarak verilmiştir [329, 330].

4.3.2. Antimikrobiyal duyarlılık testleri

Klinik Laboratuvar Standartları Enstitüsü'nün yayımladığı CLSI M7-A7 protokolü aerobik olarak gelişen bakterilerin duyarlılıklarını standart antimikrobiyaller şahitliğinde ölçerken, CLSI M27-A2 metodu ise patojen mayalara karşı test örneklerinin antifungal etkilerini ortaya koymaktadır.

4.3.2.1. Mikro dilüsyon yöntemi ile antibakteriyel etkinin belirlenmesi

Tablo 4.1'de listelenen bakteriler deneyden 1 gün önce Mueller Hinton Broth (MHB) besiyerine alınmış, 37°C'de 24 saat inkübe edilmiştir. Gelişen kültürlerden MHB içeren tüplere belirli miktarlarda aktararak bulanıklıkları McFarland No: 0.5'e göre ayarlanmıştır. Bu şekilde yaklaşık 10^8 CFU/ml'lik (mililitredeki koloni oluşturan ünite) bakteri konsantrasyonu elde edilmiştir. Daha sonra besiyeri ile yapılan 1:40 ve 1:5 oranındaki seyreltmeler sonunda, bakteri konsantrasyonu 5×10^5 CFU/mL şeklinde olmuştur. Numuneler 16 mg tartılarak steril DMSO'da çözülerek stok çözeltileri hazırlanmıştır. Önceden 100'er µl steril MHB aktarılmış "U tipi" 96 kuyucuklu mikrotitrasyon plaklarında çift katlı seri dilüsyonları hazırlanmıştır. 8 mg/ml ile 0.001 mg/ml aralığında madde konsantrasyonları elde edildikten sonra, otomatik multikanal pipetör kullanılarak 100'er µl bakteri kültürlerinden ilave edilmiştir. Plakların kapakları kapatılarak uygun sıcaklıklarda, 24 saat süreyle inkübasyona bırakılmıştır. Bu süre sonunda üremenin olduğu alanların daha iyi belirlenebilmesi için her kuyucuğa Resazurin çözeltisinden 20'şer µl ilave edilmiştir. 2 saat daha etüvde bekletilen plaklar incelenerek, mavi-mor renkli resazurinin üreme olan kuyucukları pembeye boyadığı gözlenmiş ve minimum inhibitör konsantrasyonları (MİK) belirlenmiştir. Resazurin hücresel metabolik aktivite ile metabolik redüksiyona uğrayan bir redoks indikatörüdür. Redükte formu rezorufin olarak adlandırılır ve pembe renkli ve yüksek derecede floresan özellikli bir bileşiktir. Standart antimikrobiyal madde olarak Ampisilin ve Kloramfenikol kullanılmıştır.

Tablo 4.1. Antibakteriyal aktivite tayininde kullanılan mikroorganizmalar

Mikroorganizma	Suş No
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 8739
<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i>	ATCC 6538
<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i>	ATCC 14028
<i>Enterococcus faecalis</i>	ATCC 29212
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	ATCC 12228
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 7853

4.3.2.2. Mikro dilüsyon yöntemi ile antikandidal etkinin belirlenmesi

Antikandidal etkinin belirlenmesinde CLSI (Klinik Laboratuvar Standartları Enstitüsü) M27-A2, sıvı mikro dilüsyon protokolü Tablo 4.2’de listelenen 6 patojen mikroorganizmaya karşı denenmiştir. Standart antifungaller ve ekstreler steril DMSO içinde çözülerek kullanılmıştır. Gecelik kültürden alınan saf koloniler serum fizyolojikte (%0.85) süspanse edildikten sonra, bulanıklıkları McFarland No: 0.5’e göre ayarlanmıştır. Antibakteriyel deneyden farklı olarak, besiyeri olarak RPMI kullanılmış ve deneyde kullanılan final mikroorganizma yoğunluğu 10^3 CFU/ml olacak şekilde hazırlanmıştır. Standart antifungal madde olarak Amfoterisin-B ve Ketokonazol kullanılmıştır. Plakta bir kuyucuk satırı üreme kontrolü olarak, diğer bir kuyucuk satırı da çözücü kontrolü, bir sütun sterilizasyon kontrolü olarak kullanılmıştır.

Tablo 4.2. Antikandidal aktivite tayininde kullanılan mikroorganizmalar

Mikroorganizma	Suş No
<i>Candida albicans</i>	ATCC 10231
<i>C. utilis</i>	NRRL Y-900
<i>C. albicans</i>	ATCC 90028
<i>C tropicalis</i>	ATCC 750
<i>C parapsilosis</i>	ATCC 22019*
<i>C. krusei</i>	ATCC 6258*

4.3.3. Sitotoksik etkinin araştırılması

Bileşiklerin antikanser aktivitesinin araştırılmasında A549 (insan akciğer karsinoma hücre dizisi), MCF7 (insan meme adenokarsinoma hücre dizisi) ve C6 (Sıçan glioma hücre dizisi) hücre dizileri üzerinde MTT yöntemi uygulanarak, ekstrelerin etkileri değerlendirilmiştir. MTT yöntemi hücre canlılığının belirlenmesi için sıkça kullanılan pratik bir yöntemdir. Hücrelerin MTT indirgeme özelliği hücre canlılığının ölçütü olarak alınır ve MTT analizi sonucunda elde edilen boya yoğunluğu canlı hücre sayısı ile korelasyon gösterir [152]. Bu hücre dizileri için besiyeri olarak fetal calf serum ve 100 IU/mL penisilin ve 100 mg/mL streptomisin ilave edilmiş RPMI 1640 kullanılmıştır. Ekstreler, dimetilsülfoksit (DMSO) içinde çözülerek stok çözeltileri hazırlanmış, hücrelerin yaşayabilirliğine etki etmeyecek şekilde ve son kültür ortamındaki konsantrasyonu %0.1'den düşük olacak şekilde yine DMSO kullanılarak uygun seyreltmeler yapılmıştır. Elde edilen ekstrelerin antikanser etkinliklerinin kıyaslanabilmesi amacı ile günümüzde kanser tedavisinde rutin olarak kullanılan doksorubisin, aktivite çalışmalarında kullanılmıştır. Doksorubisin (DOX), geniş antitümör spektrumuna sahip kinin içeren bir antitümör antibiyotiktir. Genellikle şiddetli lösemiler, lenfomalar ve katı tümörler dahil olmak üzere çeşitli kanserleri tedavi etmek için kullanılmaktadır.

4.3.3.1. Hücrelerin çoğaltılması

Deneylerde kullanılan A549, MCF7 ve C6 hücre dizilerinin çoğaltılması ve deneye hazırlanması için 2-3 günde bir rutin olarak pasajlama işlemi yapılmıştır. İnkübatörden

alınan hücre kültür şişesi, ölü hücrelerin besiyeri çözeltisine geçmesini sağlamak için hafifçe çalkalanıp, steril bir pipetle kültür şişesi içindeki besiyeri alınarak atılmıştır. Hücrelerin yıkanması için kültür şişesine 5 ml fosfat tamponu ilave edilerek yıkanmış ve yıkama çözeltisi ortamdan uzaklaştırılmıştır. Kültür şişesine tripsin EDTA çözeltisi (1X) (75 cm²'lik kültür şişelerine 3-5 ml, 25 cm²'lik 1-3 ml) konularak hafifçe çalkalandıktan sonra inkübatörde yaklaşık 5 dk. bekletilmiştir (%5 CO₂, %95 nem ve 37°C). İnkübatörden alınan kültür şişelerinin üzerine 20-25 ml besiyeri ilave edilerek hücreler süspanse edilip ve 1:2, 1:3 bölünerek yeni kültür şişelerine alınmıştır. Kültür şişeleri inkübatöre konularak inkübasyona bırakılmıştır (%5 CO₂, % 95 nem ve 37°C).

4.3.3.2. Hücrelerin plakalara ekilmesi

İnkübatörden alınan hücre kültür şişesi, ölü hücrelerin besiyeri çözeltisine geçmesi sağlamak için hafifçe çalkalanmış ve sonra steril bir pipetle kültür şişesi içindeki besiyeri alınarak atılmıştır. Kültür şişesine tripsin-EDTA çözeltisi (1X) (75 cm²'lik kültür şişelerine 3-5 ml, 25 cm²'lik 1-3 ml) konularak hafifçe çalkalandıktan sonra inkübatörde yaklaşık 2-3 dk. bekletilmiştir (%5 CO₂, %95 nem ve 37°C). İnkübatörden alınan kültür şişelerinin içine besiyeri ilave edilerek pipet yardımıyla santrifüj tüpüne alınmıştır. Santrifüj tüpü içindeki hücre süspansiyonu çalkalandıktan sonra 10 µL alınarak otomatik hücre sayma cihazında sayılmıştır. Hücre süspansiyonu küvetlere alınmış ve 200 µL/kuyucuk olacak şekilde 96 kuyucuklu hücre kültür plakasına dağıtılarak (1.10⁴ hücre/100 µL) 24 saat inkübasyona bırakılmıştır (%5 CO₂, %95 nem ve 37°C).

4.3.3.3. MTT Sitotoksosite Testinin Uygulanması

Tetrazolyum tuzları olan XTT (2,3-bis[2-metoksi-4-nitro-5-sülfofenil]-2H-tetrazolyum-5-karboksianilit tuzu) ve MTT (3-[4,5-dimetiltiyazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolyum bromür) canlı hücrelerdeki metabolik aktivitenin ölçülmesinde kullanılmaktadır. Tetrazolium tuzları metabolizma ve solunum zinciri intakt hücrelerde mitokondriyal süksinat dehidrogenaz enzimi ile formazana dönüşmektedir. Mitokondriyal süksinat dehidrogenaz sarı renkli tetrazolyum tuzunu elektron kenetli reaktif varlığında çözünür turuncu renkli formazana dönüştürmektedir [331]. 24 saatlik inkübasyon süresi sonunda plakalar ters çevrilerek besiyeri ortamdan uzaklaştırılmıştır. Ekstrelerin 7.81 mg/mL-1000 mg/mL aralığında hazırlanan 8 seri konsantrasyonu (stok çözeltiler DMSO içinde) pozitif kontroller ile birlikte plakalara uygulanıp, 24 saat inkübasyona bırakılmıştır (%5 CO₂, %95 nem ve 37°C). İnkübasyon süresinden sonra

hücre kültürlerinin üst kısmı ters çevrilerek atılmıştır. Hücreler fosfat tamponu ile yıkanmış ve yıkama çözeltisi ortamdan uzaklaştırılıp, MTT çözeltisi (5 mg/ml) ve besiyeri 1:10 oranında karıştırılmıştır. Hücre kültür plakasına 100 µL/kuyucuk olacak şekilde bu çözelti karışımından ilave edilmiştir. 3 saat inkübasyona bırakılmıştır (%5 CO₂, %95 nem ve 37°C). 3 saatlik inkübasyon süresi sonunda kültür ortamı uzaklaştırılıp, hücre kültür plakasına DMSO çözeltisinden 100 µL/kuyucuk olacak ilave edilmiş ve kuyucukların ELISA'da 540 nm' de OD (ortalama değer) değerleri okunmuştur. Test edilen tüm konsantrasyonlar için 3 tekrar yapılmış ve test maddelerinin her bir konsantrasyonu için % inhibisyon değerleri hesaplanmıştır. Non-lineer regresyon analizi ile maddelerin inhibitör konsantrasyon 50 (IC₅₀) değerleri hesaplanmış ve maddelerin sitotoksik özellikleri yorumlanmıştır.

4.4. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi/Kütle Spektroskopisi-Kütle Spektroskopisi (YPSK-KS/KS) ile Analizler

LC-MS/MS analizi, Applied Biosystems 3200 Q-Trap MS/MS dedektörüne bağlı, Shimadzu 20A HPLC sistemi ile yapılmıştır. İyonlaşma modu Elektro Sprey İyonlaşma (ESI) ile negatif modda gerçekleşmiştir. Kromatografik ayırma için 150 × 4.6 mm, 3 µm ODS kolon kullanılmıştır. Analizler 40 °C ve PDA dedektörü ile gerçekleşmiştir. Mobil fazla (A) Metanol: su: formik asit (10:89:1, *h/h/h*) ve (B) Metanol: su: formik asit (89:10:1, *h/h/h*) olarak seçilmiştir. B'nin konsantrasyonu 40 dakikada %10'dan %100'e çıkarılmıştır. Akış 0.5 mL/dakika olarak ayarlanmıştır.

4.5. DNA Dizi Analizi

DNA izolasyonu, PCR reaksiyonu, PCR ürünlerinin saflaştırılması ve dizilenmesi (Cycle sequencing) reaksiyonları için BM Laboratuvar Sistemleri firmasından hizmet alımı yapılmıştır. Otomatik DNA dizileyicisi üniversitemizde bulunmamaktadır.

Her türden bir popülasyon seçilmiş, *L. cardiaca*'da morfolojik farklılık gösterdiği düşünüldüğü için iki popülasyon seçilmiştir. Bitki DNA izolasyonu için EurX GeneMATRIX Plant & Fungi DNA izolasyon kiti (Polonya) kullanılmıştır. DNA izolasyonundan sonra elde edilen DNA'ların miktar ve saflığını kontrol etmek için Thermo Scientific Nanodrop 2000 (USA) cihazında spektrofotometrik ölçüm gerçekleştirilmiştir. PCR çalışmasında universal primer olarak ITS1-ITS4 ve ITS2-ITS5 primerleriyle, tür tayini için hedeflenen gen bölgeleri çoğaltılmıştır. İzole edilmiş genomik DNA'ların ITS bölgelerinin çoğaltılmasında kullanılan primer dizileri ve PCR koşulları Tablo 4.3 ve 4.4' te verilmiştir.

Tablo 4.3. Kullanılan primer dizileri

Primer	Nükleotid Dizisi
ITS1	CCGTAGGTGAACCTGCGG
ITS4	TCCTCCGCTTATTGATATGC
ITS2	GCTGCGTTCTTCATCGATGC
ITS5	GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG

Tablo 4.4. PCR'de kullanılan kimyasallar

Bileşen	Stok konsantrasyonu	Reaksiyon konsantrasyonu
PCR Buffer	10X	1X
MgCl ₂	25mM	1.5mM
dNTP mix	20mM	0.2 mM
F. Primer	10 µM	0.3 µM
R. Primer	10 µM	0.3 µM
Taq DNA Polimeraz	5U/ µl	2U
DNA template	3 µl	

4.5.1. PCR koşulları

95°C 5 dakika – başlangıç denatürasyon

- 40 döngü:
 - 95°C 45 saniye - denatürasyon
 - 57°C 45 saniye - bağlanma
 - 72°C 60 saniye – uzama
- 72°C 5 dakika – final uzama
- Sıcaklık 4°C'ye düşürülüp PCR tamamlanmıştır.

PCR ile elde edilen amplifikasyon sonuçları 1XTAE (Tris-Asetat-EDTA) tampon ile hazırlanan %1.5 agaroz jelde 100 volt akımda 90 dakika elektroforezde yürütülmüş ve etidyum bromür boyası kullanılarak UV ışığında görüntüsü alınmıştır. Yaklaşık 700 ve 350 bazlık bölgeyi çoğaltmak için tek aşamalı PCR işlemi gerçekleştirilmiştir. PCR reaksiyonu Solis Biodyne (Estonya) FIREPol® DNA Polymerase Taq polimeraz enzimiyle gerçekleştirilmiştir. Örnekler için PCR sonrasında agaroz jelde tek bant elde edilerek, PCR işleminin başarılı olduğu gözlemlenmiştir. PCR ürünü saflaştırma aşamasında, elde edilen tek bant örnekler için MAGBIO "HighPrep™ PCR Clean-up

System" (AC-60005) saflaştırma kiti kullanılıp, kitin prosedürlerine uyarak saflaştırılmıştır.

4.5.2. Dizileme ve dizi analizi

Sanger Dizileme örnekleri için, Macrogen Hollanda laboratuvarında, ABI 3730XL Sanger dizileme cihazı (Applied Biosystems, Foster City, CA) ve BigDye Terminator v3.1 Cycle Dizileme Kiti kullanılmıştır (Applied Biosystems, Foster City, CA). ITS1-ITS4 ve ITS2-ITS5 primerleriyle elde edilen okumalar, bir konsensus dizi oluşturmak amacıyla kontig haline getirilmiştir. Bu işlemin gerçekleştirilmesinde BioEdit yazılımı içinde CAP contig assembly algoritması kullanılmıştır.

4.5.3. Filogenetik analiz

İlgili sekansa homolog sekansları tanımlamanın en güvenilir yolu, ilgili sekansı bir sorgu olarak kullanarak bir BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) araştırması yapmaktır. BLAST algoritması, nükleotid dizisi veri kümesine karşı gen dizisi verileri için en yakın eşleşmeleri belirlemek için kullanılmıştır. Elde edilen diziler Gen Bankası verileri ile karşılaştırıldıktan sonra Neighbor Joining metodu ile filogenetik ağaçlar oluşturulmuş ve yakın olabilecek olan cinsler belirlenmiştir.

Ayrıca, dizileri elde edilmiş olan *Leonurus* cinsine ait türlerin yakınlıklarını öğrenebilmek için MEGA X (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) programı kullanılarak, sekans analizleri değerlendirilmiş ve filogenetik ağaçlar oluşturulmuştur. Dizilerin hizalanmasında Muscle algoritması, filogenetik ağaç oluşturmada ise karakter temelli yöntemlerden Maximum likelihood metodu (ML) kullanılmıştır.

5. BULGULAR ve TARTIŞMA

5.1. Morfolojik Bulgular

Tez konusunu oluşturan *Leonurus* türlerinin morfolojik özelliklerini belirlemek amacıyla ölçümlerin bir kısmı, bitkinin yetişme ortamında, bir kısmı ise taze örnekler üzerinden araştırma laboratuvarında alınmıştır. Bitkilerin genel görünüşleri, yetiştikleri habitatlarda ayrı ayrı fotoğraflanmıştır. Aynı zamanda bitkilerin herbaryum örnekleri hazırlanmış ve Anadolu Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Herbaryumu'na konmuştur.

5.1.1. *Leonurus* L. (*Cardiaca* Lam., *Chaiturus* Willd.)

Leonurus, küçük tübüler çiçekleri olan Lamiaceae ailesinin üyelerinden biridir. Türlerin yaprakları birbirinden farklı olup, son derece tüylü çiçekleri vardır. Üst yüzleri koyu yeşil olan yapraklar, 3-5 yarıklı loblara sahiptir.

Çok yıllık, tüylü; gövde dik, 4 köşeli, yapraklar uzun saplı, ovat, kordat, orbikulat, linear-lanseolat, 3-5 loplu ya da kaba dişli, kenarları serrat, krenat, taban kuneattır. Yaprak üst yüzeyleri, alt yüzeyden daha koyu renklidir. Brakteler yapraksı, saplı, 3-5 loplu, obovat, ovat, eliptik, lanseolat, brakteoller lineardır. Çiçek durumu vertisillat, çiçekler sapsız, zigomorf, kaliks meyvede hafifçe genişler, kaliks, 5 mızraksı dişli ve spinoz, çan şeklinde, kısa yoğun ya da seyrek tüylü; korolla bilabiat, üst dudak konkav, alt dudak 3 loplu, stamen 4, didinam, ginekeum 1, stigma bifid, stilus ginobazik, ovaryum sessil, tabanda 4 loplu, nutlet kahverengi, obkonik, tepesi yoğun tüylü, yüzeyi pürüzsüzdür.

5.1.1.1. *Leonurus cardiaca* L. Sp. Pl 584 (1753)

L. cardiaca, kare şeklinde içi boş bir gövdeye sahiptir. Gövde 44-245 cm, dört köşeli, belirgin çizgili, köşelerde kısa ve seyrek tüylüdür. Yapraklar oppozit, genellikle uzun saplı (7-49 mm), 3 loplu, lamina 10-77 x 20-88 mm, ovat, kordat, üstü koyu yeşil, altta soluk, alt yüzde çok kısa seyrek yumuşak tüylü, üst yüzde hemen hemen tüysüz ya da seyrek piloz, kenarları serrat, krenat, alt brakteler 3 loplu olup, üstler 3-dentattır. Brakteler saplı; eliptik, linear-lanseolat, 6-42x12-78 mm, alt yüzde çok kısa seyrek tüylü, üst yüzde hemen hemen tüysüz, uç akut, taban kuneat, brakteoller, linear, 1.5-5 mm, akut uçludur. Çok çiçekli, aralıklı ve genellikle tepeye yakın yoğun olup, kaliks 5-8 mm, mızraksı dişli ve spinoz; kaliks tüpü 3-5 mm, hemen hemen tüysüz, korolla açık pembe, 6-11 mm, boğaza yakın yerleri (alt dudak içi) sıklıkla eflatun lekeli, üst dudağın arkası yoğun olarak villoz tüylü, stamenler 4, didinam, anterler kahverengi, 0.8-1 mm. Bifid

stigma, stamenleri aşar. Nutlet 1.5-2.5 mm, obkonik, kahverengi, yüzey pürüzsüz, tepe ve taban trunkat, tepe üçgen ve pilozdur. Çiçeklenme Haziran-Temmuz. Yetiştirme ortamları ormanlık alanlar, köy içleri, duvar dipleri, yarı gölgeli, nemli topraklardır. Bitkilerin genel görünüşlerine ait fotoğraflar Şekil 5.1 ve 5.2’de, herbaryum örneklerine ait fotoğraflar ise Şekil 5.3.’te verilmiştir. Farklı lokalitelerden toplanan *L. cardiaca* örneklerinin morfolojik karakterleri karşılaştırılmalı olarak Tablo 5.1’de verilmiştir.

Flora ve herbaryum kayıtları:

A1 Edirne: Edirne, A. Baytop (ISTE 14042)!

A2 İstanbul: Zekeriyaköy (nr Sarıyer), 17.5.1896, Azn.!

A2 Bursa: Bithynian Olympus (Uludağ), Sestini.

B8 Erzurum: Şenkaya Issızdere köyü güneybatısı, 2200 m. 10.9.1982
(ANK 6862)

A1 Edirne: Tavuk ormanı içi, 13.7.1991 (HUEF 91140)

Türkiye florasındaki kayıtlar ve üniversite herbaryumlarındaki kayıtların incelenmesi sonucu *L. cardiaca*’ya ait örnekler 6 farklı lokaliteden toplanmıştır. Toplanan örneklerin yayılışı Şekil 3.1’de verilmiştir.

Örneklerin toplandığı lokaliteler:

A2 Bursa: İnegöl Süleköy, köy içi 550 m., 40° 2' 21" K 29° 23' 57" D, 22.06.2019
ESSE 15775

A2 Bursa: Sarıpınar Köyü, köy içi 576 m., 40° 1' 59" K 29° 28' 3" D, 22.06.2019
ESSE 15776

A2 Bursa: Turgutalp Köyü, köy içi 725 m., 40° 2' 27" K 29°23' 15" D, 21.07.2019,
ESSE 15777

A2 Kocaeli, Kandıra Arıklar Göleti yakını, 40°57' 48" K 30°14' 1" D, 17.07.2019
ESSE 15778

A1 Edirne, Tavuk Ormanı, orman içi, 41°41' 32" K 26°33' 34" D, 27.07.2019, ESSE
15779

A1 Edirne, Lalapaşa Kalkansöğüt, köy içi, , 41°58' 15" K 26°48' 48" D, 28.07.2019,
ESSE 15800



Şekil 5.1. *L. cardiaca* genel görünüş (çiçeklenme dönemi)



Şekil 5.2. *L. cardiaca* genel görünüş (meyve dönemi)



Şekil 5.3. *L. cardiaca* herbarium örnekleri

Tablo 5.1. Farklı lokalitelerden toplanan *L. cardiaca* örneklerinin morfolojik karakterlerinin karşılaştırılması

Morfolojik karakterler	<i>L. cardiaca</i> Lokalite 1	<i>L. cardiaca</i> Lokalite 2	<i>L. cardiaca</i> Lokalite 3	<i>L. cardiaca</i> Lokalite 4	<i>L. cardiaca</i> Lokalite 5	<i>L. cardiaca</i> Lokalite 6
Bitki Boyu	62-212 cm	52-109 cm	50-160 cm	102-245 cm	50-92 cm	44-120 cm
Gövde	Köşelerde tüylü seyrek	Köşelerde seyrek tüylü	Köşelerde seyrek tüylü	Köşelerde tüylü seyrek	Köşelerde seyrek tüylü	Köşelerde tüylü yoğun
Gövde eni	3-5mm	3-5mm	3-5mm	4-6mm	3-4mm	3-5mm
Gövde yaprak sapı	8-49mm	7-33mm	11-23mm	12-42mm	9-33mm	12-29mm
Gövde yaprak eni	15-60mm	14-56mm	15-40mm	10-63 mm	17-36 mm	14-77 mm
Gövde yaprak boyu	26-80mm	21-60mm	35-64mm	31-75mm	25-57mm	20-88mm
Brakte sapı	9-27mm	8-17 mm	8-14mm	9-30 mm	5-15 mm	5-20 mm
Brakte eni	8-29mm	7-27 mm	7-25mm	9-40 mm	6-28 mm	9-42 mm
Brakte boyu	18-47mm	15-43 mm	13-34mm	12-48 mm	13-37 mm	12-78mm
Kaliks	6-7mm	5-6 mm	5-6 mm	5-8 mm	7-8 mm	5-6 mm
Korolla	8-10mm 4, didinam	7-10 mm 4, didinam	7-9 mm 4, didinam	7-9 mm 4, didinam	7-8 mm 4 didinam	6-11 mm 4 didinam
Stamen	Filamentler yoğun tüylü	Filamentler yoğun tüylü	Filamentler yoğun tüylü	Filamentler yoğun tüylü	Filamentler yoğun tüylü	Filamentler yoğun tüylü
Nutlet	2-2.5 mm, obkonik, kahverengi pürüzsüz tepe kısa tüylü	2 mm, obkonik, kahverengi, pürüzsüz tepe kısa tüylü	2 mm, obkonik, kahverengi, pürüzsüz tepe kısa tüylü	1.5-2.5 mm, obkonik, kahverengi, pürüzsüz tepe kısa tüylü	2 mm, obkonik, kahverengi, pürüzsüz tepe kısa tüylü	2-2.5 mm, obkonik, kahverengi, pürüzsüz tepe kısa tüylü

Lokalite 1: Süleköy; Lokalite 2: Sarıpınar; Lokalite 3: Turgutalp; Lokalite 4: Edirne, Tavuk ormanı; Lokalite 5: Edirne, Lalapaşa; Lokalite 6: Kocaeli

5.1.1.2. *Leonurus glaucescens* Bunge. Ledeb., Fl. Alt. 2:409 (1830)

Gövde morumsu, erekt, 65-120 cm, dörtgen, köşelerde geriye doğru eğik çok kısa tüylü, diğer kısımlar tüysüz gibidir. Yapraklar oppozit, genellikle uzun saplı (15-39 mm), sap çok kısa tüylü, lamina 13-88x 21-76 mm, ovat, oblong eliptik, lanseolat, palmat, üstü koyu yeşil, altta soluk, dağınık çok kısa tüyleri olan, özellikle alt yapraklar derinlemesine 5 loblu dentattan pinnatifide değişir. Brakteler yapraksı, 7-35x10-50 mm, 3 loplu, orta lop diğerlerinden uzun, alttakilerin sapları daha uzundur. Her iki yüz de kısa tüylü olup, üst yüz daha yoğun, brakteoller, 1-4 mm. Çiçek durumu vertisillat, çiçekler bitkinin üst kısmında yaprak aksillerinden çıkar. Kaliks 5-9 mm, kaliks tüpü 3-6 mm, puberuloz tüylerle kaplı ve 5 ayrı damarlıdır. Korolla soluk leylak-koyu pembe rengi, 7-11 mm, üst dudakın arkası ve tüp üzeri yoğun olarak villoz tüylü, üst dudak tek parçalı, alt dudak 3 loplu, stamenler 4, didinam, anterler 0.3-0.4 mm. Bifid stigma, stamenleri aşar. Nutlet sert, 1.5-3 mm, obkonik, kahverengi, yüzey tüysüz, tepe ve taban trunkat, tepe üçgen ve kısa pilozdur. Çiçeklenme Haziran-Temmuz. Yetiştirme ortamları dere ve su kenarı, organik atıklı topraklardır. Bitkilerin genel görünüşlerine ait fotoğraflar Şekil 5.4 ve 5.5'te, herbaryum örneklerine ait fotoğraflar ise Şekil 5.6'da verilmiştir. Farklı lokalitelerden toplanan örneklerle ait morfolojik sonuçlar Tablo 5.2'de verilmiştir.

Flora ve herbaryum kayıtları:

A8 Gümüşhane: Bayburt kale, 1615 m, Balls 1801!

A9 Kars: Çıldır'dan Arpaçay'a 10 km, 2100 m, T. Baytop (ISTE 18148)!

B9 Ağrı: Diyadin ve kaplıcalar arası, 1830 m, Hewitt 289!

B10 Ağrı: Ağrı Dağı Serdar Bulak, 2300 m, D. 46940!

B8 Erzurum: Tekman, Katranlı köyü, bahçe içi, 27.7.1991

B8 Erzurum: Şenkaya, Gülveren köyü, 2500 m, 09.09.1993 GAZI

A9 Kars: Sarıkamış, sağlık ocağının 20 m altı, 01.08.1991 HUEF 91128

A9 Kars: Çıldır Gölü-Kısır Dağı arası, kayalık 2100 m, 27.7.1986, AEF 2673

A9 Kars: Arpaçay, Kısır Dağı arası, dağ köyü üstü, kayalık, taşlı yamaç 2250m, 26.7.2000 GAZI

A9 Kars: Çıldır, Doğruyol köyü, yol kenarı, 23.7.1991, HUEF 91089

A9 Kars: Posof ilçe içi, yol kenarı, 25.7.1991, HUEF 91094

Türkiye Florası'ndaki kayıtlar ve üniversite herbaryumlarındaki kayıtların incelenmesi sonucu *L. glaucescens*'e ait örnekler 3 farklı lokaliteden toplanmıştır. Toplanan örneklerin yayılışı Şekil 3.1'de verilmiştir.

Örneklerin toplandığı lokaliteler:

B8 Erzurum, 39° 44' 35" K 41° 23' 16" D, 2080 m, 23.07.2019, ESSE 15783

B8 Erzurum, 39° 41' 41" K 41° 29' 6" D, 1950 m, 23.07.2019, ESSE 15784

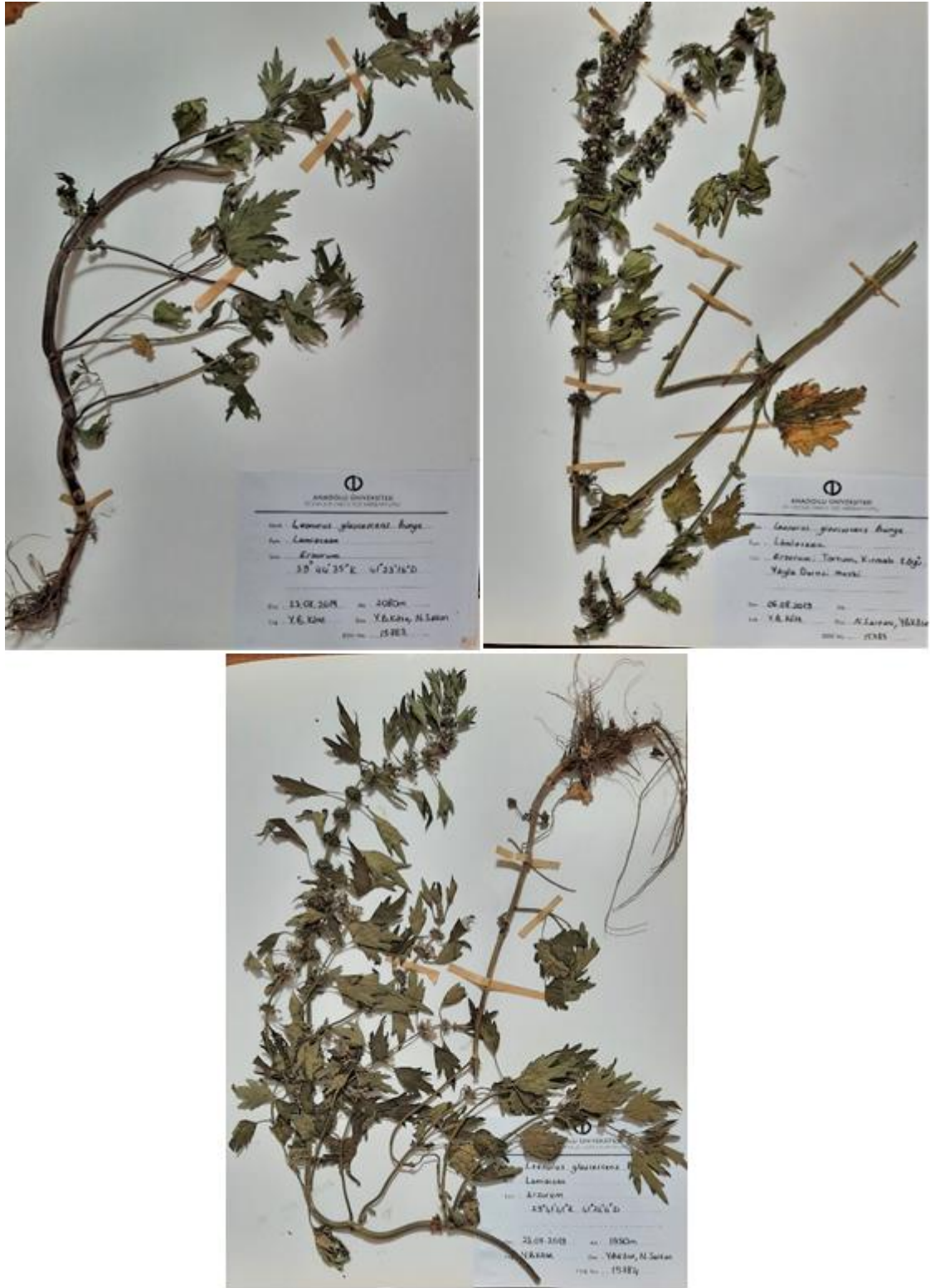
B8 Erzurum, Tortum Kırmalı Köyü, Yayla deresi mevki, 06.08.2019, ESSE 15785



Şekil 5.4. *L. glaucescens* genel görünüş



Şekil 5.5. *L. glaucescens* genel görünüş (yakın görünüm)



Şekil 5.6. *L. glaucescens* herbarium örnekleri

Tablo 5.2. Farklı lokalitelerden toplanan *L. glaucescens* örneklerinin morfolojik karakterlerinin karşılaştırılması

Morfolojik karakterler	<i>L. glaucescens</i> Lokalite 1	<i>L. glaucescens</i> Lokalite 2	<i>L. glaucescens</i> Lokalite 3
Bitki Boyu	65-115 cm	67-120 cm	70-100 cm
Gövde	Köşelerde tüylü morumsu	Köşelerde tüylü morumsu	Köşelerde tüylü morumsu
Gövde eni	4-7 mm	3-5 mm	5-6 mm
Gövde yaprak sapı	15-39 mm	17-37 mm	16-38 mm
Gövde yaprak eni	15-88 mm	14-78mm	13-67 mm
Gövde yaprak boyu	21-75 mm	23-76 mm	30-69 mm
Brakte sapı	7-24 mm	5-20 mm	6-22 mm
Brakte eni	7-30 mm	10-35 mm	7-30 mm
Brakte boyu	13-47 mm	14-48 mm	10-50 mm
Brakteol	1-2 mm	1.5-3 mm	2-4 mm
Kaliks	5-8 mm	6-9 mm	6-9 mm
Kaliks tüpü	3-4 mm	3-4 mm	4-6 mm
Korolla	8-11 mm	7-9 mm	7-9 mm
Stamen	4, didinam Filamentler yoğun tüylü	4, didinam Filamentler yoğun tüylü	4, didinam Filamentler yoğun tüylü
Nutlet	2-2.5 mm, obkonik, kahverengi	1.5-3 mm, obkonik, kahverengi	2-3 mm, obkonik, kahverengi

Lokalite 1: Erzurum, 2080 m.; Lokalite 2: Erzurum, 1950 m.; Lokalite 3: Erzurum, Tortum Kırmalı Köyü

5.1.1.3. *Leonurus quinquelobatus* Gilib. Pl. Rar. et Comm. Lithuan. 15 (1785)

Gövde 50-181 cm, dörtgen, köşelerde daha yoğun olmak üzere tüm yüzey dışa doğru eğik, uzun tüylerle kaplıdır. Yapraklar 3-5 loplü, genellikle uzun saplı (9-52 mm), sap çok kısa tüylü, lamina 17-104x 22-111 mm, ovat, oblong eliptik, kordat, eliptik, kenarlar serrat, krenat, üstü koyu yeşil, altta soluk, palmat, dağınık çok kısa tüyleri olan, özellikle alt yapraklar derinlemesine 5 loblu dentattan pinnatifide değişir. Brakteeler yapraksı, 7-46x10-57 mm, 3 loblu orta lop diğerlerinden uzun, her iki yüz de puberuloz, brakteoller, linear, 1-3 mm, akut uçludur. Çok çiçekli, aralıklı veya genellikle tepeye yakın yoğun olup, kaliks 5-9 mm, kaliks tüpü 3-5 mm, yoğun şekilde villoz tüylerle kaplı ve 5 ayrı damarlıdır. Korolla lila rengi, 7-11 mm, üst dudağın arkası ve tüp üzeri yoğun olarak villoz tüylü, boğaza yakın yerleri sıklıkla mor-kahverengi lekelidir. Stamenler 4, didinam, anterler kahverengi, 0.8-1 mm. Bifid stigma, stamenleri aşar. Nutlet 2-3 mm, 3

köşeli, obkonik, kahverengi, yüzey pürüzsüz, tepe ve taban trunkat, tepe yoğun vilozdur. Çiçeklenme Haziran-Temmuz. Yetiştirme ortamları tarla kenarları, köy içleri, duvar dipleri, güneşli-yarı gölgeli, nemli topraklardır. Bitkilerin genel görünüşlerine ait fotoğraflar Şekil 5.7’de, herbaryum örneklerine ait fotoğraflar ise Şekil 5.8’de verilmiştir. Her iki lokaliteden toplanan örneklerin morfolojik özellikleri Tablo 5.3’te verilmiştir.

Flora ve herbaryum kayıtları:

Type: [Lithuania] inter Grodnam militae, Gilibert.

A2 Bursa: Olympos Bythinon (Ulu Dağı), 1846, No 506!

A3 Bolu: Abant G., 17.09.1940, B. Post!

A7 Giresun: Tamdere’den Yavuzkemalettin, Karınca, D. 20679!

A8 Çoruh: nr Artvin, 7.7.1910, Diratzouyan.

A9 Çoruh: Ardanuç, c. 812 m, C. Koch. Erzurum: nr Horasan (Grossheim 7: map 407). Kars: Başgedikler’in doğusu, Sovyet sınırı (Grossheim 7: map 407).

B9 Kars: Iğdır’ın doğusu (Grossheim 7: map 407). Van: 22 km W.S.W. Gevaş, 2100 m

A3 Bolu: Abant, 19.7.1992, HUEF 92095

Türkiye Florası’ndaki kayıtlar ve üniversite herbaryumlarındaki kayıtların incelenmesi sonucu *L. quinquelobatus*’a ait örnekler 2 farklı lokaliteden toplanmıştır. Toplanan örneklerin yayılışı Şekil 3.1’de verilmiştir.

Örneklerin toplandığı lokaliteler:

A2 Kocaeli, Çilekli köyü, köy içi, 40°32' 22" K 30°2' 49" D, 17.7.2019, ESSE 15781

A3 Bolu, Karacasu Köyü, köy içi, 526 m., 40°35' 32" K 31°0' 42" D, ESSE 15780



Şekil 5.7. *L. quinquelobatus* genel görünüş



Şekil 5.8. *L. quinquelobatus* herbarium örnekleri

Tablo 5.3. Farklı lokalitelerden toplanan *L. quinquelobatus* örneklerinin morfolojik karakterlerinin karşılaştırılması

Morfolojik karakterler	<i>L. quinquelobatus</i>	<i>L. quinquelobatus</i>
	Lokalite 1	Lokalite 2
Bitki Boyu	145-181 cm	50-155cm
Gövde	Köşelerde tüylü morumsu	Köşelerde tüylü morumsu
Gövde yaprak sapı	12-52 mm	9-34mm
Gövde yaprak eni	19-104 mm	17-63mm
Gövde yaprak boyu	28-111mm	22-82mm
Brakte sapı	9-24mm	7-21mm
Brakte eni	9-46 mm	7-31mm
Brakte boyu	15-57mm	10-47 mm
Brakteol	1.5-2.5mm	1-3mm
Kaliks	6-9 mm	5-8 mm
Korolla	7-11mm	8-9mm
Stamen	4, didinam Filamentler yoğun tüylü	4, didinam Filamentler yoğun tüylü
Nutlet	2-3 mm, obkonik, kahverengi	2-3 mm, obkonik, kahverengi

Lokalite 1: Bolu; Lokalite 2: Kocaeli

5.1.1.4. *Leonurus persicus* Boiss. Diagn. ser. 1(5) :27 (1844)

Gövde 50-75 cm, dik, dört köşeli, belirgin çizgili olup, yoğun şekilde çok kısa tüylerle kaplıdır. Sığ lifli kök. Yapraklar genellikle uzun saplı (11-55mm), küçük, 3-5 loplu olup dentattan pinnatifide değişir. Lamina 12-34x 16-56 mm, ovat, üstü koyu yeşil, altta soluk, palmat ve her iki yüzeyleri çok kısa tüylü olup, brakteler yapraksı, derinlemesine 3 loplu olup, 10-30x10-45 mm, sap 9-19 mm. Üst yüz daha yoğun olmak üzere her iki yüz de kısa tüylü, brakteoller, 2-3.5 mm. Çiçekler bitkinin üst kısmında yaprak aksillerinden çıkar, yoğun. Kaliks 6-8 mm, çan şeklinde, kaliks tüpü 4-6 mm, yoğun şekilde puberuloz tüylerle kaplı ve 5 ayrı damarlıdır. Korolla krem rengi, 9-11 mm, üst dudağın arkası ve tüp üzeri yoğun olarak villoz tüylü, sapsız, boğaza yakın yerleri sıklıkla koyu pembe-kahverengi lekelidir. Stamenler 4, didinam, anterler 0.3-0.5 mm. Bifid stigma, stamenleri aşar. Nutlet 1.5-3 mm, 3 köşeli, obkonik, kahverengi, yüzey tüysüz, tepe ve taban trunkat, tepe kısa pilozdur. Çiçeklenme Haziran-Temmuz. Yetiştirme ortamları su kenarı ve taşlık alanlardır. Bitkinin genel görünüşüne ait fotoğraflar Şekil 5.9'da, herbaryum örneği fotoğrafı ise Şekil 5.10'da verilmiştir.

Flora ve herbaryum kayıtları:

Type: [N. Iran] in alpibus Elamout Persiae borealis, Aucher 5113 (holo. G, iso. K!).

B8 Erzurum: Karayazi S. Çakmak Dağı 5 km batı, Jenkins 2399!

B8 Erzurum: Tekman'a 8 km kala, yol kenarındaki yarın içi, 05.8.1992, HUEF 92111

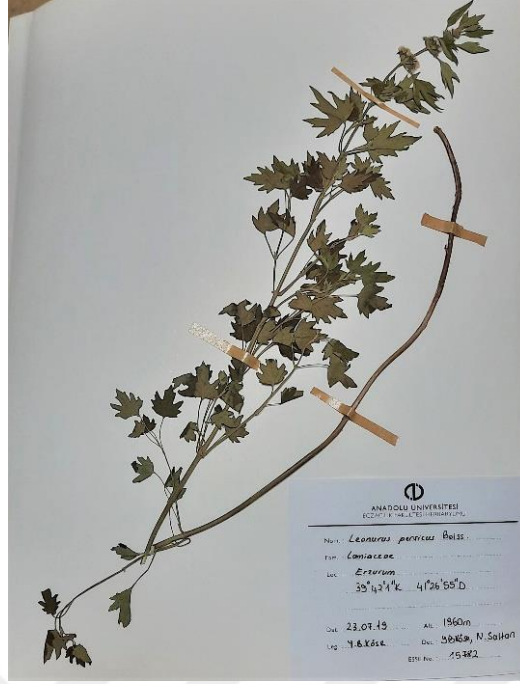
Türkiye Florası'ndaki kayıtlar ve üniversite herbaryumlarındaki kayıtların incelenmesi sonucu *L. persicus*'a ait örnekler Erzurum'dan toplanmıştır. Toplanan örneklerin yayılışı Şekil 3.1'de verilmiştir.

Örneklerin toplandığı lokalite;

B8 Erzurum, 39° 42' 1"K 41° 26' 55"D, 1960 m, 23.07.2019. ESSE 15782



Şekil 5.9. *L. persicus* genel görünüş



Şekil 5.10. *L. persicus* herbarium örneği

5.1.2. Taramalı elektron mikroskop (SEM) ile yapılan mikromorfolojik çalışmalara ilişkin bulgular

Makromorfolojik özellikler, türlerin tanımlanması için gerekli ancak bazı türler için yetersiz bir kriter olabilir. Bitkinin morfolojik özelliklerini daha ayrıntılı inceleyip, makromorfolojik verileri desteklemek amacıyla, türlerin karakteristik mikromorfolojik özelliklerinin araştırılması önemlidir. Bu çalışmada amaç, SEM kullanılarak *Leonurus* türlerinin, gövde, kaliks ve nutlet mikromorfolojisine ait özellikleri belirlemek ve bu özelliklerin sistematik önemini, cinsin taksonları arasındaki varyasyon ışığında değerlendirmektir.

Türkiye Florası'ndaki teşhis anahtarında türlerin ayrımında kullanılan karakterlerden birisi olan gövde tüylenmesi incelemelerine göre, *L. cardiaca* ve *L. glaucescens*'te gövdede yalnızca köşelerde gözlenen tüyler, oldukça seyrek. *L. quinquelobatus*'ta gövdenin tüm yüzeyi uzun tüylerle kaplı iken, *L. persicus*'ta gövdenin tüm yüzeyinde kısa tüyler yoğun şekilde bulunmaktadır.

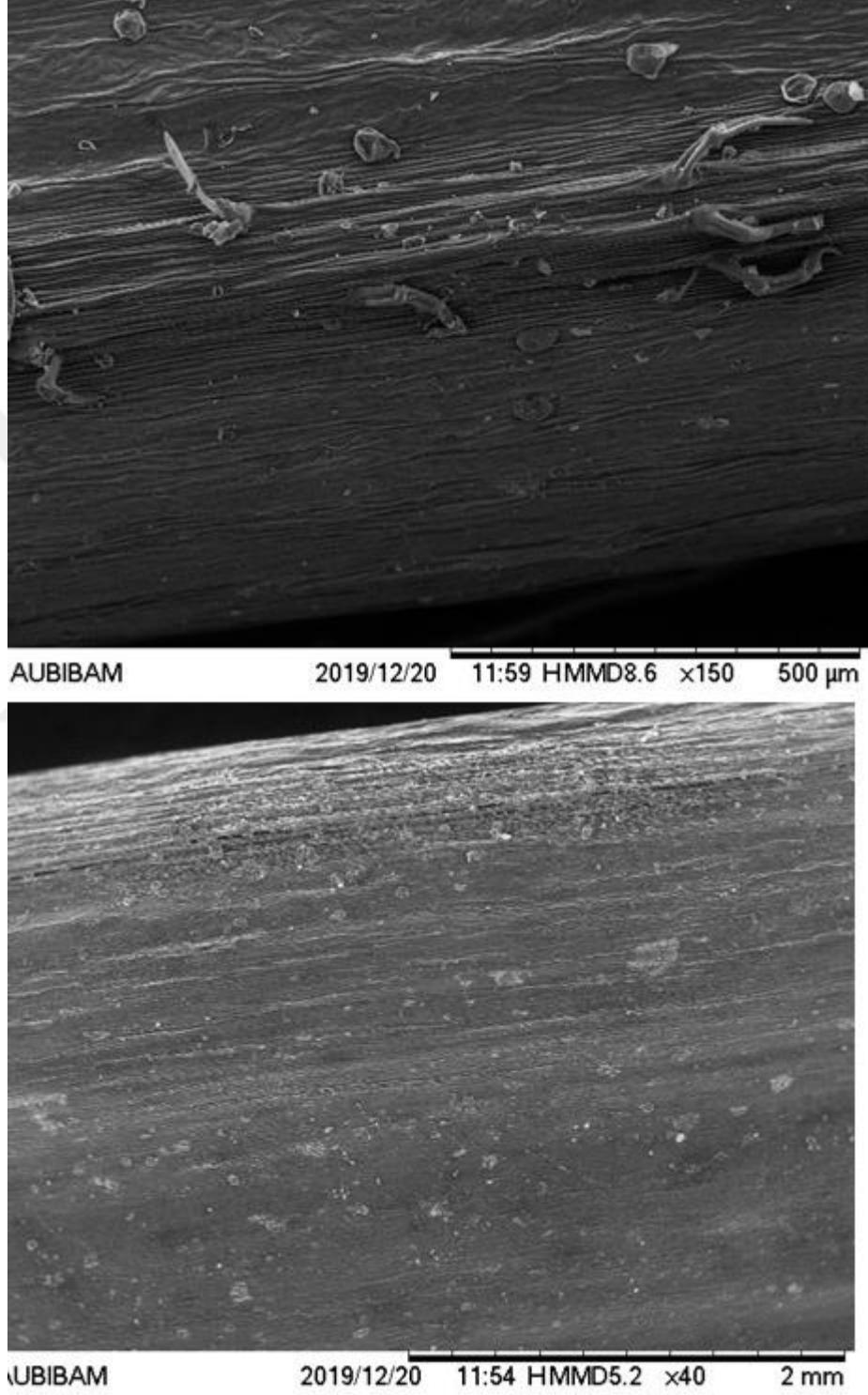
L. cardiaca'da kaliks yüzeyi kısa ve seyrek tüylü iken, *L. glaucescens*'te kaliks yüzeyinde kısa tüylerin yaygın dağılımı gözlenmektedir. *L. quinquelobatus*'ta kaliks yüzeyi uzun tüylerle yoğun şekilde kaplı iken, *L. persicus*'ta kısa tüylerin tüm kaliks yüzeyini kapladığı gözlenmektedir.

Nutlet yüzeyi tüm türlerde pürüzsüzdür ve tepe kısımları tüylüdür. *L. cardiaca* 'da nutletin tepe kısmındaki tüyler, *L. glaucescens* 'e kıyasla daha uzun olup, nutlet tepesindeki en uzun tüyler, *L. quinquelobatus* 'ta gözlenmiştir. Veriler, makromorfolojik ölçümleri ve karakterleri desteklemektedir.



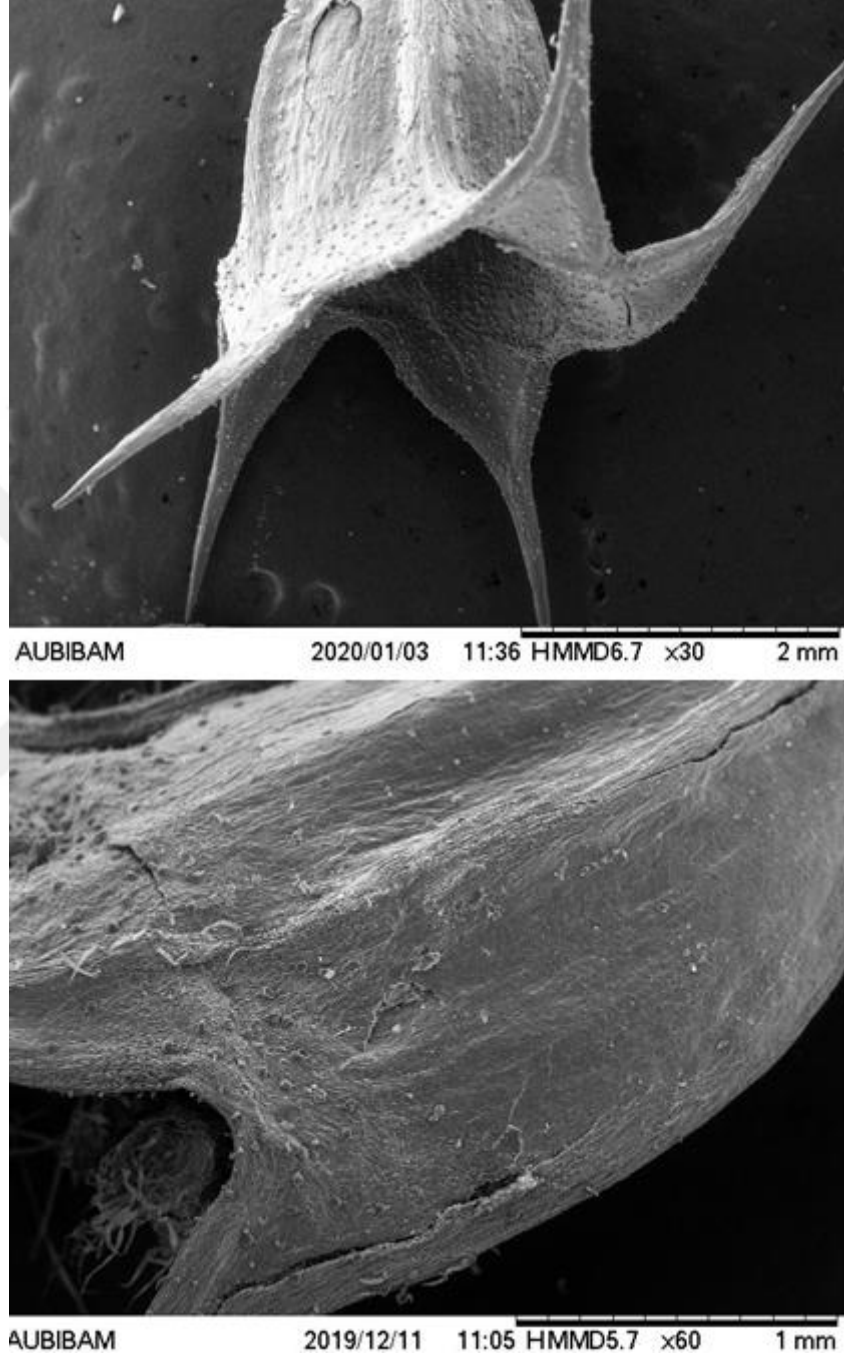
5.1.2.1. *L. cardiaca* ile yapılan SEM çalışmaları

Gövde dört köşeli, belirgin çizgili, köşelerde kısa ve seyrek tüylüdür (Şekil 5.11).



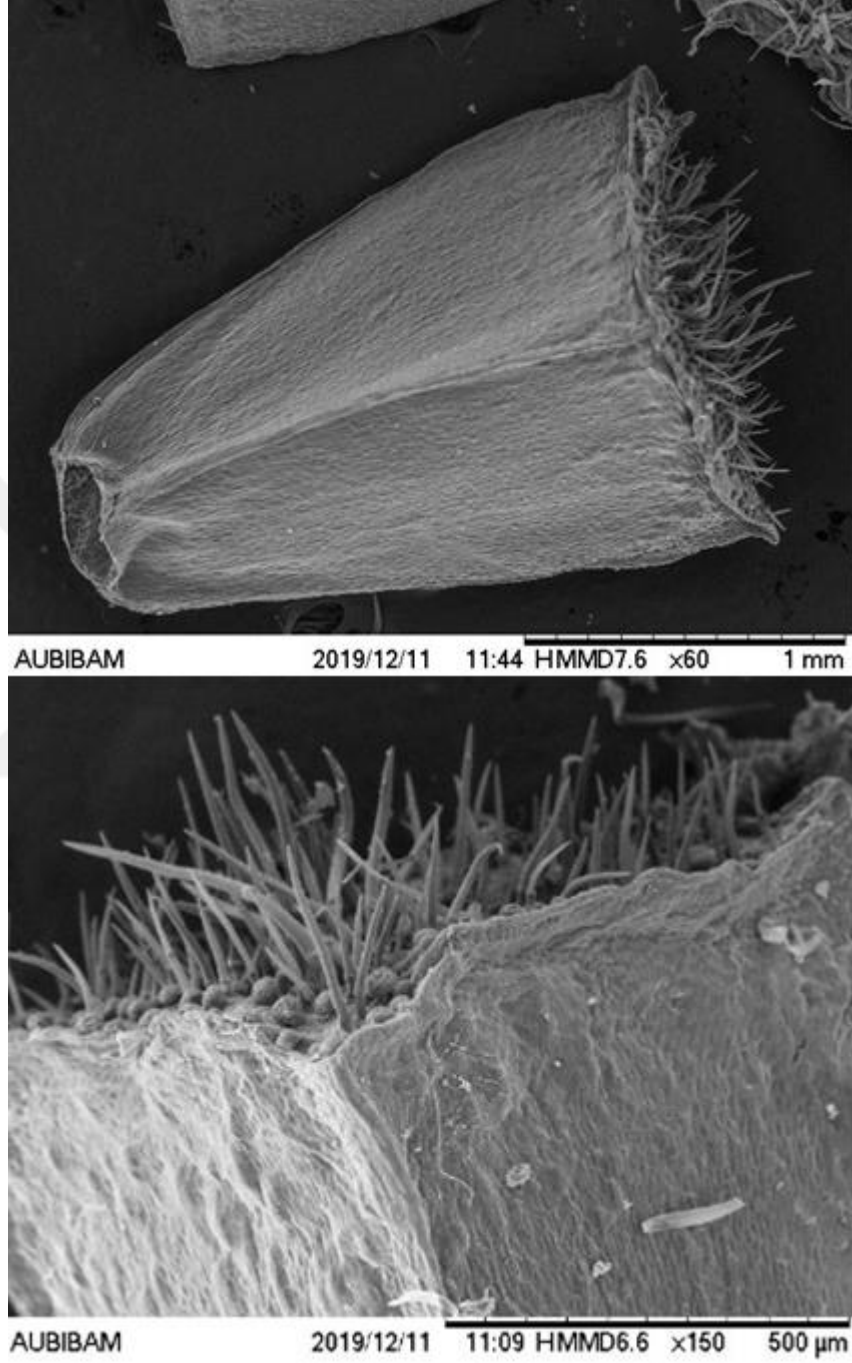
Şekil 5.11. *L. cardiaca* gövde yüzeyi SEM görüntüsü

Kaliks 5-8 mm, mızraksı dişli ve spinöz; kaliks tüpü 3-5 mm, hemen hemen tüysüzdür (Şekil 5.12).



Şekil 5.12. *L. cardiaca* kaliks SEM görüntüsü

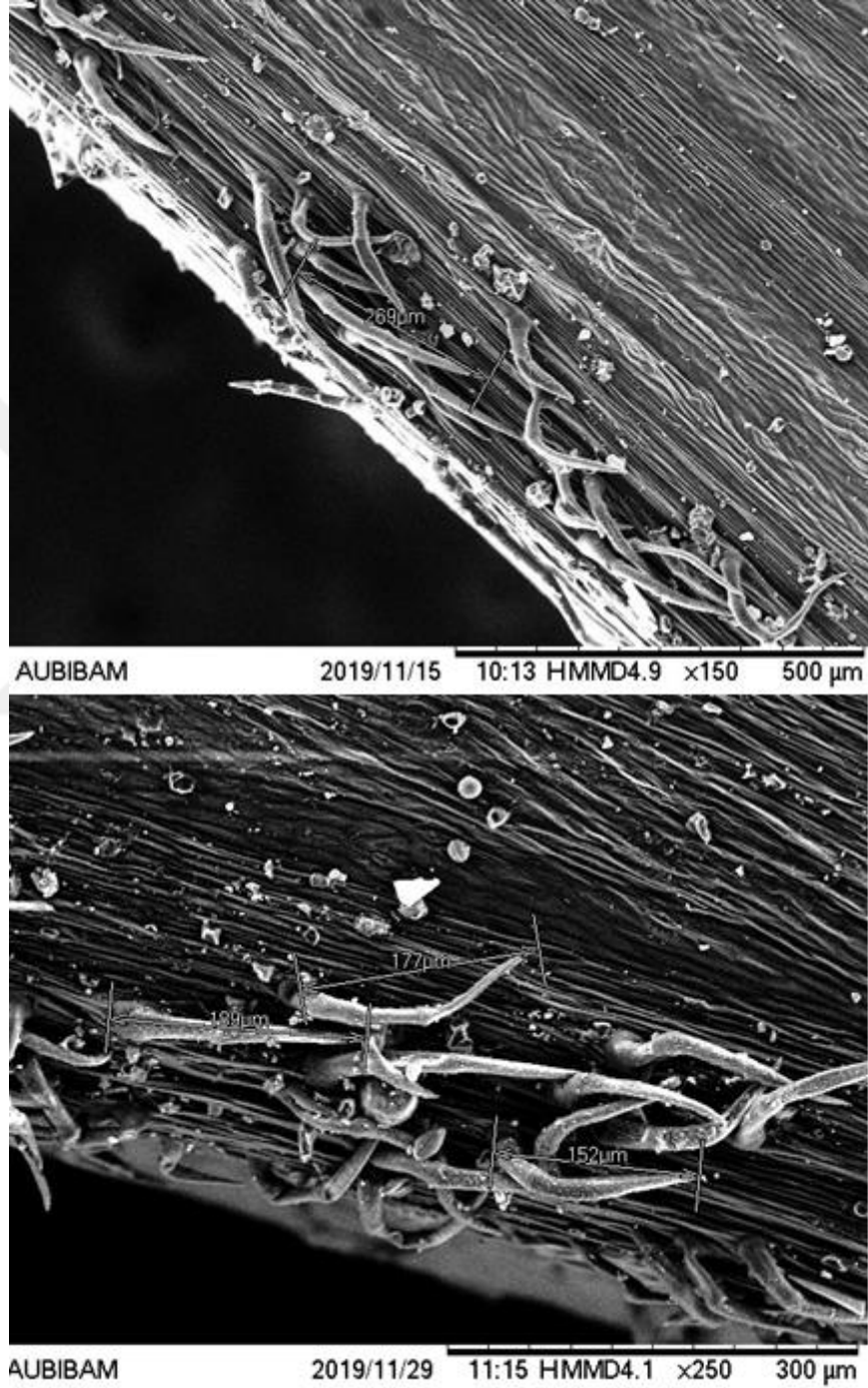
Nutlet 1.5-2.5 mm, obkonik, kahverengi, yüzey pürüzsüz, tepe ve taban trunkat, tepe üçgen ve pilozdur (Şekil 5.13).



Şekil 5.13. *L. cardiaca* nutlet SEM görüntüsü

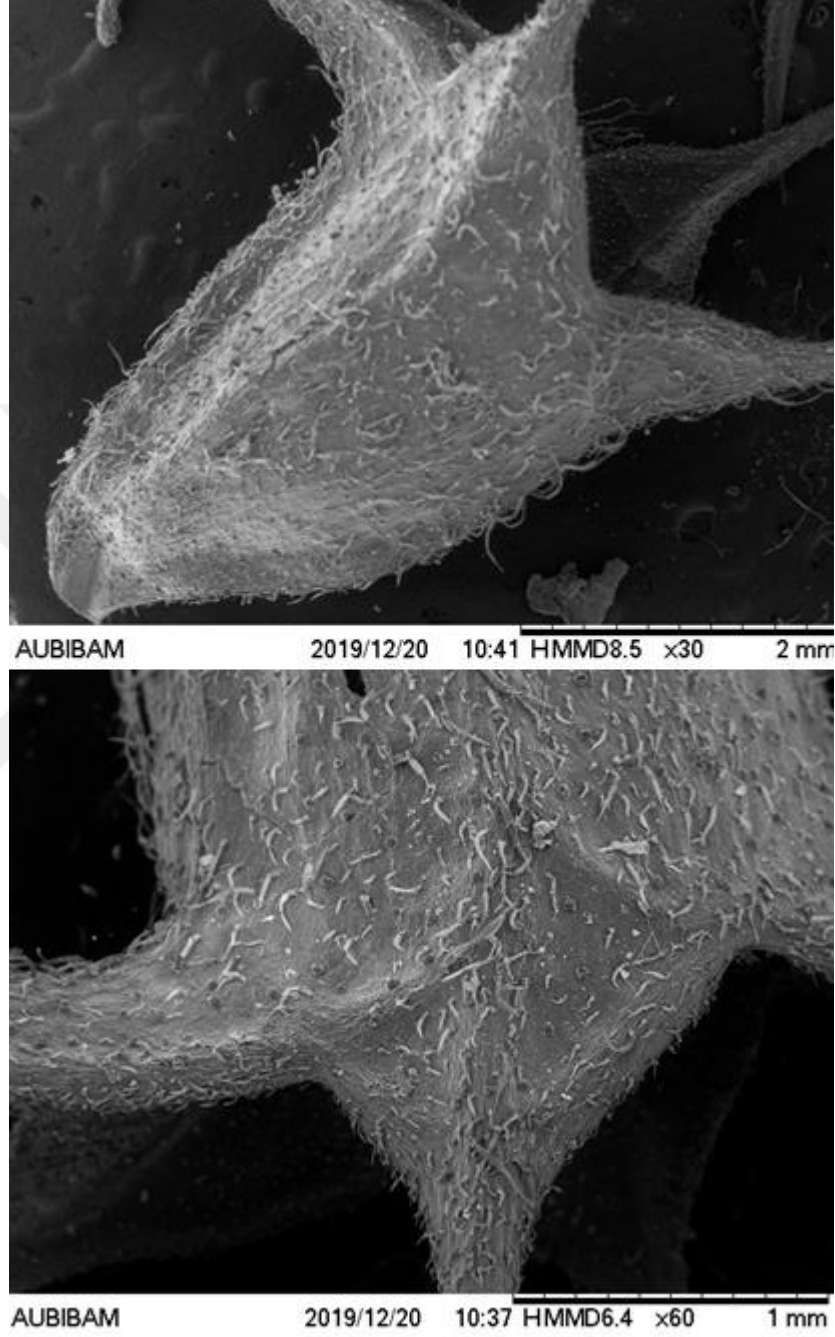
5.1.2.2. *L. glaucescens* ile yapılan SEM çalışmaları

Gövde dörtgen, köşelerde geriye doğru eğik yoğun çok kısa tüylü, diğer kısımlar tüysüzdür (Şekil 5.14).



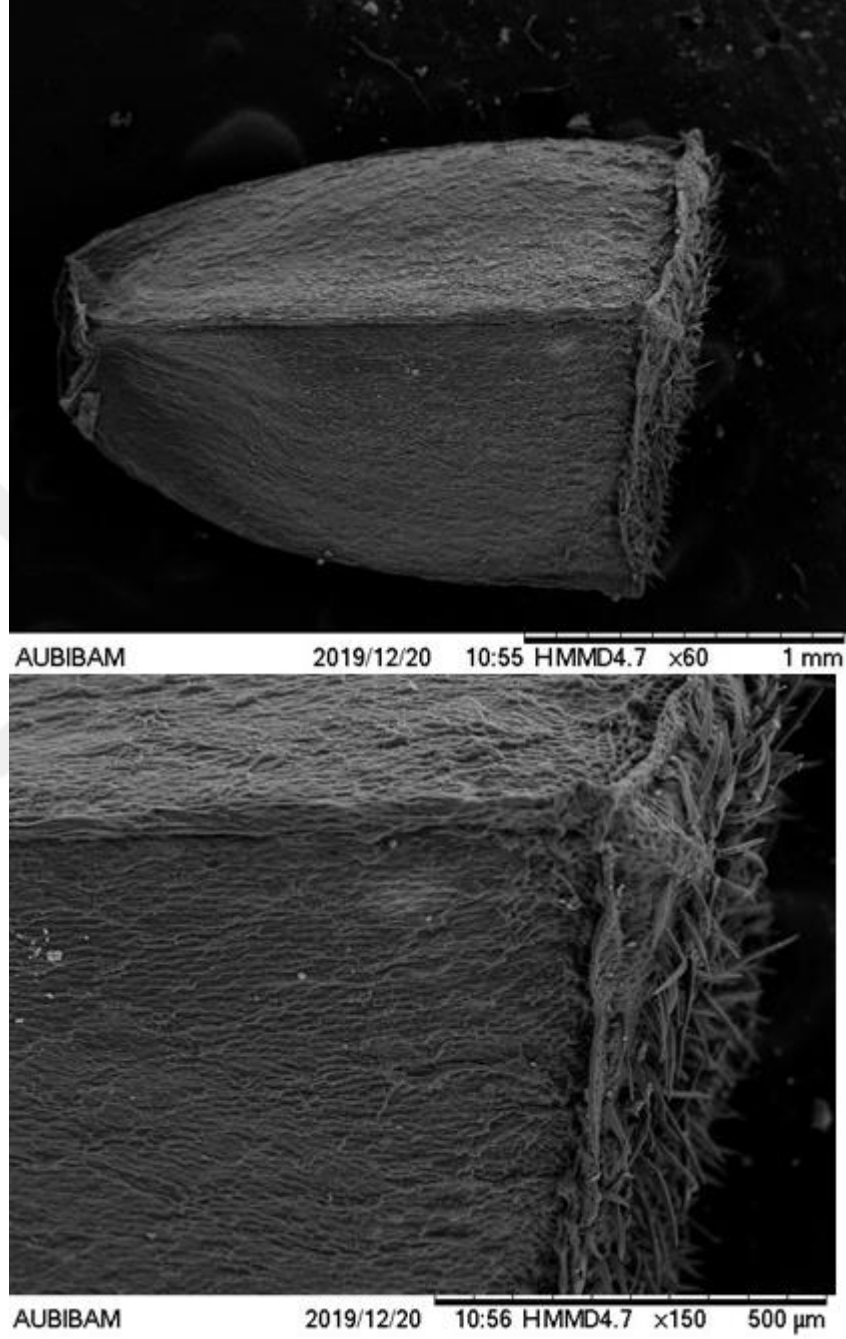
Şekil 5.14. *L. glaucescens* gövde yüzeyi SEM görüntüsü

Kaliks 6-9 mm, kaliks tüpü 3-6 mm, yoğun şekilde puberuloz tüylerle kaplı ve 5 ayrı damarlıdır (Şekil 5.15).



Şekil 5.15. *L. glaucescens* kaliks SEM görüntüsü

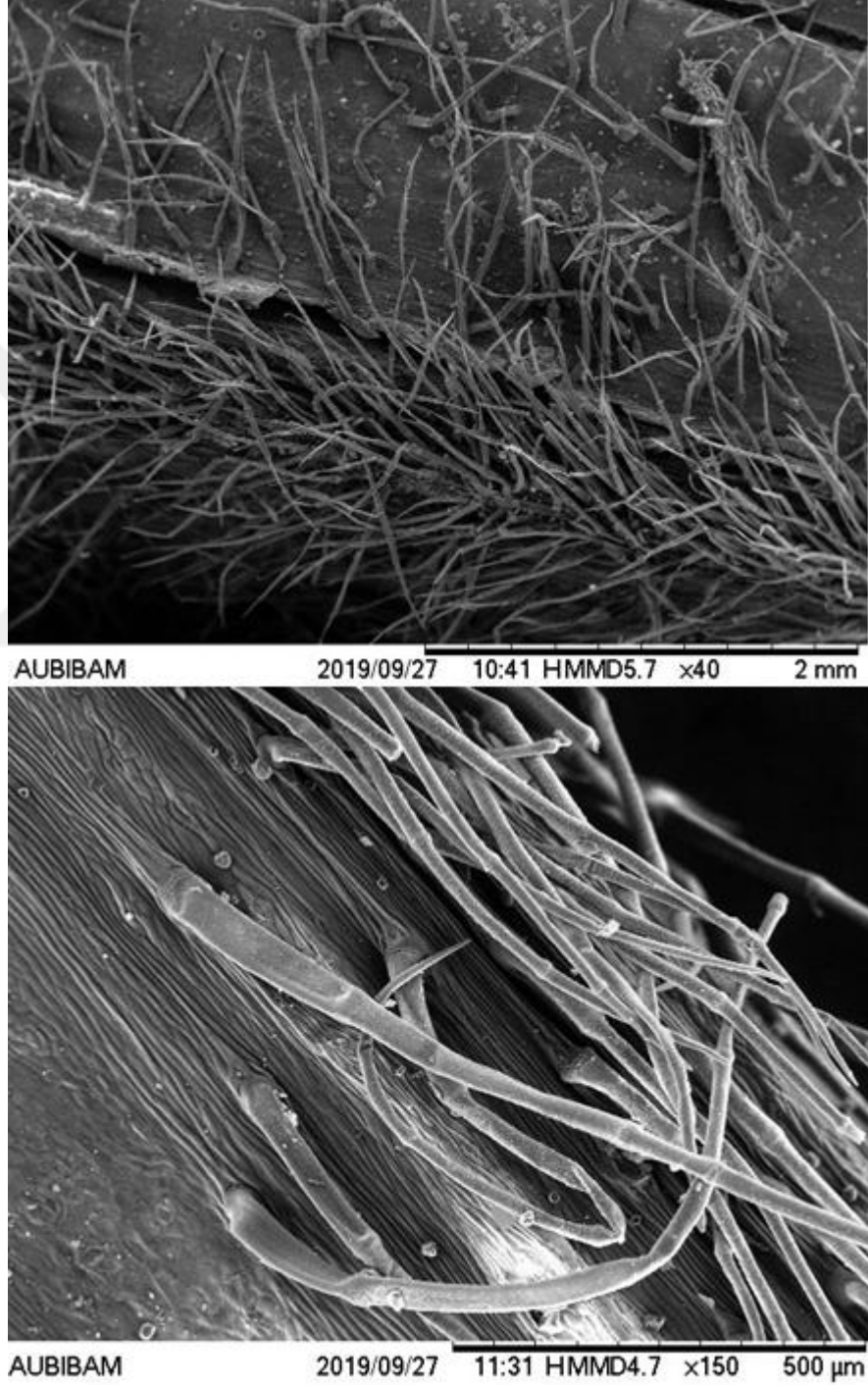
Nutlet 1.5-3 mm, obkonik, kahverengi, yüzey tüysüz, tepe ve taban trunquat, tepe üçgen ve kısa pilozdur (Şekil 5.16).



Şekil 5.16. *L. glaucescens* nutlet SEM görüntüsü

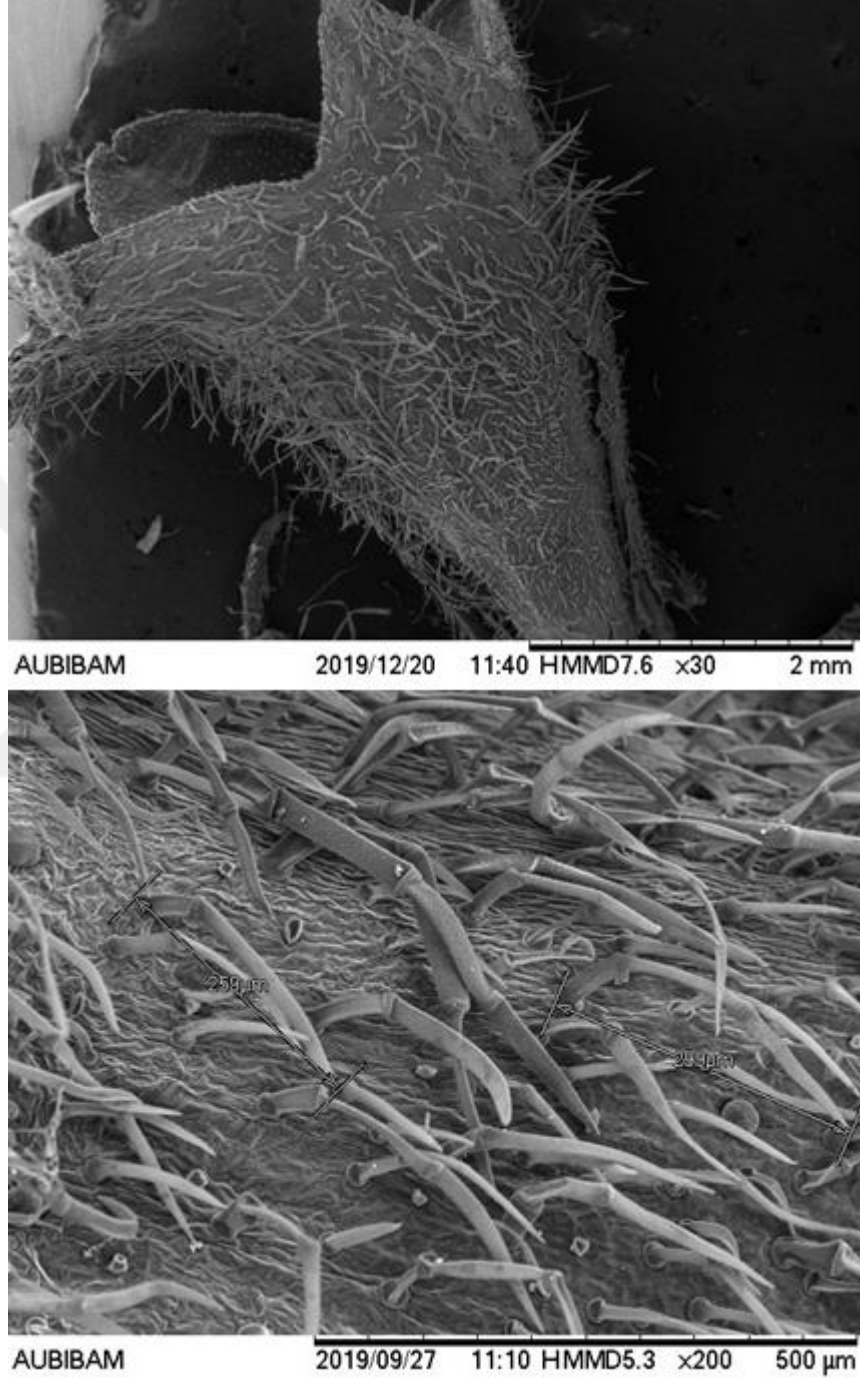
5.1.2.3. *L. quinquelobatus* ile yapılan SEM çalışmaları

Gövde dörtgen olup, köşelerde daha yoğun olmak üzere tüm yüzey yoğun dışa doğru eğik tüylerle kaplıdır. 1-1.5 mm olan basit örtü tüyleri köşelerde daha yoğundur. Tüylerin dış yüzeylerinde kütikula çıkıntıları bulunur (Şekil 5.17).



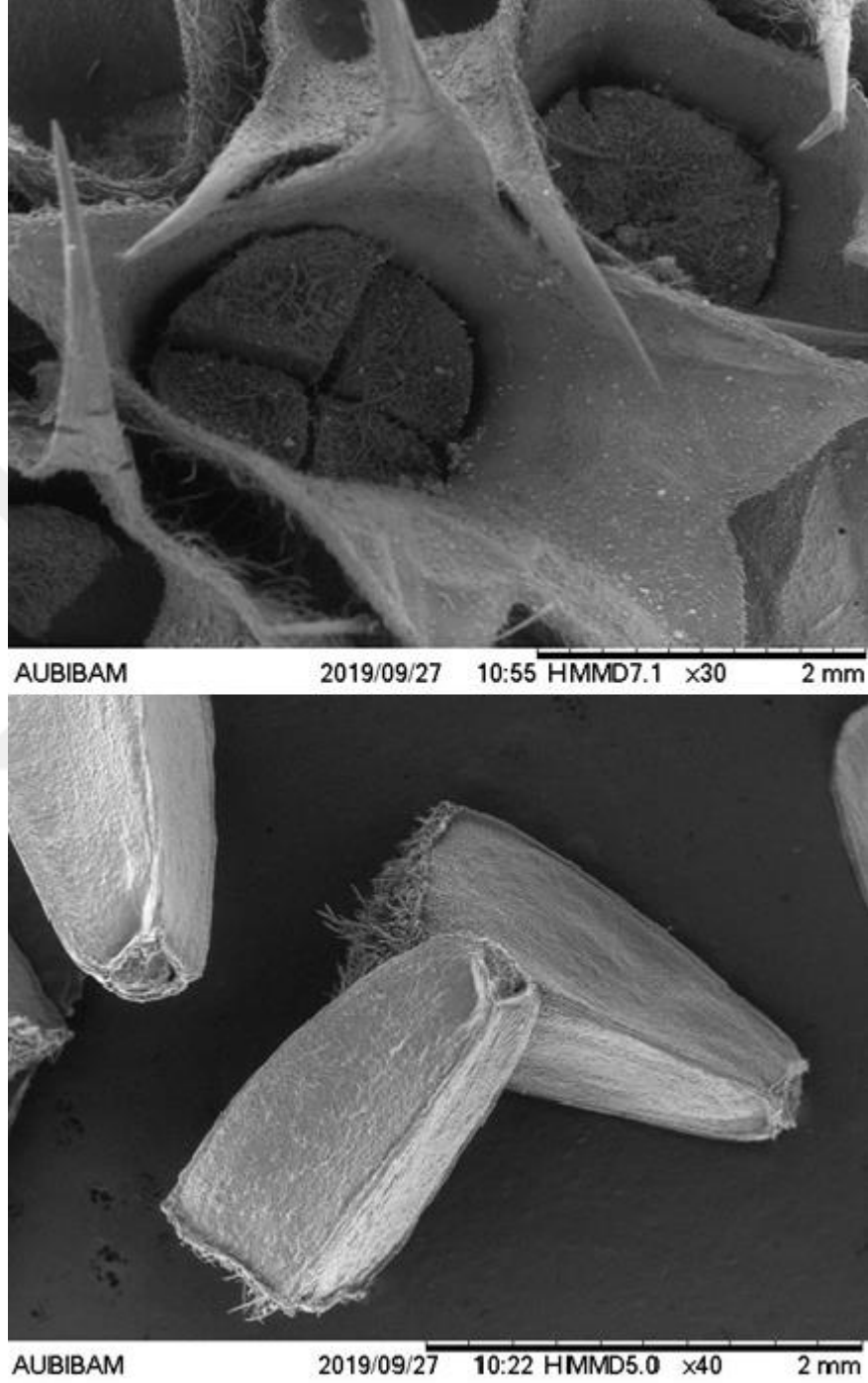
Şekil 5.17. *L. quinquelobatus* gövde yüzeyi SEM görüntüsü

Kaliks 6-9 mm, kaliks tüpü 3-5 mm, yoğun şekilde puberuloz tüylerle kaplı ve 5 ayrı damarlıdır (Şekil 5.18).

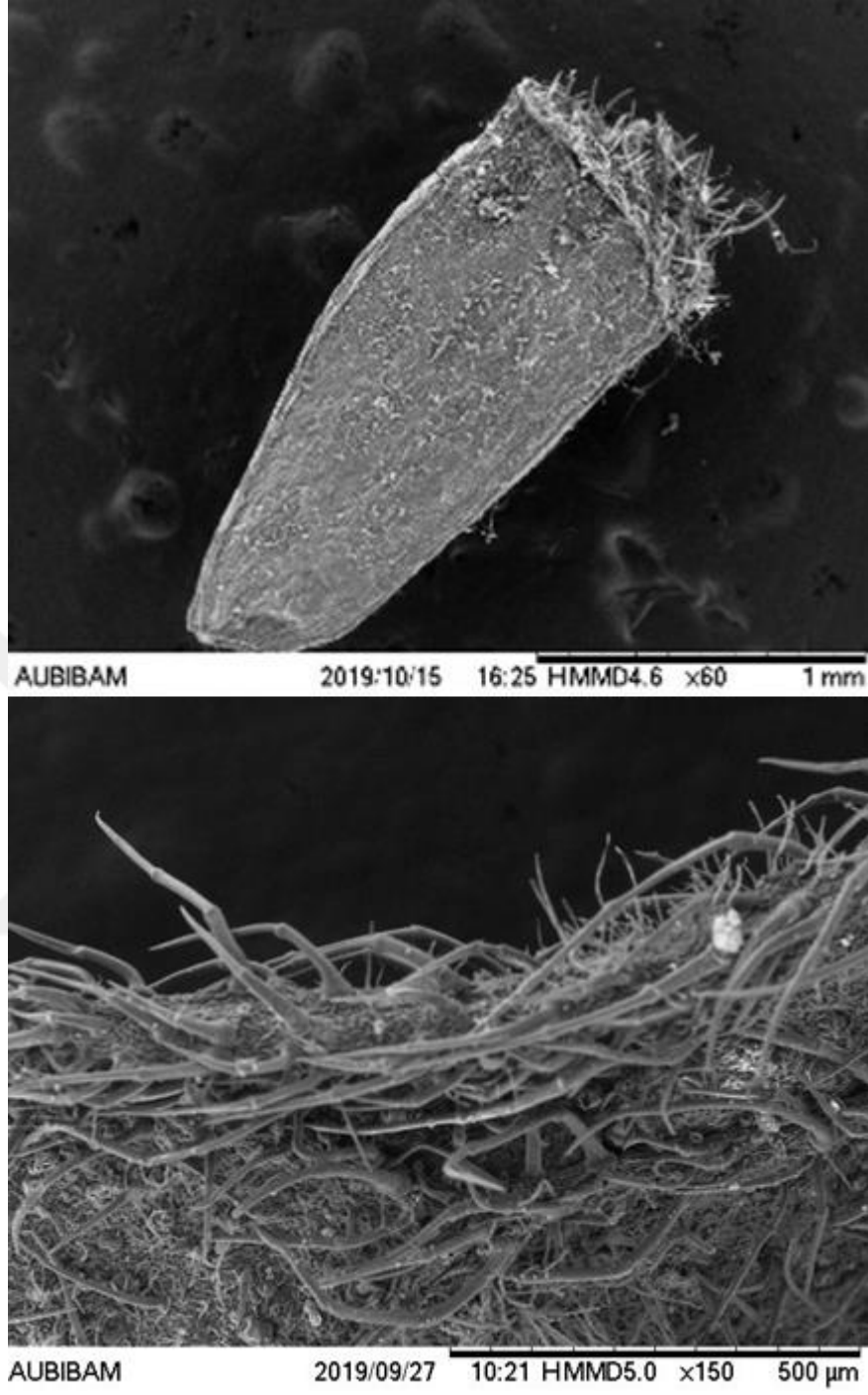


Şekil 5.18. *L. quinquelobatus* kaliks SEM görüntüsü

Nutlet 2-3 mm, obkonik, kahverengi, yüzey pürüzsüz, tepe ve taban trunquat, tepe villozdur (Şekil 5.19-5.20).



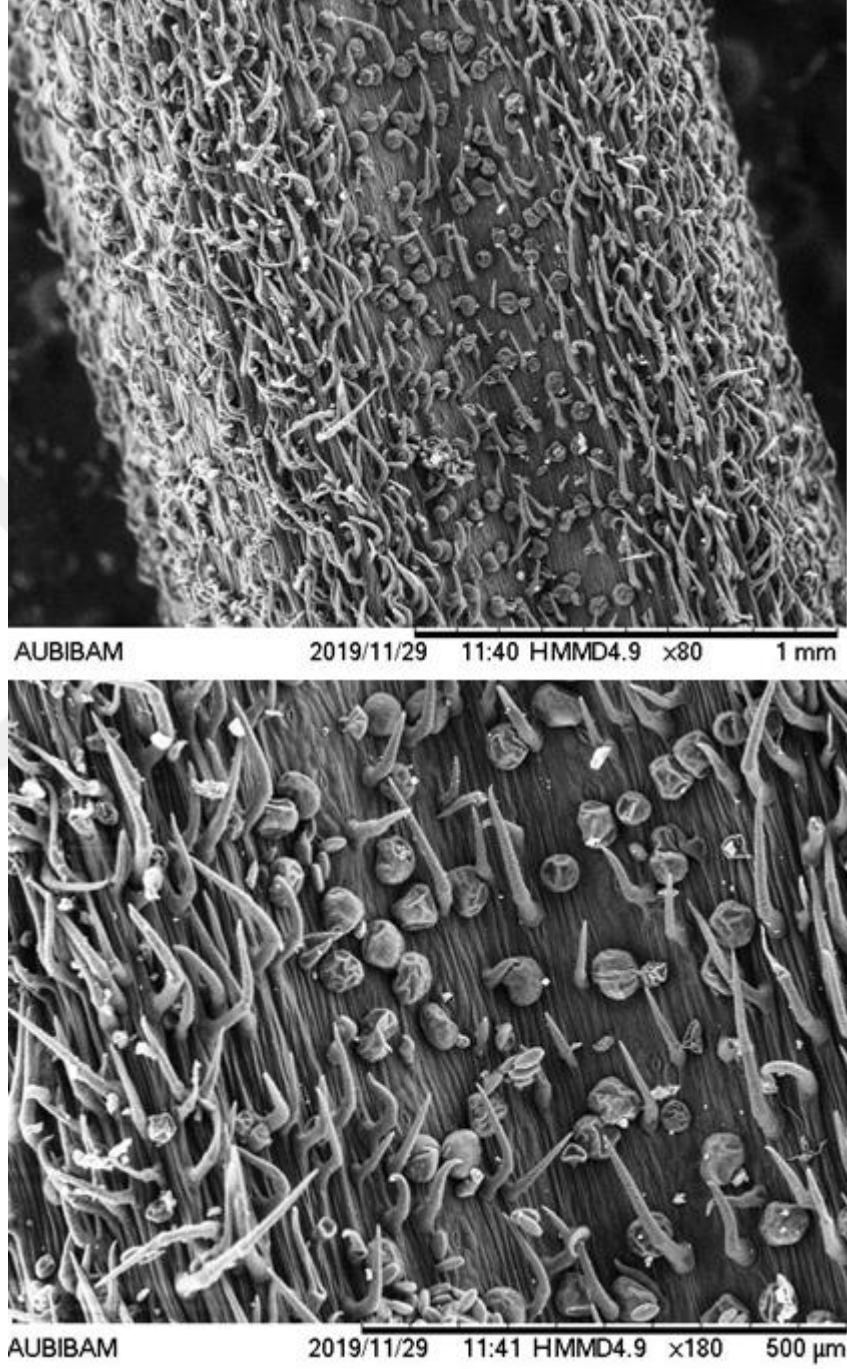
Şekil 5.19. *L. quinquelobatus* nutlet SEM görüntüsü (a)



Şekil 5.20. *L. quinquelobatus* nutlet SEM görüntüsü (b)

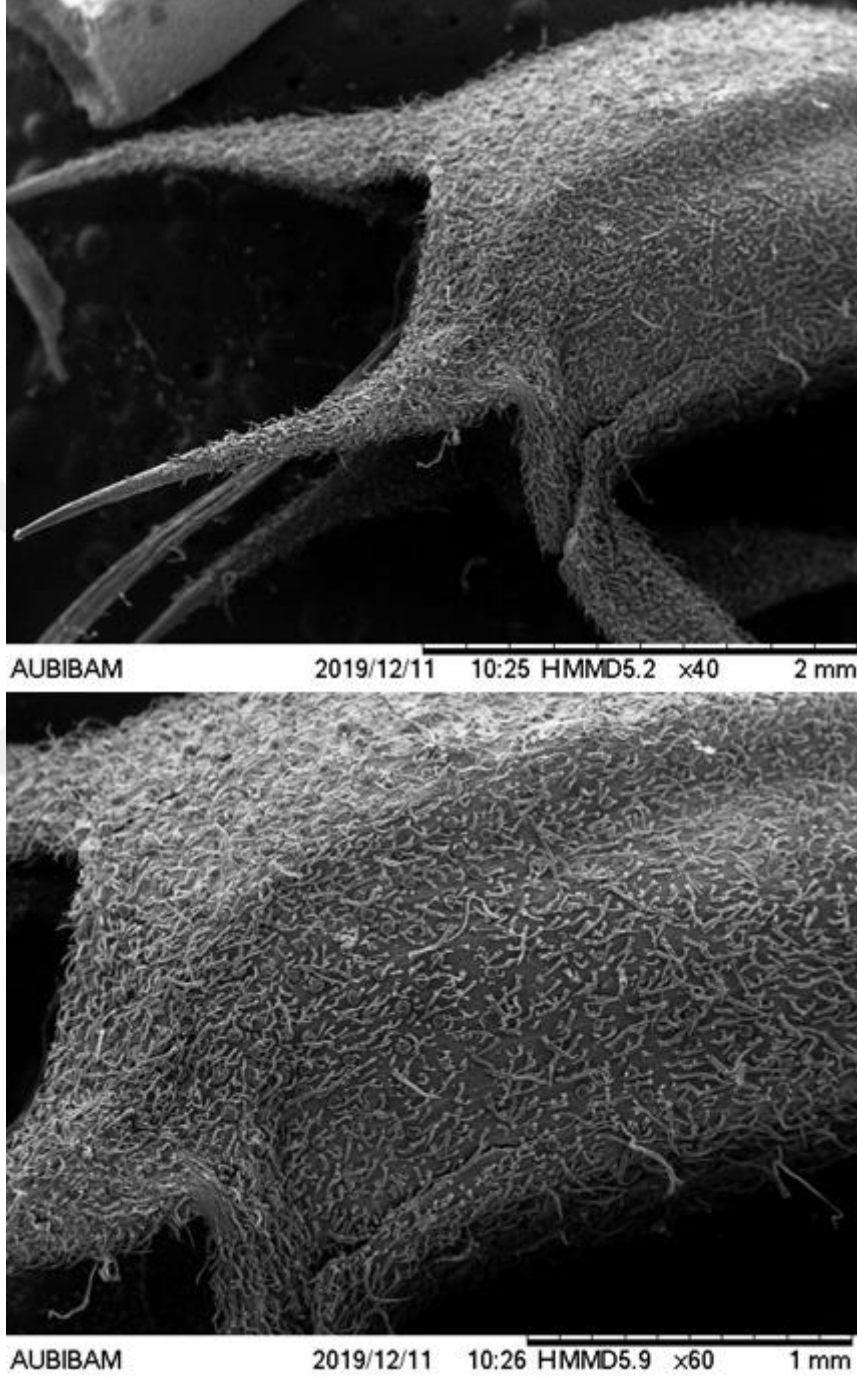
5.1.2.4. *L. persicus* ile yapılan SEM çalışmaları

Gövde dört köşeli olup, yoğun şekilde çok kısa tüylerle kaplıdır (Şekil 5.21).



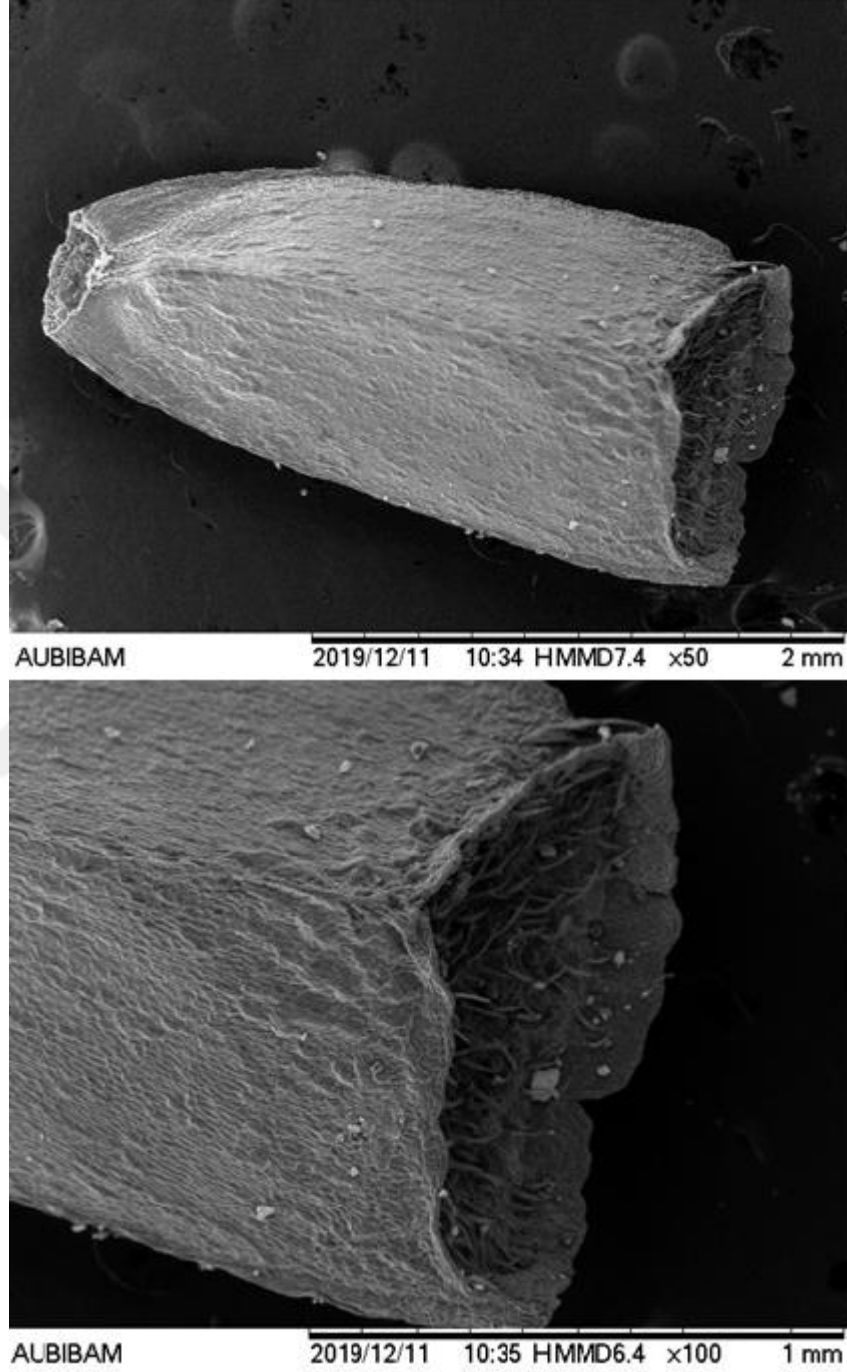
Şekil 5.21. *L. persicus* gövde yüzeyi SEM görüntüsü

Kaliks 6-8 mm, kaliks tüpü 4-6 mm, yoğun şekilde puberuloz tüylerle kaplı ve 5 ayrı damarlıdır (Şekil 5.22).



Şekil 5.22. *L. persicus* kaliks SEM görüntüsü

Nutlet 1.5-3 mm, obkonik, kahverengi, yüzey tüysüz, tepe ve taban trunquat, tepe kısa pilozdur (Şekil 5.23).



Şekil 5.23. *L. persicus* nutlet SEM görüntüsü

5.1.3. İstatistiksel bulgular

Bu çalışmada çok değişkenli istatistik tekniklerden olan kümeleme analizi ve ayırma (diskriminant) analizi tekniklerinden yararlanılmıştır.

5.1.3.1. Kümeleme analizi

Bireyleri farklı kümelere (gruplara) ayıran ve aralarındaki benzerlikleri/yakınlıkları ya da uzaklıkları belirlemeyi amaçlayan çok değişkenli bir analiz tekniği olan kümeleme analizi kullanılmıştır. *Leonurus* cinsine ait türlerin morfolojik karakterlerine göre yakınlıklarını belirlemek amacıyla yapılan kümeleme analizinde, Tablo 5.4'te verilen sonuçlar elde edilmiş ve kümeleme analizi dendogramı çizilmiştir (Şekil 5.99). Morfolojik özelliklerine göre türlerin popülasyonlarının doğal olarak kendi grupları içinde kaldıkları, aynı kümelerde yer aldıkları belirlenmiştir.

Tablo 5.4. Taksonların benzerlik katsayılarına göre kümeleme analizi

Aşama	Küme 1	Küme 2	Katsayılar	Küme 1	Küme 2	Sonraki Aşama
1	<i>L. cardiaca</i> NS22	<i>L. cardiaca</i> NS24	15.376	0	0	3
2	<i>L.glaucescens</i> NS19	<i>L. glaucescens</i> NS26	42.089	0	0	4
3	<i>L. cardiaca</i> NS22	<i>L. cardiaca</i> NS23	83.776	1	0	5
4	<i>L.glaucescens</i> NS19	<i>L. glaucescens</i> NS20	197.589	2	0	8
5	<i>L. cardiaca</i> NS22	<i>L. cardiaca</i> NS28	427.455	3	0	8
6	<i>L. cardiaca</i> NS27	<i>L.quinquelobatus</i> NS17	675.282	0	0	9
7	<i>L. cardiaca</i> NS21	<i>L.quinquelobatus</i> NS18	938.068	0	0	9
8	<i>L. cardiaca</i> NS22	<i>L. glaucescens</i> NS19	1272.082	5	4	10
9	<i>L. cardiaca</i> NS21	<i>L. cardiaca</i> NS27	2419.207	7	6	11
10	<i>L. cardiaca</i> NS22	<i>L. persicus</i> NS25	3608.359	8	0	11
11	<i>L. cardiaca</i> NS21	<i>L. cardiaca</i> NS22	12049.340	9	10	0

Birleştirilmiş küme başlığı altında Küme 1’de yer alan *L. cardiaca*-NS22 ile Küme 2’de yer alan *L. cardiaca*-NS24 birbirine en yakın (benzer) iki popülasyon olarak görülmektedir. Bu iki popülasyona 3. aşamada *L. cardiaca*-NS23 kodlu popülasyon katılırken, 5. aşamada *L. cardiaca*-NS28 kodlu popülasyon da katılmıştır. Tüm bunlara ek olarak, 8. aşamada *L. glaucescens*-NS19 kodlu popülasyon ile küme haline gelmişler ve 10. aşamada aralarına *L. persicus*-NS25’u almışlardır.

Ayrıca, *L. glaucescens*-NS19 kodlu örnek ile, *L. glaucescens*-NS26’un yakın olduğu, bunlara 4. aşamada *L. glaucescens*-NS20’in katıldığı da görülmektedir. *L. cardiaca*-NS27 ile *L. quinquelobatus*-NS17’nin aralarındaki uzaklık fazla olup, 9. aşamada aralarına *L. cardiaca*-NS21’i almışlardır.

5.1.3.2. Ayırma (diskriminant) analizi

Diskriminant analizinin temel amaçlarından ilki olan ayırma, diskriminant fonksiyonlarını belirleyip, bu fonksiyonlar aracılığıyla gruplar arası ayırma en fazla etki eden ayırıcı değişkenleri belirlemektedir. İkinci amaç olan sınıflandırma ile ise hangi gruptan geldiği bilinmeyen bir birimin hangi gruba dahil edileceğini belirlemek amaçlanır.

Türkiye’de yayılış gösteren *Leonurus* cinsine ait türlerin morfolojik incelenmesinde sınıflandırma açısından önemli olan GBB, GBE, YS, YE, YB, BS, BE, BB, BR, KO, KA, KT, KR ve NU özellikleri ölçülmüş ve ölçülen özelliklere ait istatistiksel değerler Tablo 5.5’te verilmiştir. Bu değişkenler kullanılarak yapılan istatistiksel analizlere dayalı olarak ayırma analizinin grafiksel gösteriminde türlerin büyük oranda kendi grupları içerisinde kaldığı belirlenmiştir (Şekil 5.100).

Tablo 5.5. Taksonların morfolojik özelliklerinin ortalama ve standart sapma değerleri

TÜR		GBB (cm)	GBE (cm)	YS (mm)	YE (mm)	YB (mm)	BS (mm)	BE (mm)	BB (mm)	BR (mm)	KO (mm)	KA (mm)	KT (mm)	NU (mm)	KR
<i>L.cardiaca</i> -NS21	Ort.	150.03	4.22	17.70	33.93	45.23	14.73	17.27	34.80	3.11	9.05	6.51	4.27	2.27	1.07
	Std Sapma	44.73	0.60	8.46	13.64	14.63	5.19	7.24	8.41	0.70	0.75	0.44	0.51	0.25	0.25
<i>L.cardiaca</i> -NS22	Ort.	86.63	3.84	17.47	27.93	34.43	13.03	17.33	28.77	2.17	8.12	5.35	3.40	2.00	1.03
	Std Sapma	15.39	0.72	5.48	8.00	8.98	2.94	5.49	8.27	0.52	0.99	0.34	0.34	0.00	0.18
<i>L.cardiaca</i> -NS23	Ort.	98.97	4.23	16.57	29.10	43.73	10.53	13.17	26.57	2.58	8.07	5.46	3.48	2.00	1.00
	Std Sapma	32.27	0.56	3.17	7.36	11.56	1.97	3.35	7.43	0.46	0.67	0.41	0.42	0.00	0.00
<i>L.cardiaca</i> -NS24	Ort.	78.63	4.07	18.40	25.77	34.43	12.73	16.77	36.40	1.91	9.15	5.46	3.19	2.25	1.00
	Std Sapma	27.52	0.72	5.17	7.00	8.37	4.93	9.01	15.21	0.36	1.29	0.37	0.20	0.25	0.00
<i>L.cardiaca</i> -NS27	Ort.	163.90	4.95	17.00	30.03	48.73	13.93	18.23	31.63	2.42	7.97	6.53	3.99	2.00	1.03
	Std Sapma	49.04	0.64	6.64	14.27	12.80	6.76	8.49	9.63	0.98	0.64	1.04	0.72	0.51	0.18
<i>L.cardiaca</i> -NS28	Ort.	74.60	3.53	17.20	28.47	39.83	10.33	16.43	27.63	3.56	7.46	7.30	4.31	2.00	1.90
	Std Sapma	13.72	0.43	6.36	7.93	10.76	2.88	6.68	6.48	0.94	0.41	0.35	0.37	0.00	1.40
<i>L.quinquelobatus</i> -NS17	Ort.	157.73	4.97	23.13	41.57	54.33	13.87	14.23	35.13	1.95	8.68	7.05	3.68	2.50	2.97
	Std Sapma	11.84	1.15	12.00	23.49	23.66	6.32	11.13	13.90	0.35	1.43	0.94	0.68	0.51	0.18
<i>L.quinquelobatus</i> -NS18	Ort.	110.00	5.06	14.90	29.63	42.47	11.57	15.40	28.33	2.00	8.41	6.76	3.71	2.50	3.00
	Std Sapma	35.72	1.04	4.53	11.51	17.67	4.21	5.64	10.95	0.70	0.45	0.99	0.61	0.51	0.26
<i>L.glaucescens</i> -NS19	Ort.	88.33	5.58	20.80	31.43	37.30	12.13	17.33	30.97	1.75	8.92	7.04	3.63	2.23	2.03
	Std Sapma	15.86	0.97	5.31	18.11	13.83	4.42	7.36	11.60	0.35	1.00	0.97	0.43	0.25	0.18
<i>L.glaucescens</i> -NS20	Ort.	101.00	4.54	22.30	31.13	43.60	12.60	18.60	34.90	2.08	8.02	7.46	3.64	2.25	2.03
	Std Sapma	19.03	0.61	6.22	8.09	9.06	3.05	5.48	8.00	0.55	0.68	0.89	0.41	0.76	0.18
<i>L.glaucescens</i> -NS26	Ort.	87.89	5.45	22.73	33.53	48.73	11.00	13.67	30.57	2.62	8.19	7.29	4.55	2.50	1.93
	Std Sapma	8.41	0.42	7.11	15.54	12.20	4.27	6.31	10.34	0.71	0.76	0.92	0.61	0.51	0.25
<i>L.persicus</i> -NS25	Ort.	65.20	4.14	21.77	21.60	27.97	12.23	18.03	25.97	2.55	9.86	7.30	4.97	2.25	3.73
	Std Sapma	7.30	0.76	10.67	7.15	8.70	3.19	5.89	9.50	0.49	0.71	0.76	0.66	0.76	0.78
TOPLAM	Ort.	105.24	4.55	19.16	30.34	41.73	12.39	16.37	30.97	2.39	8.49	6.63	3.90	2.23	1.89
	Std Sapma	41.85	0.97	7.57	13.51	14.94	4.53	7.22	10.71	0.80	1.06	1.06	0.72	0.48	1.02

GBB gövde boyu, GBE gövde eni, YS yaprak sapı, YE yaprak eni, YB yaprak boyu, BS brakte sapı, BE brakte eni, BB brakte boyu, BR brakteol, KO korolla, KA kaliks, KT kaliks tüpü, KR korolla rengi, NU nutlet

Morfolojik özelliklere göre yapılan ayırım analizinde türlerin sınıflandırma başarısı %77.2 olarak bulunmuş (Tablo 5.6) ve büyük oranda türler kendi grupları içerisinde kalmıştır (Şekil 5.98).

Tablo 5.6. Taksonların morfolojik özelliklerine göre sınıflandırma başarısı

Tür-Lokalite Orjinal gruplar		Ayırma Analizine Göre Tahmini Grup Üyelikleri											
		NS 21	NS 22	NS 23	NS 24	NS 27	NS 28	NS 17	NS 18	NS 19	NS 20	NS 26	NS 25
Miktar	<i>L. cardiaca</i> (NS21)	22	2	2	0	1	1	1	0	0	1	0	0
	<i>L. cardiaca</i> (NS22)	0	24	1	5	0	0	0	0	0	0	0	0
	<i>L. cardiaca</i> (NS23)	1	7	20	1	1	0	0	0	0	0	0	0
	<i>L. cardiaca</i> (NS24)	0	2	4	24	0	0	0	0	0	0	0	0
	<i>L. cardiaca</i> (NS27)	2	1	4	0	21	0	0	0	0	0	2	0
	<i>L. cardiaca</i> (NS28)	0	1	0	0	0	22	0	3	0	1	0	3
	<i>L. quinquelobatus</i> (NS17)	0	0	0	0	0	0	24	6	0	0	0	0
	<i>L. quinquelobatus</i> (NS18)	0	0	0	0	0	0	4	24	1	0	1	0
	<i>L. glaucescens</i> (NS19)	0	1	0	0	0	0	0	0	21	8	0	0
	<i>L. glaucescens</i> (NS20)	0	0	0	0	0	1	0	0	3	24	2	0
	<i>L. glaucescens</i> (NS26)	0	0	0	0	0	1	0	0	2	2	25	0
	<i>L. persicus</i> (NS25)	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	2	27
%	<i>L. cardiaca</i> (NS21)	73.3	6.7	6.7	0	3.3	3.3	3.3	0	0	3.3	0	0
	<i>L. cardiaca</i> (NS22)	0	80.0	3.3	16.7	0	0	0	0	0	0	0	0
	<i>L. cardiaca</i> (NS23)	3.3	23.3	66.7	3.3	3.3	0	0	0	0	0	0	0
	<i>L. cardiaca</i> (NS24)	0	6.7	13.3	80.0	0	0	0	0	0	0	0	0
	<i>L. cardiaca</i> (NS27)	6.7	3.3	13.3	0	70.0	0	0	0	0	0	6.7	0
	<i>L. cardiaca</i> (NS28)	0	3.3	0	0	0	73.3	0	10.0	0	3.3	0	0
	<i>L. quinquelobatus</i> (NS17)	0	0	0	0	0	0	80.0	20.0	0	0	0	0
	<i>L. quinquelobatus</i> (NS18)	0	0	0	0	0	0	13.3	80.0	3.3	0	3.3	0
	<i>L. glaucescens</i> (NS19)	0	3.3	0	0	0	0	0	0	70.0	26.7	0	0
	<i>L. glaucescens</i> (NS20)	0	0	0	0	0	3.3	0	0	10.0	80.0	6.7	0
	<i>L. glaucescens</i> (NS26)	0	0	0	0	0	3.3	0	0	6.7	6.7	83.3	0
	<i>L. persicus</i> (NS25)	0	0	0	0	0	0	0	3.3	0	0	6.7	90.0

Tablo 5.7. *Standartlaştırılmış ayırım fonksiyon katsayıları*

	Fonksiyon										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
GBB	-.045	.744	.362	.423	-.160	.101	-.207	-.054	-.015	-.012	-.021
GBE	.043	.345	-.370	-.212	.544	-.518	.025	.223	.076	-.146	-.140
YS	.218	-.167	-.199	-.022	.350	.395	-.130	-.743	.414	-.176	.290
YE	.019	-.140	-.108	.322	-.167	.467	-.097	1.395	.923	.209	-.357
YB	-.172	.552	.336	-.472	-.132	-.557	.349	-.931	-.674	-.307	.485
BS	.024	.050	.102	.250	.156	-.092	-.296	.125	.515	.292	.219
BE	.075	-.303	.199	-.052	.104	-.187	-.909	.128	-.373	.190	.425
BB	-.162	.210	-.344	-.102	-.036	.579	.966	-.262	-.261	-.014	-1.028
BR	.040	-.270	.566	.043.-	-.072	-.108	.327	.316	.008	-.276	.102
KO	.246	-.142	-.157	.688	.275	.096	--.145	.145	-.297	-.374	.228
KA	.298	.347	.214	-.453	.201	.544	-.234	.220	-.198	-.091	.186
KT	.278	-.202	.603	.278	.361	-.187	.067	-.221	.136	.308	-.308
NU	.148	.177	-.200	.078	.004	.039	.417	.157	-.139	.610	.508
KR	.892	.034	-.111	.025	-.392	-.154	.043	-.055	.034	-.060	-.130

Türlerin morfolojik özelliklerine göre yapılan ayırmada, fonksiyonlar aracılığıyla gruplar arası ayırma en fazla etki eden ayırıcı değişkenler belirlenmiştir. Standartlaştırılmış ayırım fonksiyon katsayılarına göre, 1. Fonksiyonda en fazla katkıyı KR yapmıştır. Bunu KA ve KT izlemektedir. İkinci fonksiyonda ise, GBB ilk sırada yer alırken, bunu YB, KA ve GBE takip etmektedir. Üçüncü fonksiyonda en fazla katkıyı KT yapmıştır, bunu BR ve GBE izlemektedir (Tablo 5.7). Bir başka ifadeyle bu özelliklerde olabilecek farklılıklar, diğer morfolojik özelliklerde olabilecek farklılıklara göre daha fazla ayırma yol açacaktır. Dolayısıyla söz konusu türler öncelikle bu özellikleri bakımından farklıdır.

Tablo 5.8. Grup ortalamalarının eşitliği testi

	Wilk's Lambda	F	df1	df2	Sign.
GBB	.405	46.452	11	348	< 001
GBE	.585	22.415	11	348	< 001
YS	.873	4.594	11	348	< 001
YE	.881	4.272	11	348	< 001
YB	.777	9.090	11	348	< 001
BS	.914	2.960	11	348	< 001
BE	.940	2.003	11	348	0.027
BB	.894	3.737	11	348	< 001
BR	.595	21.564	11	348	< 001
KO	.644	17.493	11	348	< 001
KA	.494	32.378	11	348	< 001
KT	.507	30.710	11	348	< 001
NU	.842	5.923	11	348	< 001
KR	.229	106.598	11	348	< 001

F: Test değeri, df: Serbestlik derecesi, Sign: Anlamlılık

Diskriminant analizinin birinci amacı, ayırıcı değişken setine göre önceden belirlenmiş iki veya daha çok grubun ortalamalarının anlamlı fark gösterip göstermediğini belirlemektir. Wilks' Lambda her bir ayırım fonksiyonu için özdeğer istatistiğinin anlamlılığını test etmektedir. Her bir bağımsız değişkenin anlamlılık düzeyi incelendiğinde, 0.05 anlamlılık düzeyinde gruplar arasındaki farkların tüm değişkenler için anlamlı olduğu görülmektedir (Tablo 5.8).

5.2. Anatomik Bulgular

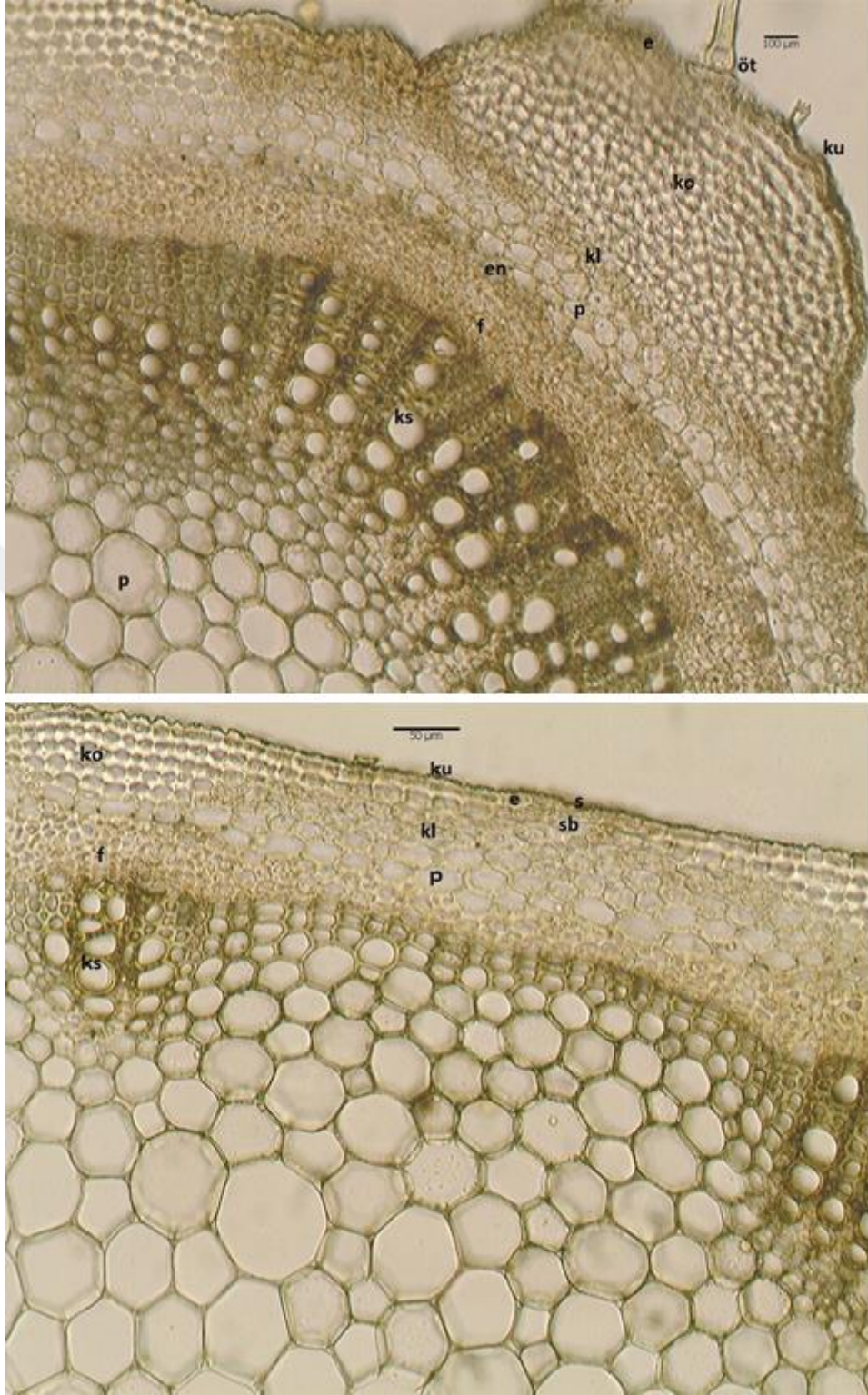
Bitkilerin tanımlanması ve karakterizasyonu, evrimsel gelişimin aydınlatılmasında önemli bir süreç olup, mevcut her karakter sistematik olarak değerlidir. Bitkinin anatomik özellikleri ve iç yapıları, bitkilerin sınıflandırılmasında önemli bir veri kaynağıdır. Lamiaceae familyasının alt familyası olan Lamioideae içindeki pek çok cins üzerinde anatomik çalışmalar yapılmış olsa da, *Leonurus* cinsi üzerinde bu tip çalışmalar oldukça azdır. Bu kısımda Türkiye'deki *Leonurus* türlerinin anatomik özellikleri verilmiş, gövde

ve yaprak kısımlarının yapıları aydınlatılmış ve türler arasındaki anatomik farklılıklar ilk kez ortaya konmuştur.

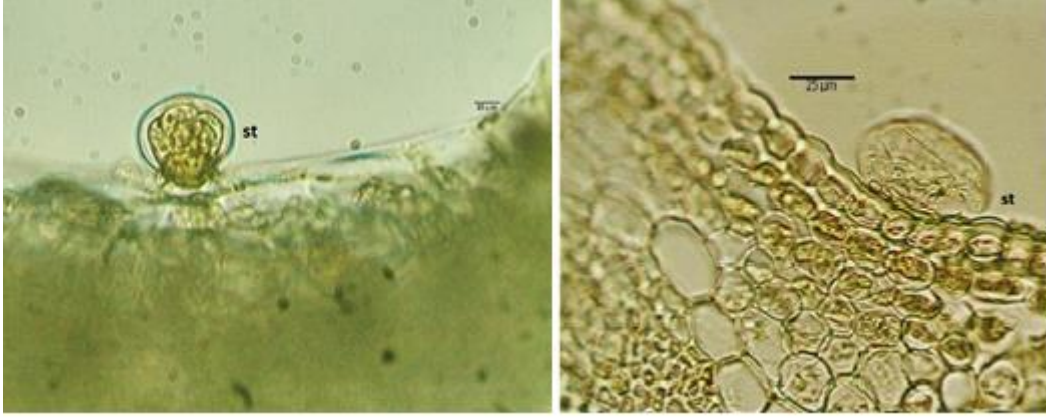
5.2.1. *L. cardiaca*

5.2.1.1. *Gövde*

Gövde transeksiyonu belirgin dörtgendir. Gövdeden alınan enine kesitte kalın kutikulanın devamında, epiderma tek sıralı, izodiyametik dörtgen hücrelerden oluşmuştur. Köşelerde bulunan örtü tüyleri basit, uçta düz veya hafif kıvrık, 2-3 hücrelidir. Salgı tüylerinin yanı sıra, kısa bir pedisel ve tek bir diskte düzenlenmiş 8 hücreden oluşan oval, düzleştirilmiş bir baş ile karakterize edilen peltat tüyler gözlenmiştir (Şekil 5.25). Korteks köşelerde, epiderma altında orta damarın dışı doğru çıkıntı yaptığı kısımlarda, 10-15 sıralı, genellikle düzensiz çeperlerden oluşan, iyi gelişmiş kollenkimayı içerir. Köşeler arasında epiderma altında, korteksin dış kısmını oluşturan kollenkima dokuları arasında 2-3 sıra, köşelere yakın ise 1-2 sıra klorenkima yer alır. Bu dokulardan sonra kollenkimanın altında, 2-3 sıra ve köşeler arasında 3-4 sıra yuvarlak-oval şekilli hücrelerden oluşan renksiz korteks parenkiması bulunur. Endoderma zaman zaman belirsizdir. Merkezi silindirin ilk tabakası olan periskl yer yer parenkima hücreleriyle kesintiye uğramıştır ve sklerenkimatik hücrelerden oluşmuştur. Floem basık düzensiz çeperli hücrelerden oluşur. Kambiyum belirsizdir. Ksilemde trakeler yuvarlak veya oval şekilli, trakeitler çokgen şekillidir (Şekil 5.24). Öz bölgesi boştur.



Şekil 5.24. *L. cardiaca* gövde anatomisi; ku: kütüküla, e: epidermis, ko: kollenkima, kl: klorenkima, p: parenkima, en: endodermis, fl: floem, ks: ksilem, s: stoma, sb: stoma boşluğu,  :  z.

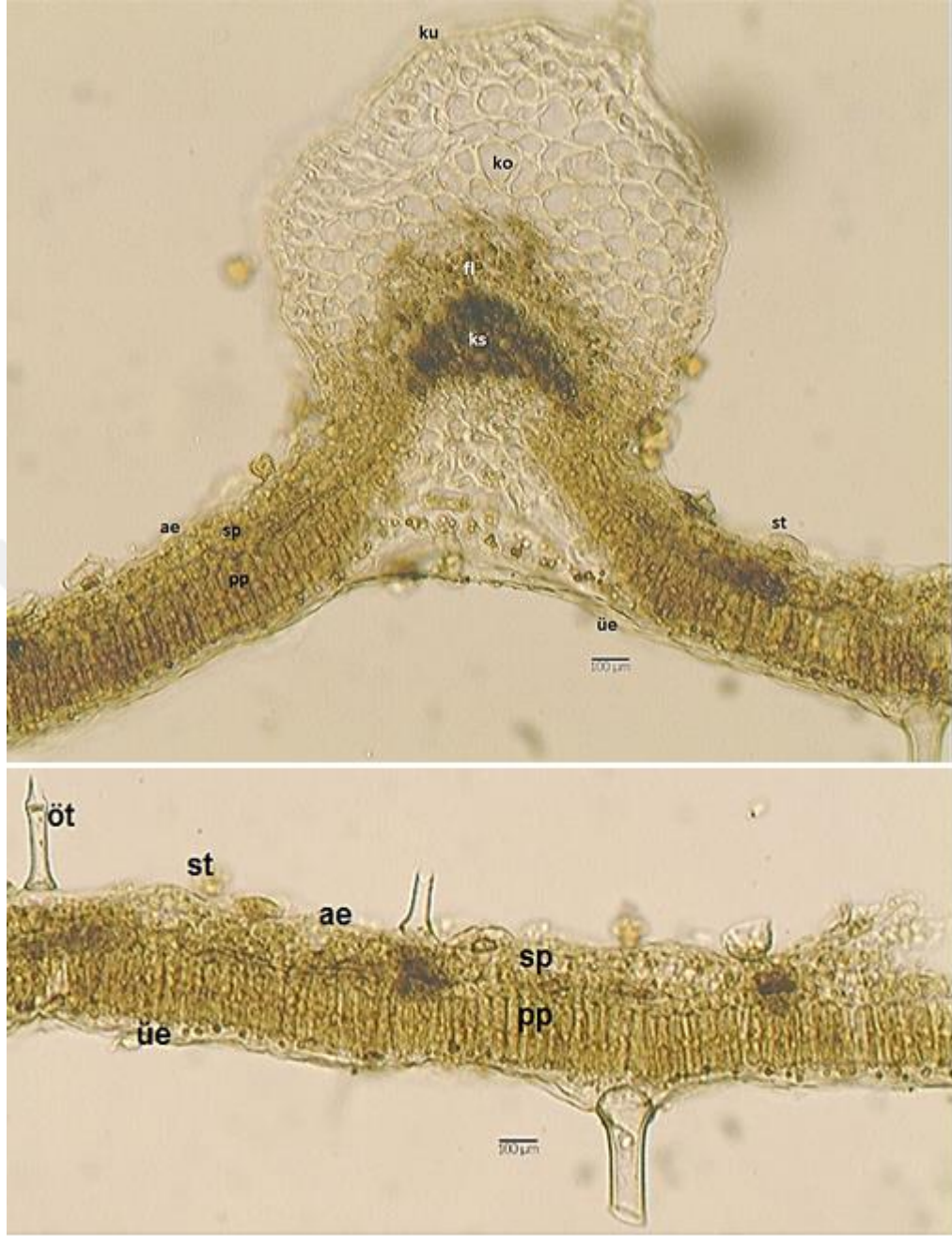


Şekil 5.25. *L. cardiaca* gövdesinde salgı tüyü

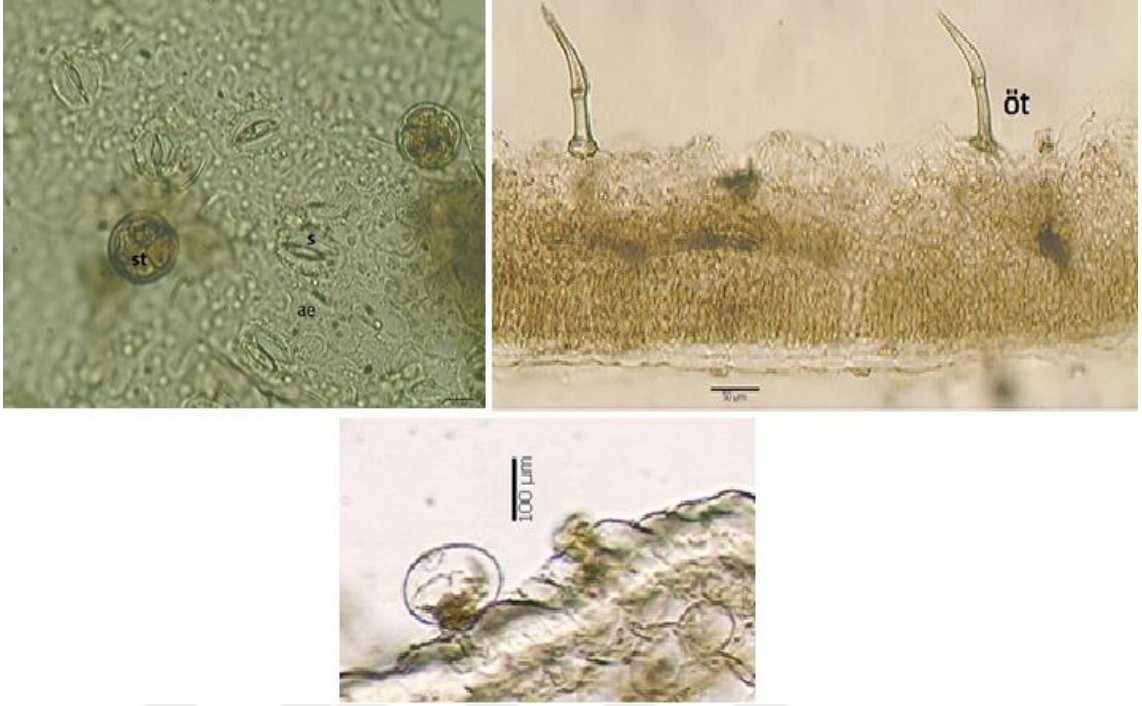
5.2.1.2. Yaprak

Yaprak enine kesitinde üst ve alt epidermis dikdörtgenimsi hücrelerden oluşmuş olup, ince bir kütikula ile kaplıdır. Epidermis tek sıralı ve mezofil dorsiventraldir. Mezofil tabakası palizat ve sünger parenkimasından oluşur. Palizat parenkiması, sıkı dizilmiş tek sıralı ve silindirik şekilli; sünger parenkiması 2-3 sıralı, gevşek dizilmiş ve hava boşlukları yoğundur. Yaprak orta damarının üst ve alt yüzeyi kollenkima ile çevrilmiştir. Fotosentezin gerçekleştiği mezofil tabakasının medyan bölgesinde, kollateral vasküler demetler gözlenmiştir. Ksilemin üst epidermise, floemin ise alt epidermise doğru yer aldığı gözlenmiştir (Şekil 5.26).

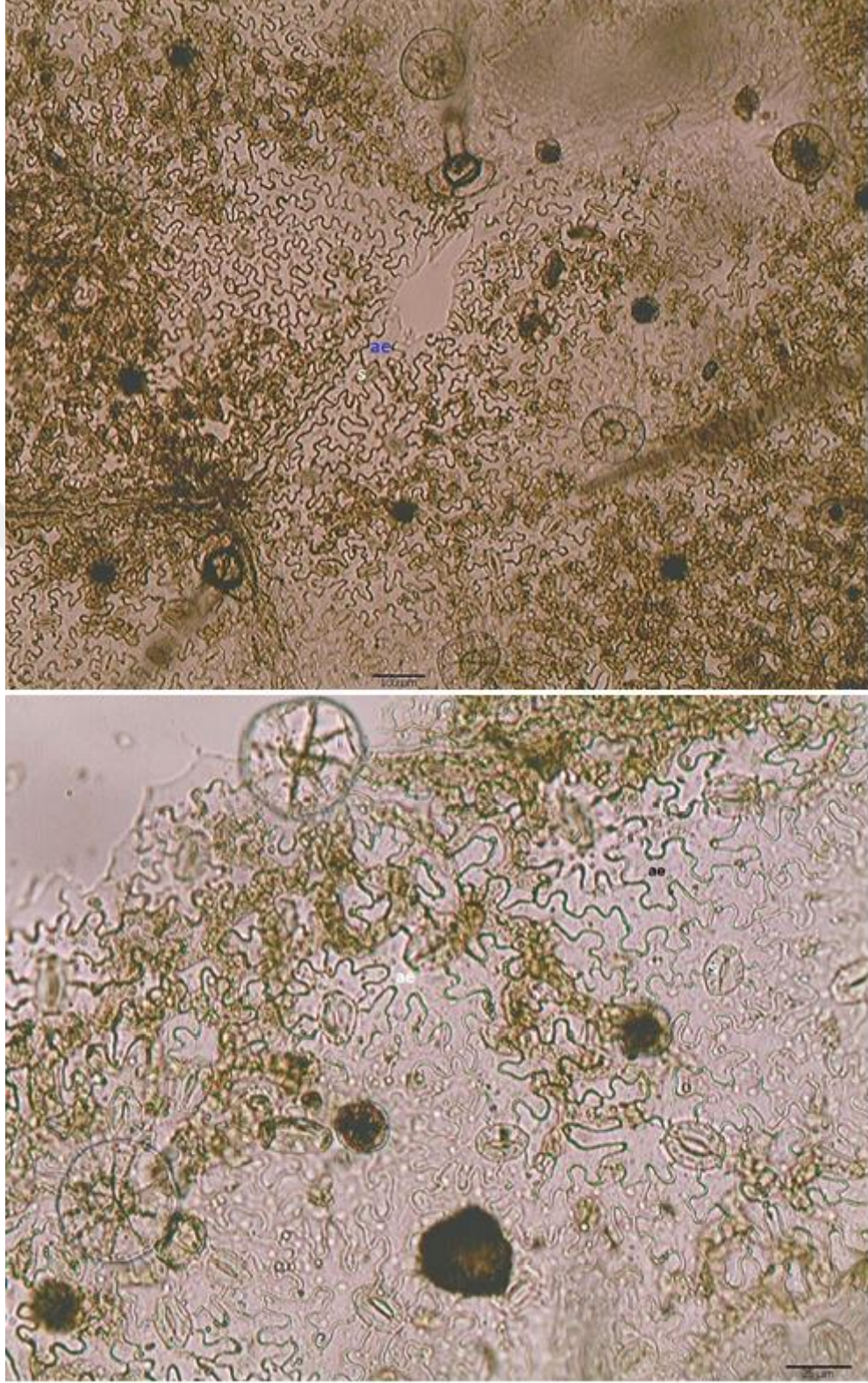
Üst epiderma hücreleri, alt epiderma hücrelerinden daha büyüktür. Yüzeysel kesitte üst epiderma hücreleri, alt epiderma hücrelerinden daha dalgalı çeperlidir (Şekil 5.29). Tüyler, glandular (salgı) ve non-glandular (örtü) olmak üzere iki farklı tipte gözlenmektedir. Yaprakta yaygın olarak bulunan örtü tüyleri basit, uçta düz veya hafif kıvrık olup 1-2 hücrelidir. Salgı tüyleri başı 1, sapı kısa 1-2 hücrelidir. Salgı tüylerinin yanı sıra, kısa bir pedisel ve tek bir diskte düzenlenmiş 8 hücreden oluşan oval, düzleştirilmiş bir baş ile karakterize edilen peltat tüyler gözlenmiştir (Şekil 5.27). Peltat tüyler alt epidermada daha yaygın olup, örtü tüyelerine her iki epidermada da rastlanmıştır. Diasitik ve anomositik tipteki stomalar alt epidermada olup (hipostomatik), epiderma ile aynı seviyede veya biraz yukarıda yer alır (Şekil 5.28).



Şekil 5.26. *L. cardiaca* yaprak anatomisi; ku: kutikula, üe: üst epidermis, ae: alt epidermis, ko: kollenkima, pp: palizat parenkiması, sp: sünger parenkiması, id: iletim demeti ot: örtü tüyü, st: salgı tüyü



Şekil 5.27. *L. cardiaca* yaprağında örtü tüyü, salgı tüyü



Şekil 5.28. *L. cardiaca* yaprak alt yüz; ae: alt epidermis, s: stoma



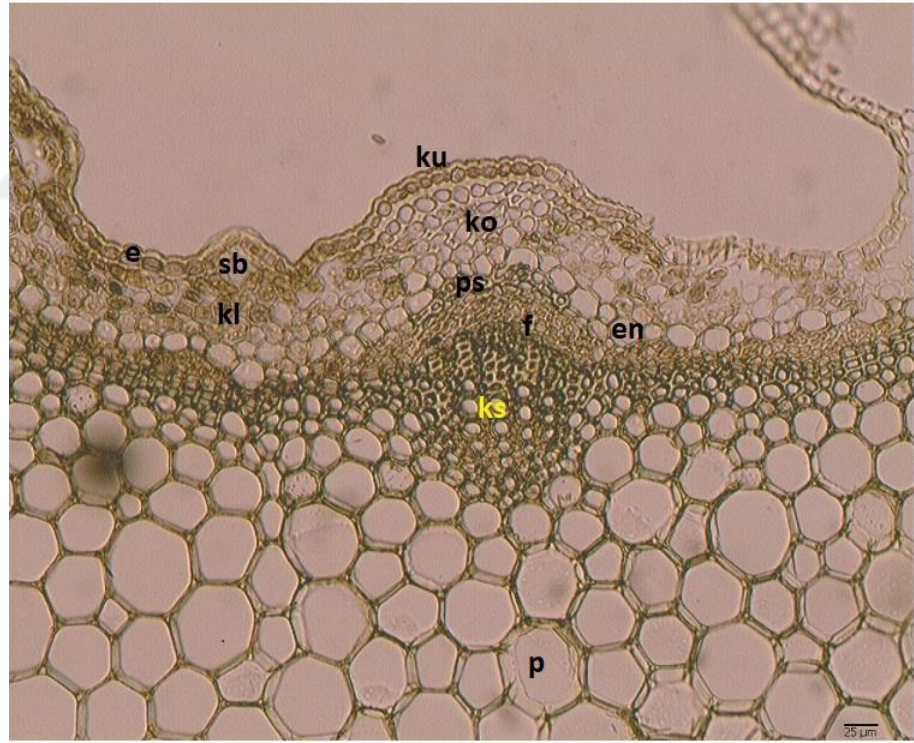
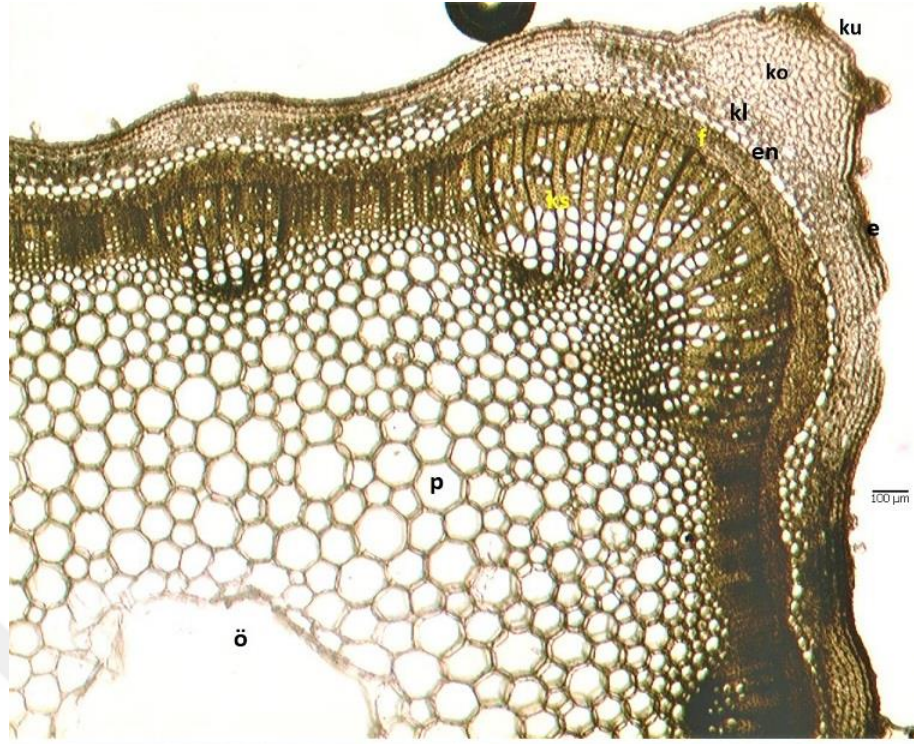
Şekil 5.29. *L. cardiaca* yaprak üst yüz; üe: üst epidermis

5.2.2. *L. glaucescens*

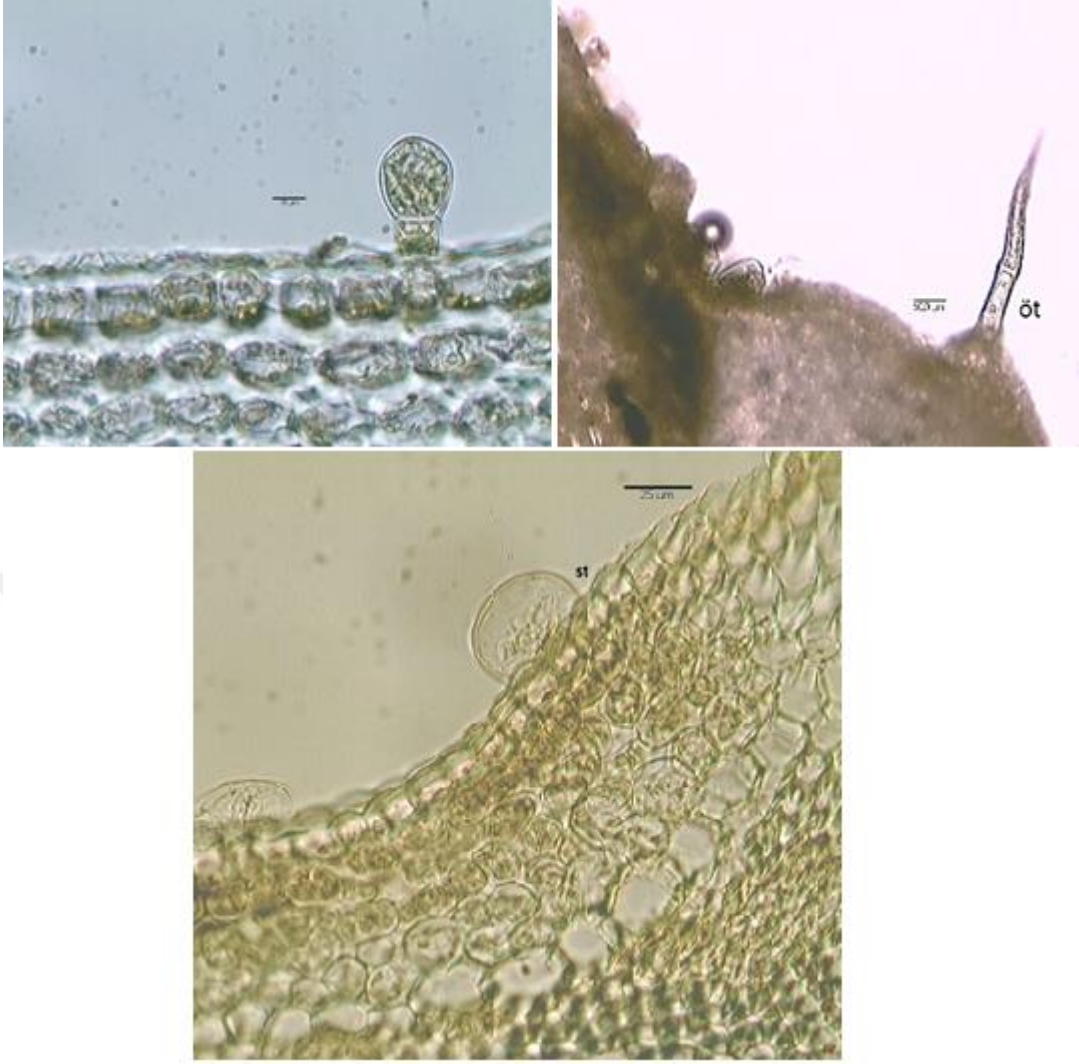
5.2.2.1. *Gövde*

Gövdeden alınan enine kesitte tipik olarak dört köşeli olduğu, kalın kütikulanın devamındaki epidermanın tek sıra, oval veya dikdörtgen hücrelerden oluştuğu gözlenmiştir. Epidermanın üst çeperi alt çeperden daha kalın olup, örtü ve salgı tüyleri taşır. Gövdede köşelerde daha yoğun olarak bulunan örtü tüyleri basit, uçta düz veya hafif kıvrık, 1-2 hücrelidir. Salgı tüylerinin yanı sıra, kısa bir pedisel ve tek bir diskte düzenlenmiş 8 veya bazen 16 hücreden oluşan oval, düzleştirilmiş bir baş ile karakterize edilen peltat tüyler gözlenmiştir (Şekil 5.31).

Köşelerde epidermanın altında 12-15 sıra yuvarlak, düzensiz çeperli hücrelerden oluşmuş köşe kollenkiması bulunmaktadır. Köşeler arasında ve köşelere yakın, epiderma altında, korteksin dış kısmını oluşturan kollenkima dokuları arasında 3-4 sıra klorenkima yer alır. Bu dokulardan sonra kollenkimanın altında, 1-2 sıra izodiyametik hücrelerden oluşan renksiz korteks parenkiması bulunur. Korteksin iç sınırını oluşturan endoderma tek sıra belirgin bir halka şeklindedir. Periskl yer yer parenkima hücreleriyle kesintiye uğramış olup, sklerenkimatik hücrelerden oluşmuştur. Periskl tabakası altında, floem tabakası gelir. Floem basık düzensiz çeperli hücrelerden oluşur. Kambiyum belirsizdir. Ksilem, büyük ve düzenli olarak dizilmiş trakeal elemanlardan oluşmuştur. Öz bölgesi boştur (Şekil 5.30).



Şekil 5.30. *L. glaucescens* gövde anatomisi; ku: kütikula, e: epidermis, ko: kollenkima, kl: klorenkima p: parenkima, en: endodermis, ps: periskl, fl: floem, ks: ksilem, s: stoma, sb: stoma boşluğu, ö: öz



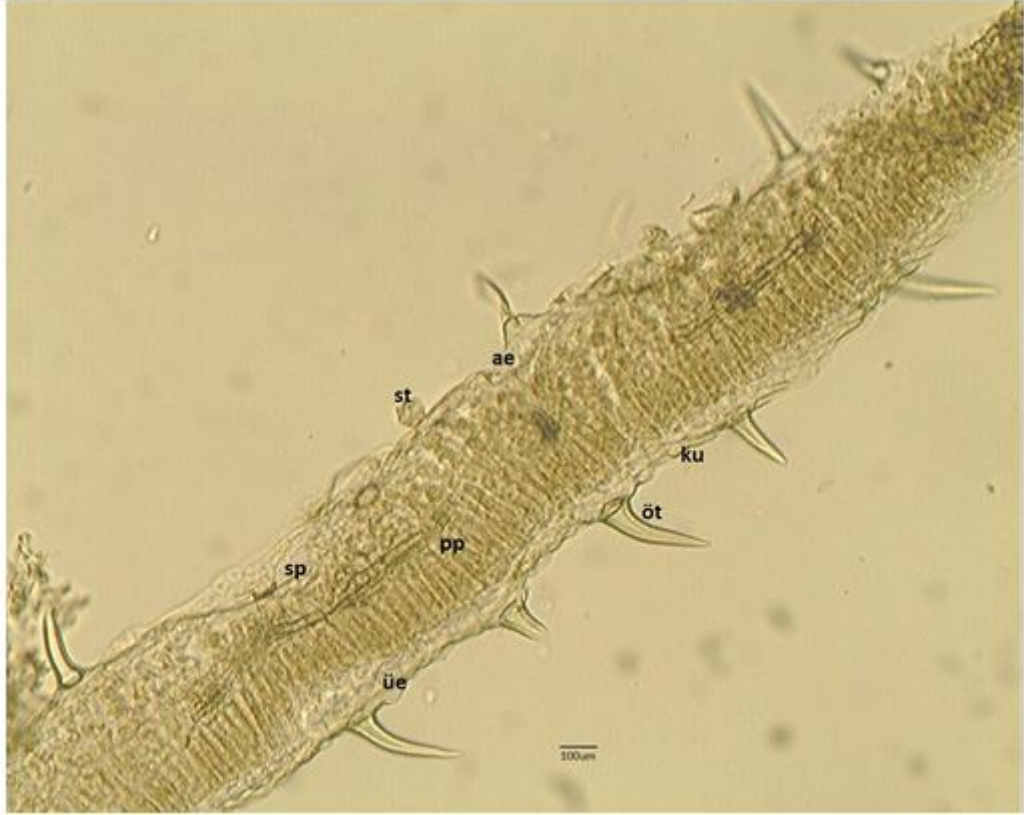
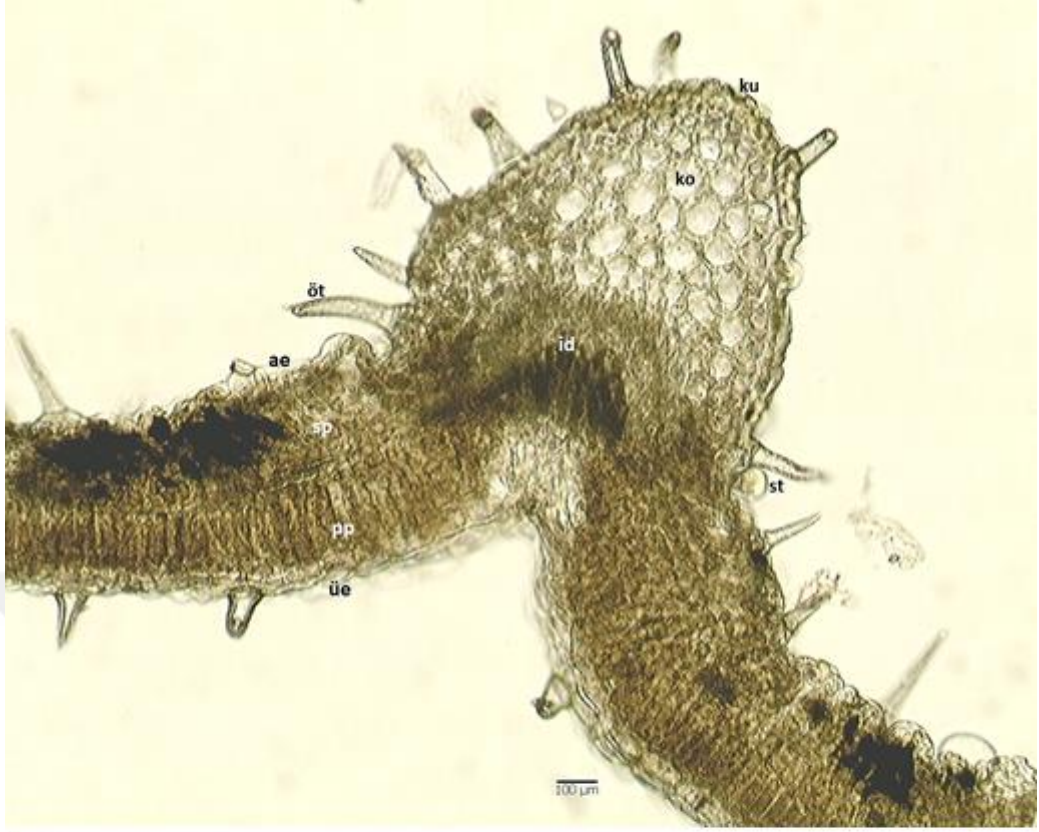
Şekil 5.31. *L. glaucescens* gövdesinde örtü tüyü, salgı tüyü, peltat tüy

5.2.2.2. Yaprak

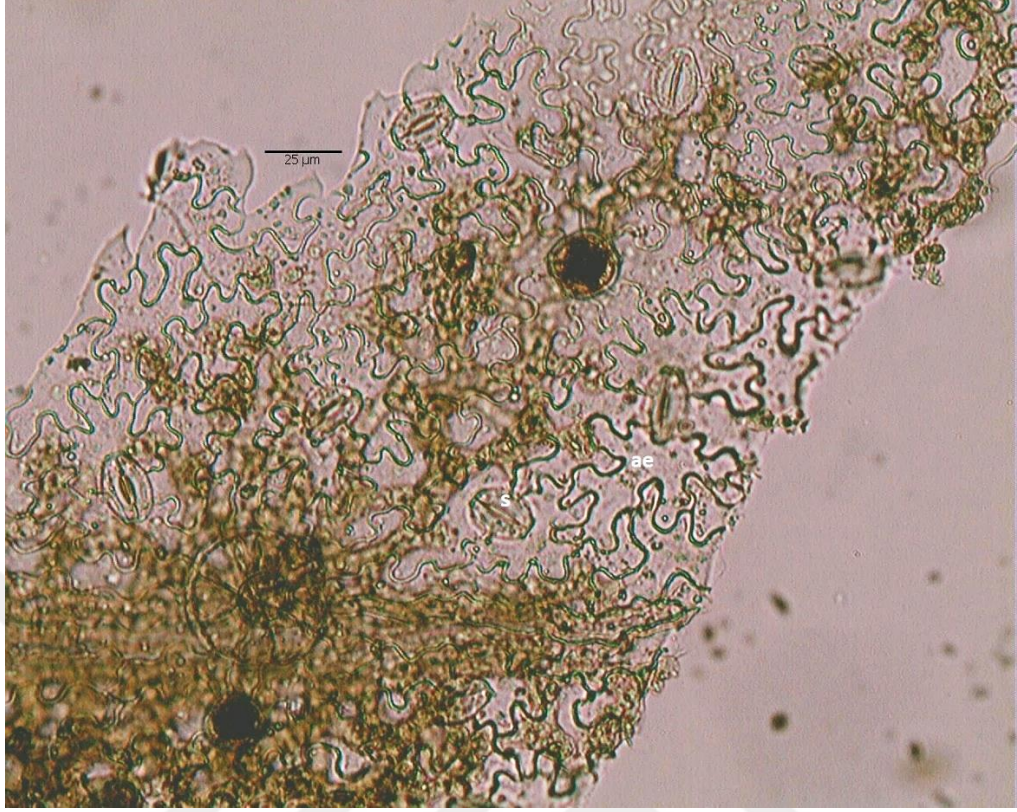
Orta damar ve damarlar arası bölgelerden alınan enine kesitlerde, üstte ve altta tek sıra, dikdörtgen veya genelde oval şekilli hücrelerden oluşmuş epiderma bulunur. Epidermis tek sıralı ve yaprak dorsiventraldir. Epiderma tabakasında örtü ve salgı tüylerine rastlanır. Yüzeysel kesitte alt epiderma hücreleri, üst epiderma hücrelerinden daha dalgalı çeperlidir (Şekil 5.34). Tüyler, glandular (salgı) ve non-glandular (örtü) olmak üzere iki farklı tipte gözlenmektedir. Yaprakta yaygın olarak bulunan örtü tüyleri basit, uçta düz veya hafif kıvrık olup 1-2 hücrelidir. Salgı tüyleri başı 1, sapı kısa 1-2 hücrelidir. Peltat tüyler, alt epidermada daha yoğundur. Diasitik ve anomositik tipteki stomalar yaprağın sadece alt epidermasında bulunur (hipostomatik) (Şekil 5.33). Yaprağın üst epidermasının altında yer alan palizat dokusu, sıkı dizilmiş tek sıralı ve

silindirik şekilli parenkima hücrelerinden oluşur. Sünger parenkiması ise 2-3 sıralı olup, geniş interselüler boşluklara sahip gayri muntazam şekil gösterir. Yaprak orta damarının üst ve alt yüzeyi kollenkima ile çevrilmiştir. Bol kloroplastlı parenkima hücrelerinden ibaret olan mezofil tabakasının medyan bölgesinde, kollateral vasküler demetler gözlenmiştir. Ksilemin üst epidemise, floemin ise alt epidermise doğru yer aldığı gözlenmiştir (Şekil 5.32).





Şekil 5.32. *L. glaucescens* yaprak anatomisi; ku: kütikula, üe: üst epidermis, ae: alt epidermis, ko: kollenkima, pp: palizat parenkiması, sp: sünger parenkiması, id: iletim demeti ötü: örtü tüyü, st: salgı tüyü



Şekil 5.33. *L. glaucescens* yaprak alt yüz; ae: alt epidermis, s: stoma

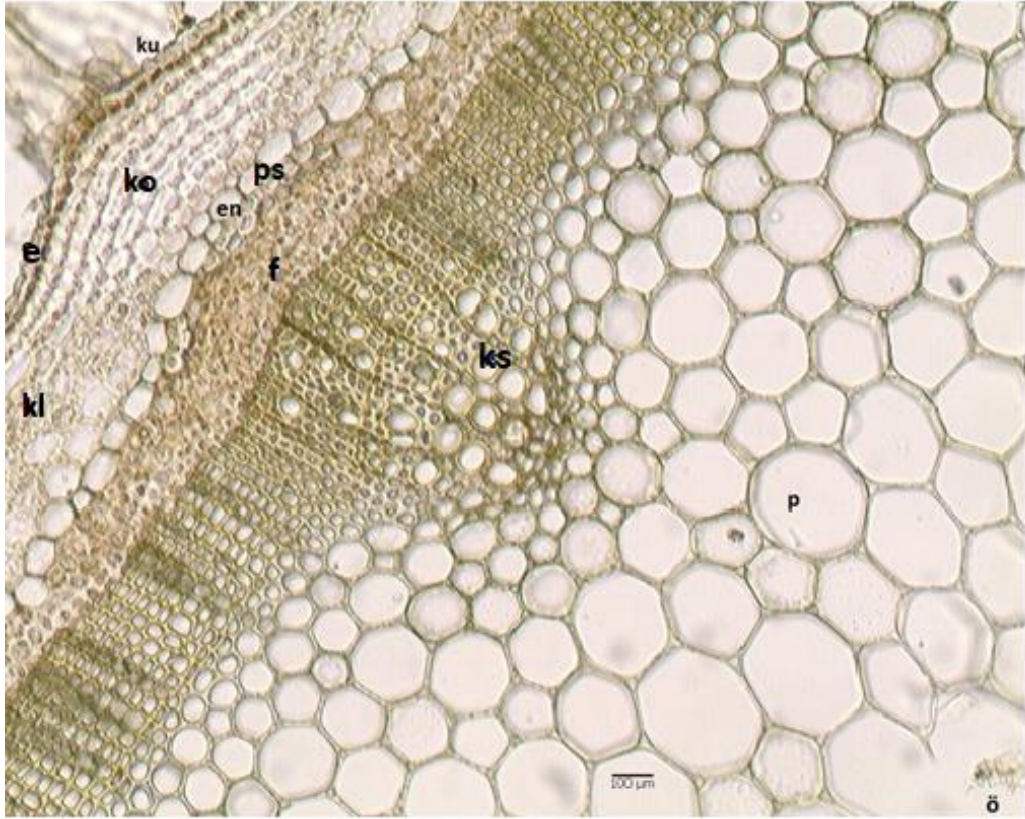
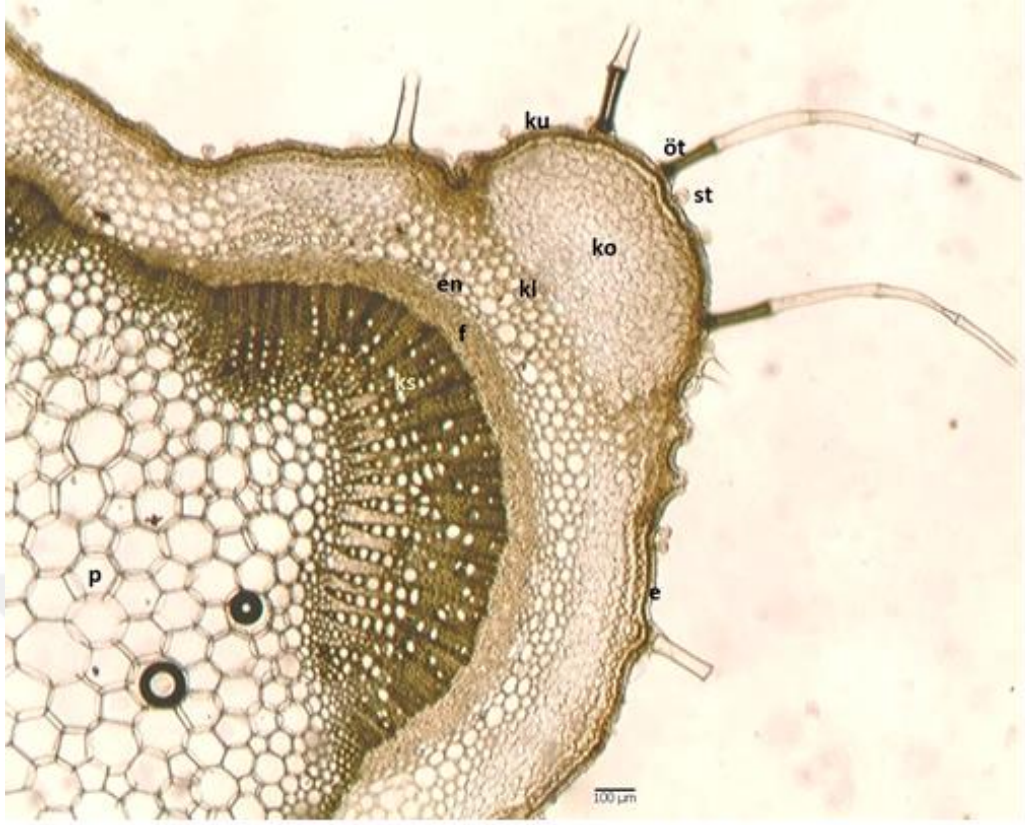


Şekil 5.34. *L. glaucescens* yaprak üst yüz; üe: üst epidermis

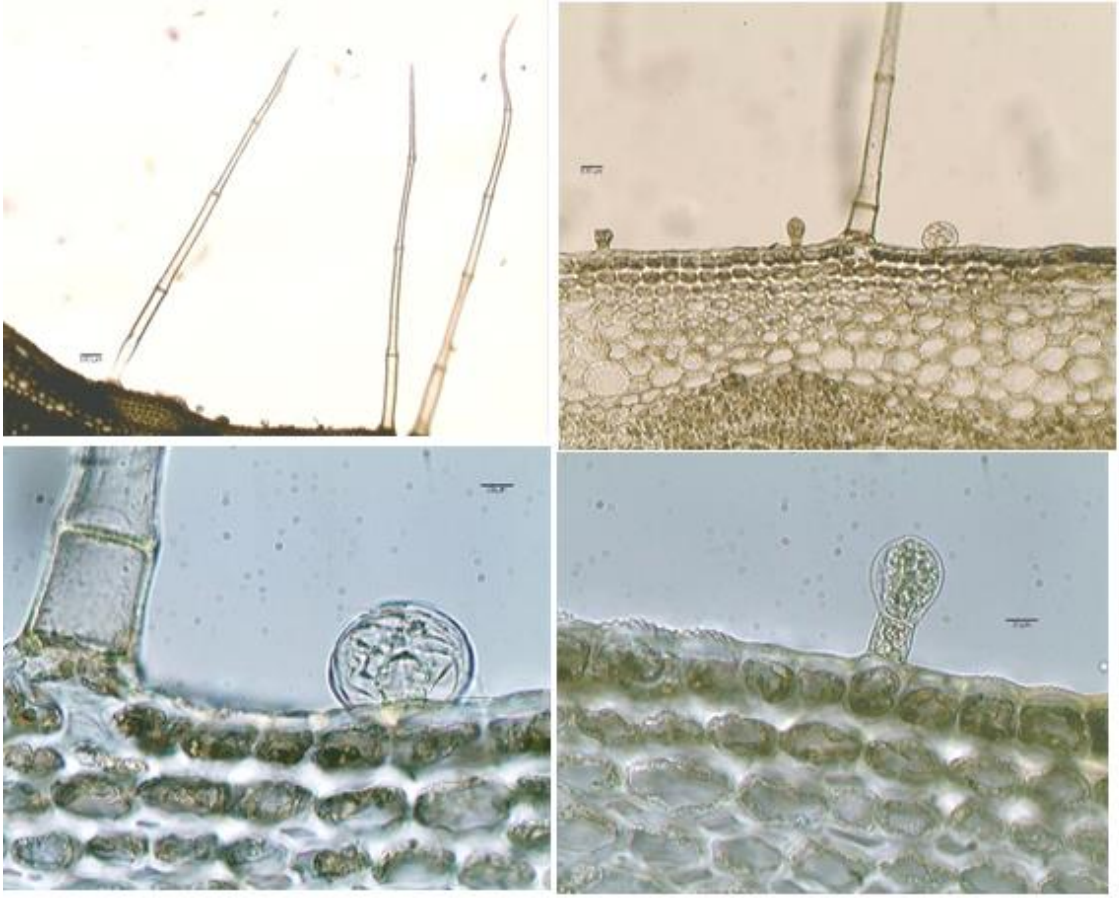
5.2.3. *L. quinquelobatus*

5.2.3.1. *Gövde*

Gövde tipik dört köşeli olup, en dışta üzeri düz ve kalınlaşmış bir kütikula tabakası ile örtülüdür. Epiderma, küçük oval veya dikdörtgenimsi hücrelerden oluşup alt ve üst çeper kalın yapıda ve tek sıra halindedir. Gövdede yaygın olarak bulunan örtü tüyleri basit, uçta düz veya hafif kıvrık, 3-5 hücrelidir. Salgı tüylerinin yanı sıra, kısa bir pedisel ve tek bir diskte düzenlenmiş 8 hücreden oluşan oval, düzleştirilmiş bir baş ile karakterize edilen peltat tüyler gözlenmiştir (Şekil 5.36). Korteks köşelerde, epiderma altında orta damarın dışa doğru çıkıntı yaptığı kısımlarda, 13-16 sıralı, genellikle çeperleri kalın olmayan, iyi gelişmiş kollenkimayı içerir. Köşeler arasında epiderma altında, korteksin dış kısmını oluşturan 8-10 sıralı kollenkima dokuları arasında 3-4 sıra, köşelerde ise 2-4 sıra klorenkima yer alır. Bu dokulardan sonra köşeler arasında, kollenkimanın altında 2-3 sıra halinde korteks parenkiması bulunur. Korteksin altında yer alan tek sıralı dikdörtgenimsi, düzenli dizilmiş hücrelerden oluşan ve nişasta taneleri depo eden endoderma bulunur. Endodermanın altında köşelerde ve köşe aralarında 1-2 sıra sklerenkimatik perisikl tabakası bulunmaktadır. Floem tabakası düzensiz ve ezilmiş hücrelerden oluşmaktadır. Kambiyum belirsizdir. Ksilemde trakeler yuvarlak veya oval şekilli, trakeitler çokgen şekillidir. Öz bölgesi boştur (Şekil 5.35).



Şekil 5.35. *L. quinquelobatus* gövde anatomisi; ku: kütikula, e: epidermis, öt: örtü tüyü, st: salgı tüyü, ko: kollenkima, kl: klorenkima p: parenkima, en: endodermis, ps: periskl, fl: floem, ks:ksilem, ö: öz.



Şekil 5.36. *L. quinquelobatus* gövdesinde örtü tüyü, salgı tüyü, peltat tüy

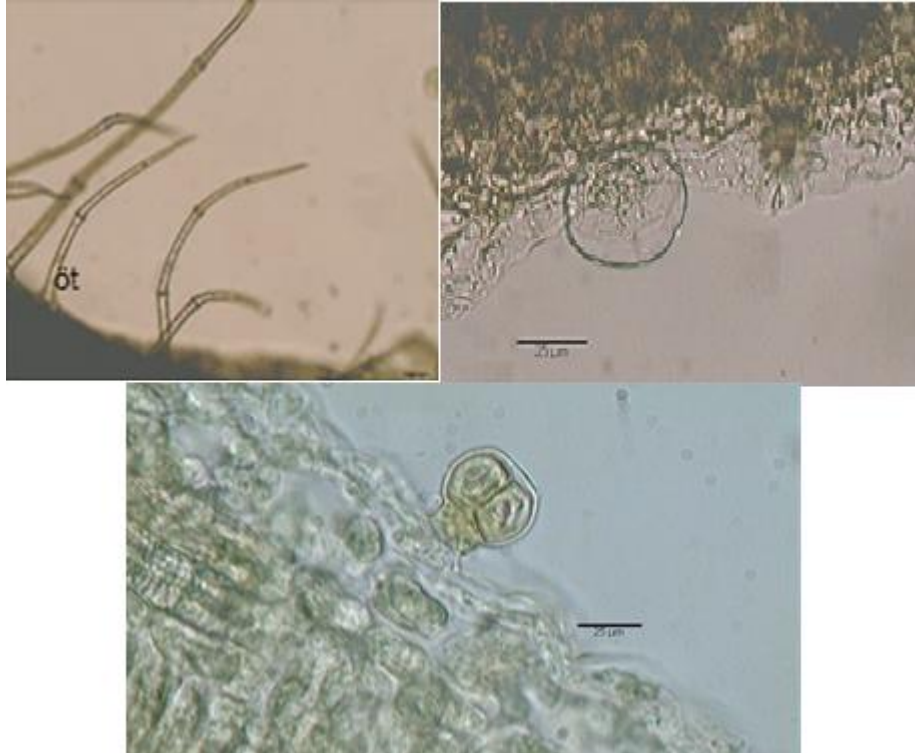
5.2.3.2. Yaprak

Yaprak enine kesitinde üst ve alt epidermis tek sıralı, dikdörtgenimsi hücrelerden oluşmuş olup, ince bir kütikula ile kaplıdır. Mezofil dorsiventraldir. Üst epiderma hücreleri, alt epiderma hücrelerinden daha büyük ve daha dalgalı çeperlidir (Şekil 5.40). Üst epidermanın altında, tek sıra halinde dizilmiş bol kloroplastlı palizat parenkiması ile onun altında uzanan 2-3 sıra sünger parenkiması yer alır. Orta damar bölgesinde üst yüze bakan tarafta 3-4 sıra, alt epidermise bakan tarafta ise 5-7 sıralı kollenkima hücresi bulunur. İletim demetleri kollateral tiptedir. Floem alt yüzeye, ksilem ise üst yüzeye bakan yöndedir. Floem 3-4 sıra ezilmiş hücrelerden oluşur. Ksilem küçük trakeal elemanlardan oluşmaktadır (Şekil 5.37). Tüyler, glandular (salgı) ve non-glandular (örtü) olmak üzere iki farklı tipte gözlenmektedir. Yaprakta yaygın olarak bulunan örtü tüyleri basit, uçta düz veya hafif kıvrık olup 1-3 hücrelidir. Örtü tüyleri her iki epidermada da bulunurken, alt epidermada daha yaygındır. Salgı tüyleri başı 1, sapı kısa 1-2 hücrelidir. Peltat tüylere daha çok alt epidermada rastlanmıştır (Şekil 5.38). Diasitik ve anomositik

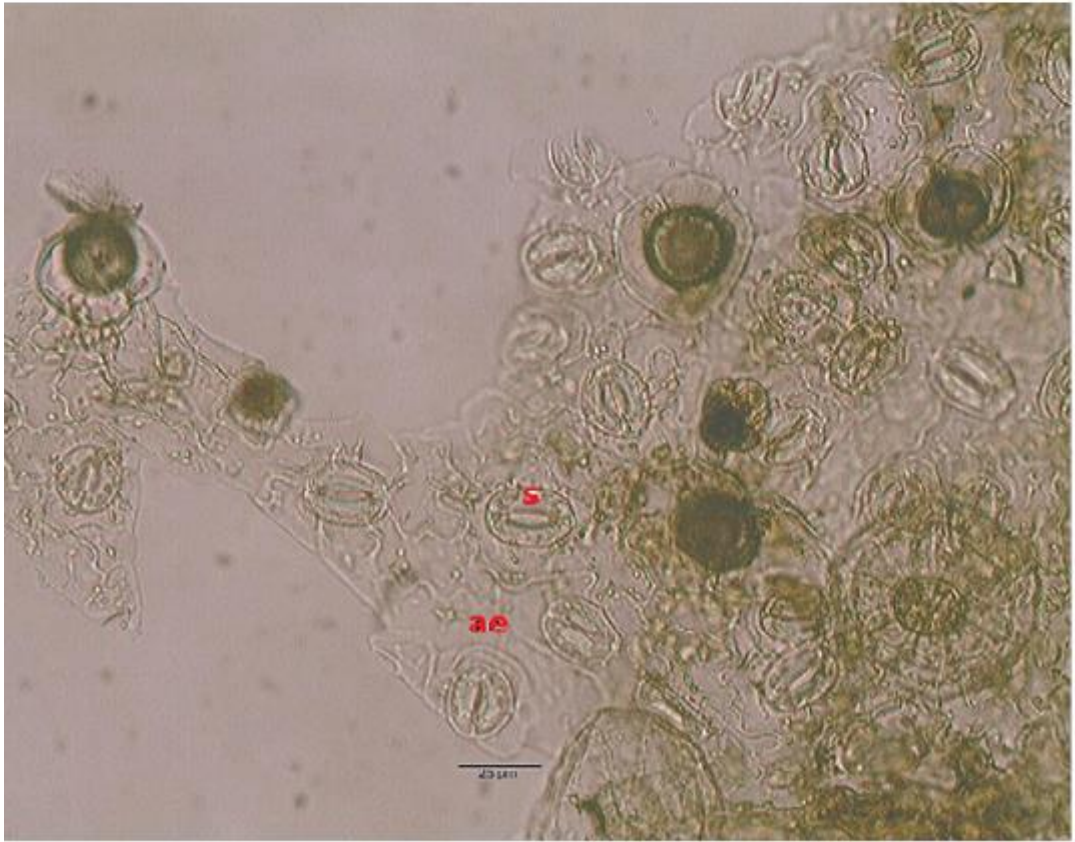
tipteki stomalar alt epidermada (hipostomatik) bulunur ve epiderma ile aynı seviyede veya biraz yukarıda yer alır (Şekil 5.39).



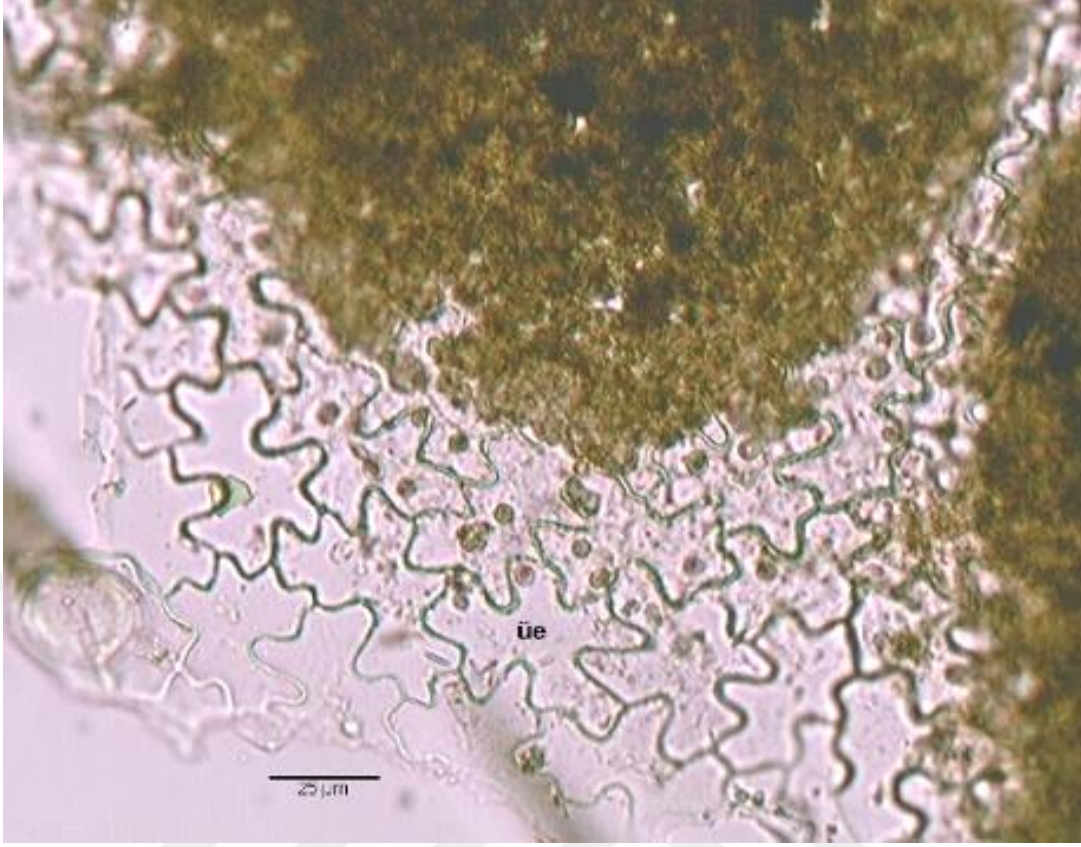
Şekil 5.37. *L. quinquelobatus* yaprak anatomisi; ku: kütikula, ue: üst epidermis, ae: alt epidermis, ko: kollenkima, pp: palizat parenkiması, sp: sünger parenkiması, id: iletim demeti öt: örtü tüyü, st: salgı tüyü.



Şekil 5.38. *L. quinquelobatus* yaprağında örtü tüyü, salgı tüyü, peltat tüy



Şekil 5.39. *L. quinquelobatus* yaprak alt yüz; ae: alt epidermis, s: stoma



Şekil 5.40. *L. quinquelobatus* yaprak üst yüz: üe: üst epidermis

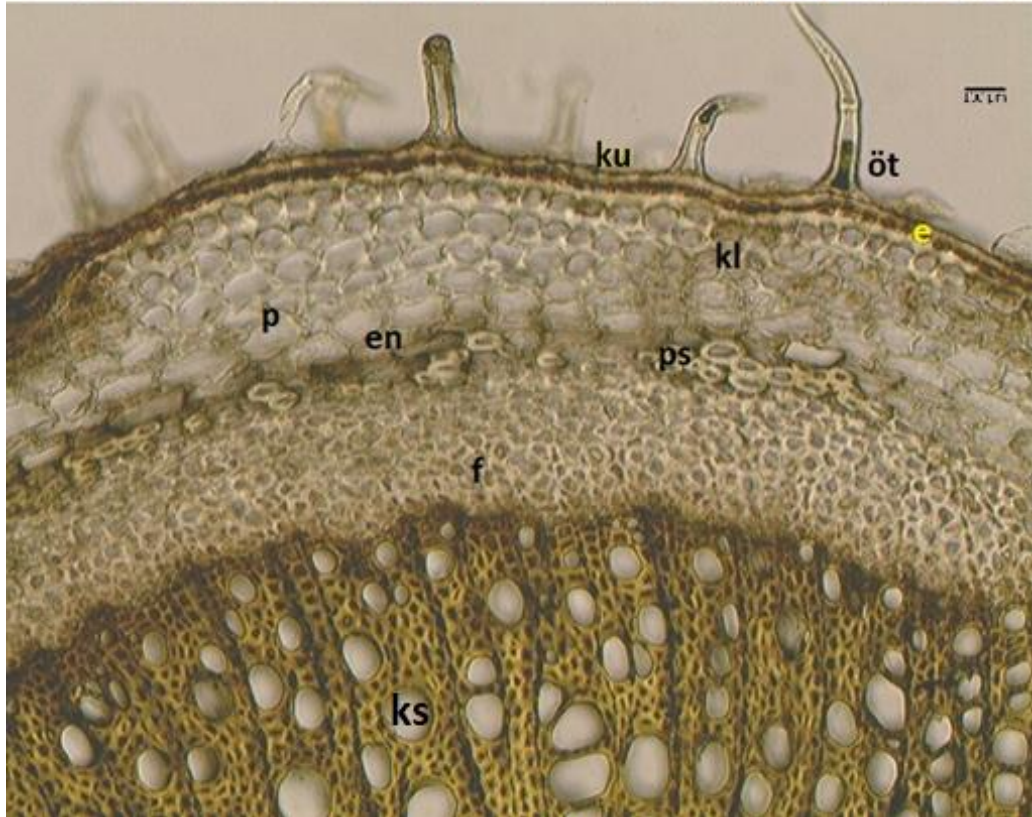
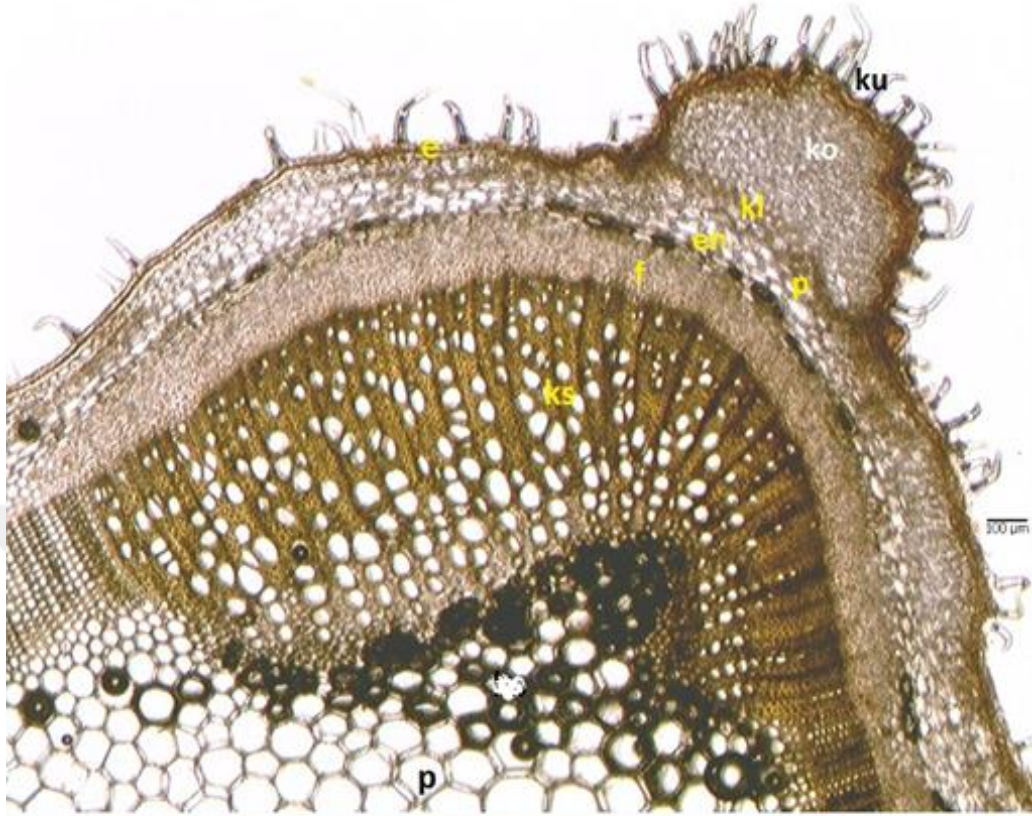
5.2.4. *L. persicus*

5.2.4.1. *Gövde*

Gövde tipik dört köşelidir. Epiderma tek sıra, oval, yuvarlakça veya dikdörtgen şeklinde hücrelerden oluşmaktadır. Üzeri kalın bir kütikula tabakası ile örtülüdür. Üst ve alt çeperleri yan çeperlere göre daha kalındır. Gövdede yoğun olarak bulunan örtü tüyleri basit, uçta düz veya hafif kıvrık, 1-2 hücrelidir. Salgı tüylerinin yanı sıra, kısa bir pedisel ve tek bir diskte düzenlenmiş 8 hücreden oluşan oval, düzleştirilmiş bir baş ile karakterize edilen peltat tüyler gözlenmiştir. Korteks köşelerde, epiderma altında orta damarın dışa doğru çıkıntı yaptığı kısımlarda, 13-16 sıralı, genellikle düzensiz çeperlerden oluşan, iyi gelişmiş kollenkimayı içerir. Köşeler arasında epiderma altında, korteksin dış kısmını oluşturan kollenkima dokuları arasında 2-3 sıra, köşelerde ise 1-2 sıra kloroplast içeren klorenkima tabakası yer alır. Bu dokulardan sonra kollenkimanın altında, 2-3 sıra ve köşelerde arasında 3-4 sıra yuvarlak-oval şekilli hücrelerden oluşan renksiz korteks parenkiması bulunur. Korteksin altında yer alan tek sıralı dikdörtgenimsi, düzenli dizilmiş parenkimatik hücrelerden oluşan endoderma bulunur. Periskl kesik kesik uzanan

sklerenkimatik hücrelerden oluşmuştur. İletim demetleri açık tiptir. Floem basık düzensiz çeperli hücrelerden oluşur. Kambiyum belirsizdir. Ksilemde trakeler yuvarlak veya oval şekilli, trakeitler çokgen şekillidir (Şekil 5.41). Öz bölgesi parçalanmış durumdadır.

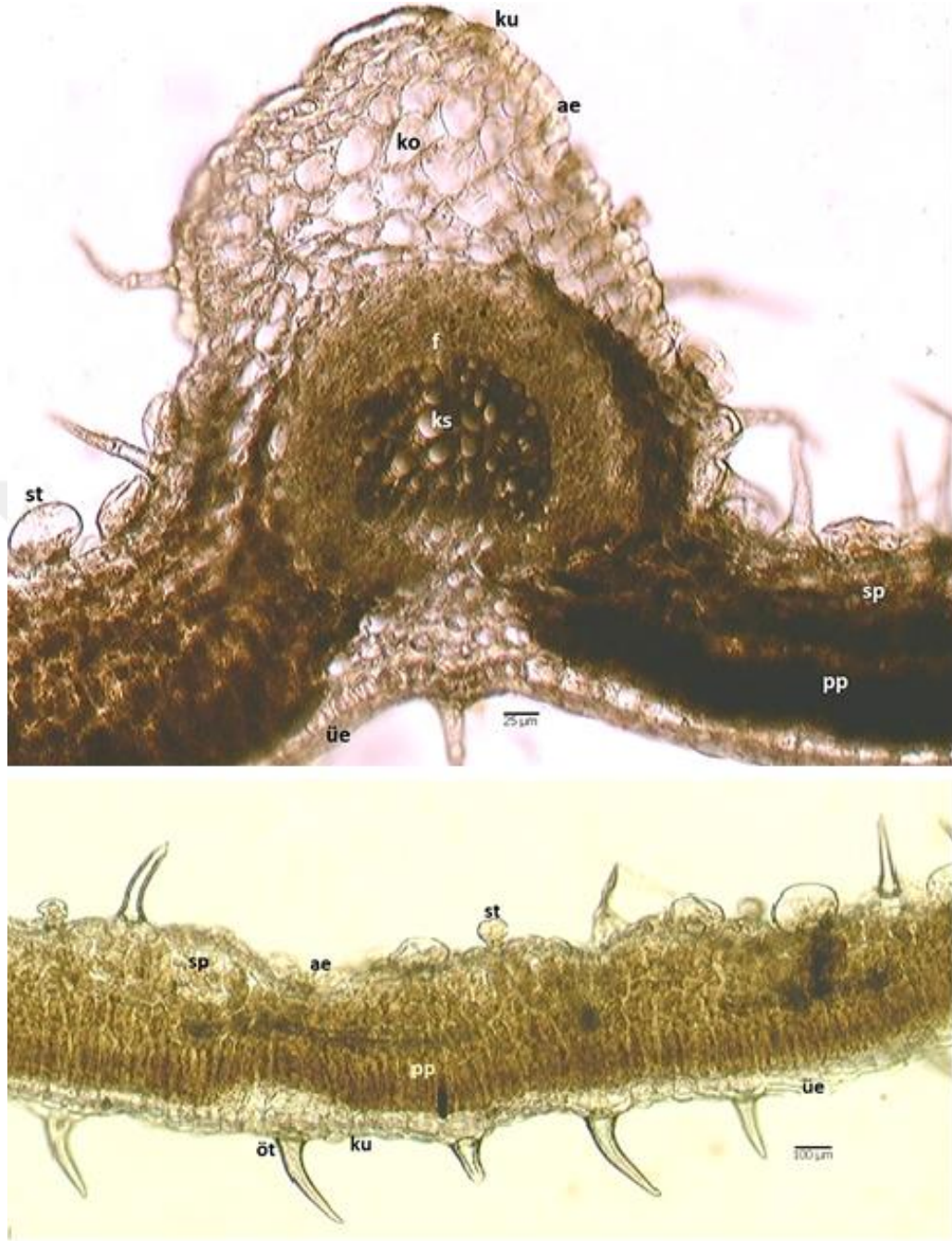




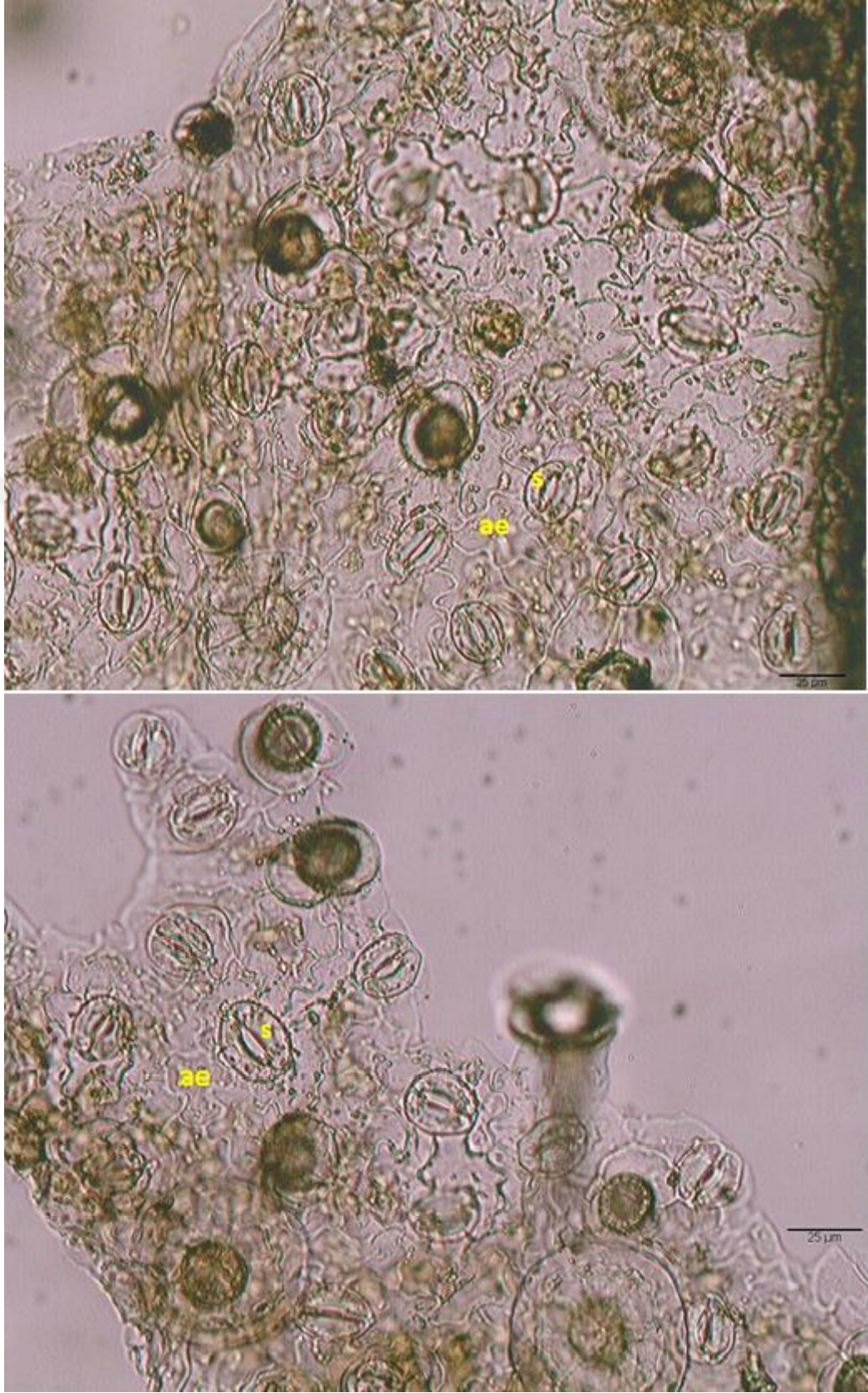
Şekil 5.41. *L. persicus* gövde anatomisi; ku: kütikula, e: epidermis, öt: örtü tüyü, st: salgı tüyü, ko: kollenkima, kl: klorkenima p: parenkima, en: endodermis, ps: periskl, fl: floem, ks: ksilem.

5.2.4.2. Yaprak

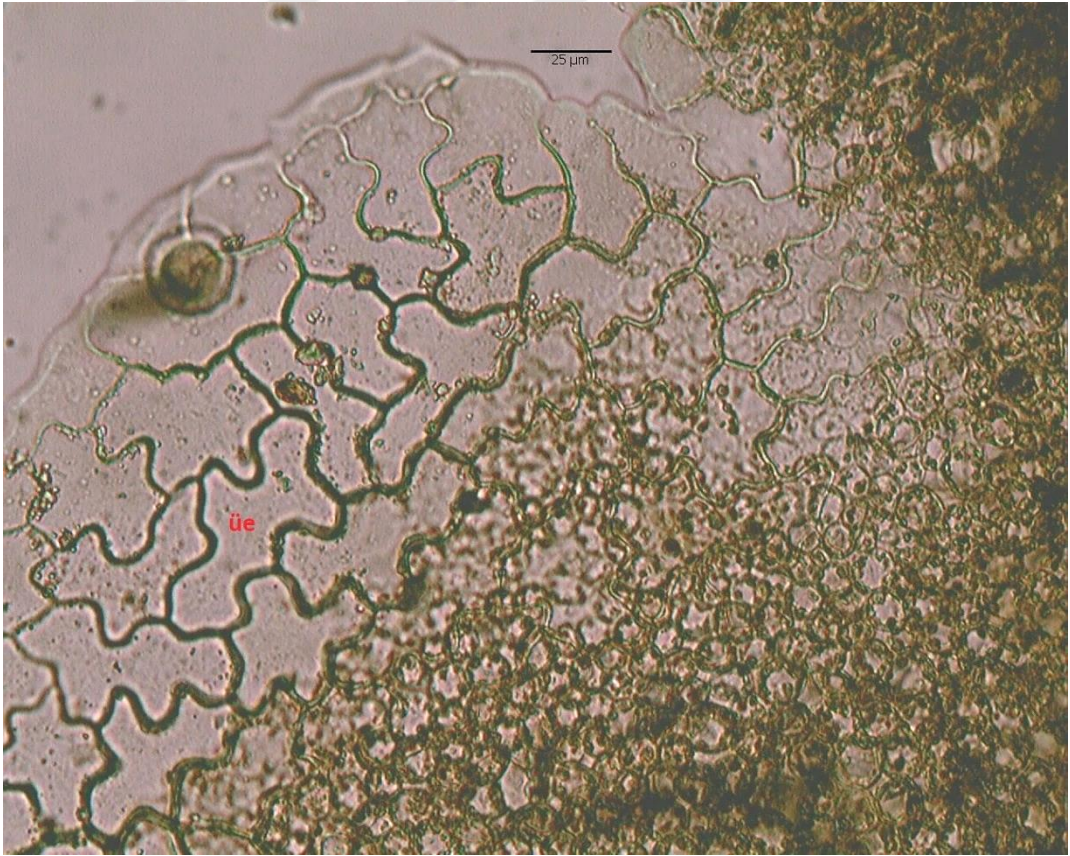
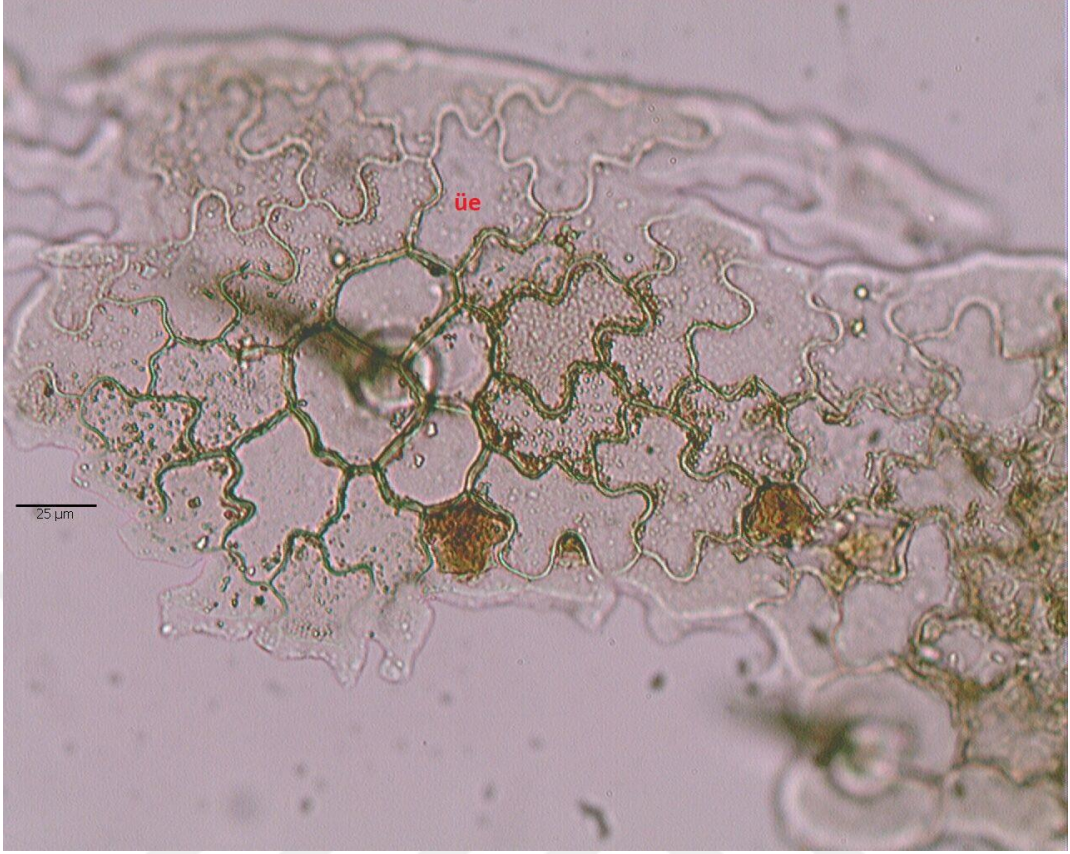
Orta damar ve damarlar arası bölgelerden alınan enine kesitlerde üstte ve altta tek sıra, dikdörtgen veya genelde oval şekilli hücrelerden oluşmuş epiderma tabakası bulunur. Hücrelerin dış çeperleri alt ve yanlara göre daha kalın olup, yaprak dorsiventraldir. Palizat parenkiması, sıkı dizilmiş tek sıralı ve silindirik şekilli; sünger parenkiması 2-3 sıralı, gevşek dizilmiş ve hava boşlukları yoğundur. Orta damar bölgesinde iletim demetinin olduğu bölgenin üst yüze bakan tarafında 5-6 sıra, alt epidermise bakan tarafta ise 3-4 sıralı kollenkima hücresi bulunur. Mezofilin medyan bölgesinde, kollateral vasküler demetleri gözlenmiştir. Ksilem üst epidemise, floem ise alt epidermise doğru yer alır (Şekil 5.42). Üst epiderma hücreleri, alt epiderma hücrelerinden daha büyük olup, çeperleri daha dalgalıdır (Şekil 5.44). Epiderma tabakasında örtü ve salgı tüylerine rastlanır. Tüyler, glandular (salgı) ve non-glandular (örtü) olmak üzere iki farklı tipte gözlenmektedir. Salgı tüyleri başı 1, sapı kısa 1-2 hücrelidir. Her iki epidermada da yoğun şekilde bulunan örtü tüyleri 1-3 hücreli olup, 2 hücreli olanlar daha yoğundur. Peltat tüyler alt epidermada çok daha yaygındır. Diasitik ve anomositik stomalar alt epidermada, epiderma ile aynı seviyede veya biraz yukarıda yer alır (Şekil 5.43).



Şekil 5.42. *L. persicus* yaprak anatomisi; ku: kutikula, üe: üst epidermis, ae: alt epidermis, ko: kollenkima, pp: palizat parenkiması, sp: sünger parenkiması, id: iletim demeti örtü tüyü, st: salgı tüyü.



Şekil 5.43. *L. persicus* yaprak alt yüz; ae: alt epidermis, s: stoma



Şekil 5.44. *L. persicus* yaprak üst yüz; ue: üst epidermis

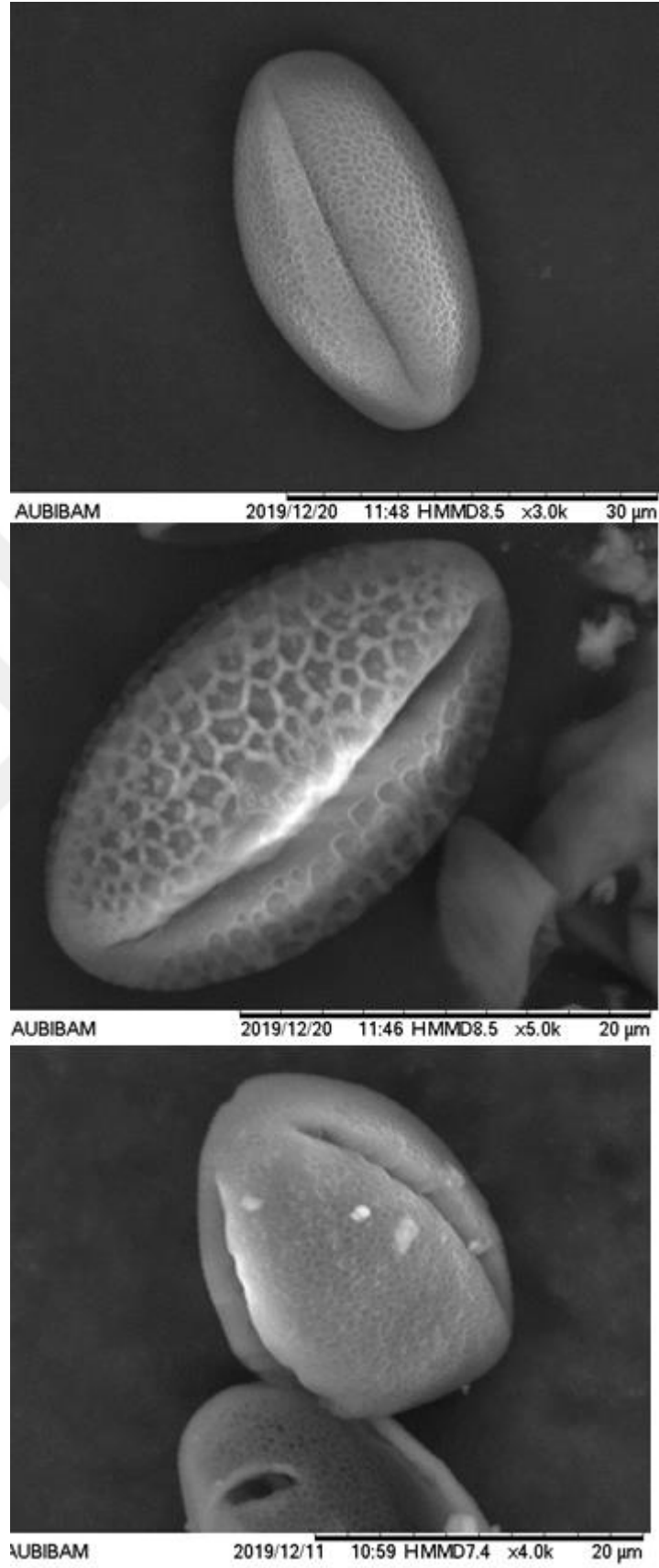
5.3. Palinolojik Bulgular

Polen tanelerinin incelenmesi, bitkiler arasındaki filogenetik ilişkilerin aydınlatılmasında kullanılabilecek önemli karakterleri tespit etmeyi sağlamaktadır. Polen taneleri; büyüklük, şekil ve apertür sayısı ve pozisyonu gibi değişken parametrelere sahip olup, yüzeyleri farklı yapıdadır. Polenlerin özellikleri diğer morfolojik veriler kadar önemli olduğundan, bitki sistematğinde yaygın olarak palinolojik çalışmalara yer verilmektedir. Lamiaceae ailesinin çeşitli cinslerinde polenlerin morfolojik özellikleri ile ilgili birçok çalışma yapılmıştır [26, 99, 332, 333]. Erdtman (1945) Lamioideae alt familyasının polenlerinin üç kolpuslu (trikolpat) ve binükleat olduğunu bildirmiştir [26]. Lamioideae alt familyasındaki birçok cinsle ilgili olarak çeşitli palinolojik çalışmalar bulunsada, *Leonurus* cinsinin polen özelliklerini ortaya koyan kapsamlı bir araştırmaya rastlanmamıştır.

Bu çalışmada SEM kullanılarak, Türkiye’de yetişen 4 türün polen ornamentasyonları ilk kez ortaya konulmuştur. Polenler radyal simetridi, isopolar, trikolpat ve eliptik olup, polen şekli prolat, ornamentasyon ise retikulattır.

5.3.1. *L. cardiaca*

Polenler radyal simetridi, isopolar, trikolpat, eliptiktir. Polar eksen 23.1-34.6 µm, ekvatorial eksen 16.2-19.2 µm. P/E oranı 1.39-1.80 µm, polen şekli prolattır. Kolpus (yarık) dar, uzun ve sınırları belirgin olup, ornamentasyon retikulattır (Şekil 5.45).



Şekil 5.45. *L. cardiaca* polenleri SEM görüntüsü

5.3.2. *L. glaucescens*

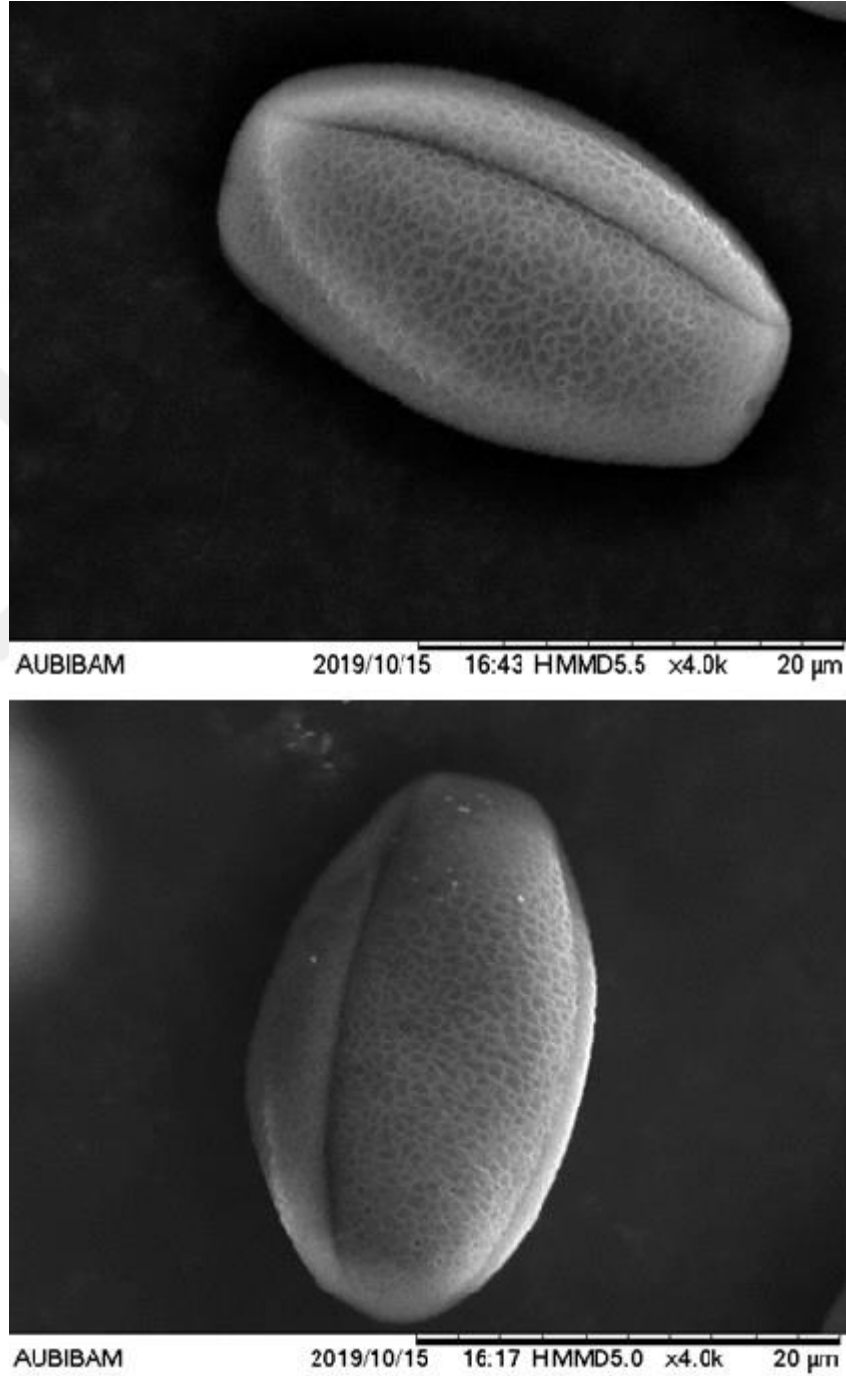
Polenler radyal simetrlili, isopolar, trikolpat, eliptiktir. Polar eksen 29.4-33.0 μm , ekvatorial eksen 16.9-18.3 μm 'dir. P/E oranı 1.73-1.80 μm , polen şekli prolattır. Kolpus dar, uzun olup, ornamentasyon retikulattır (Şekil 5.46).



Şekil 5.46. *L. glaucescens* polenleri SEM görüntüsü

5.3.3. *L. quinquelobatus*

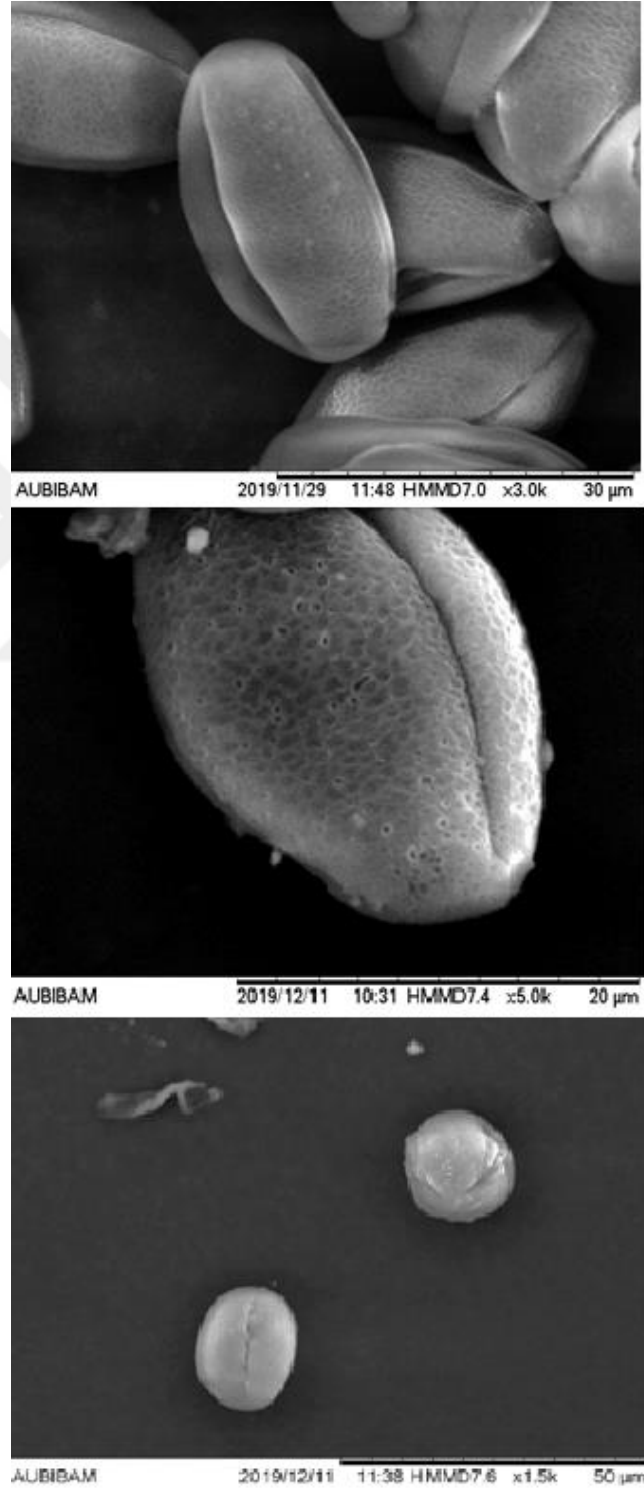
Polenler radyal simetridir, isopolar, trikolpat, eliptiktir. Polar eksen 26.2-29.1 μm , ekvatorial eksen 15.5-14.6 μm 'dir. P/E oranı 1.69-1.99 μm , polen şekli prolattır. Kolpus dar, uzun olup, ornamentasyon retikulattır (Şekil 5.47).



Şekil 5.47. *L. quinquelobatus* polenleri SEM görüntüsü

5.3.4. *L. persicus*

Polenler radyal simetrlili, isopolar, trikolpat, eliptiktir. Polar eksen 29.9-31.7 μm , ekvatorial eksen 16.8-16.6 μm . P/E oranı 1.77-1.90 μm , polen şekli prolattır. Kolpus dar, uzun olup, ornamentasyon retikulattır (Şekil 5.48).



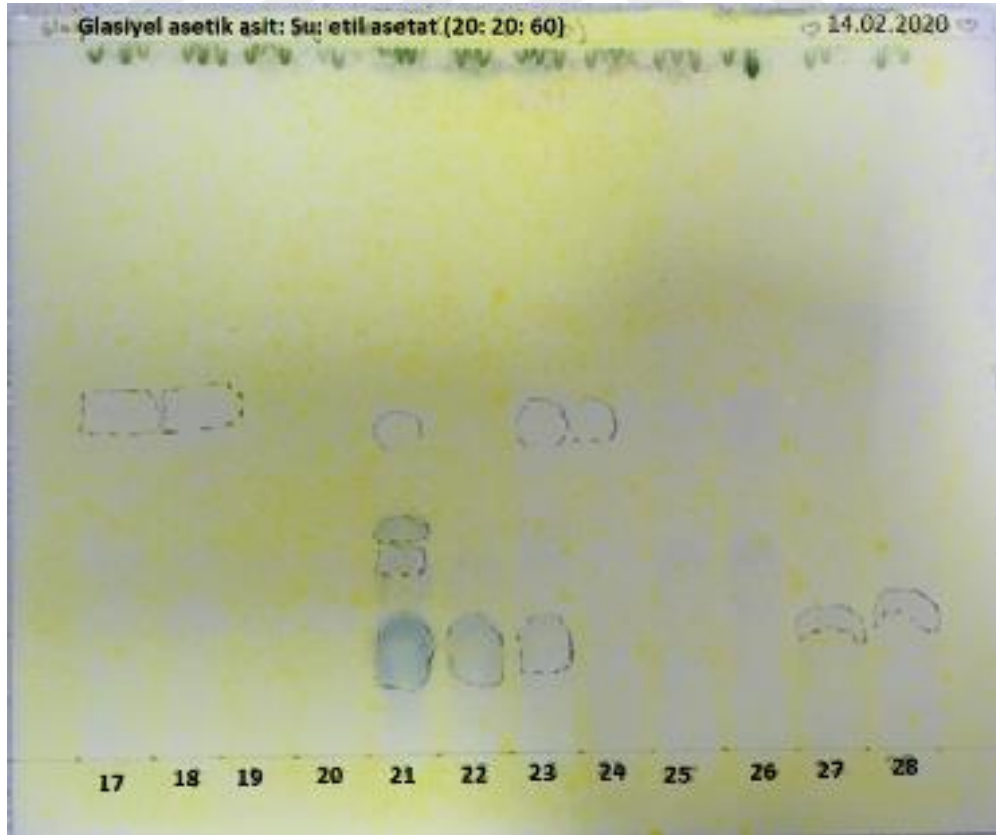
Şekil 5.48. *L. persicus* polenleri SEM görüntüsü

5.4. Avrupa Farmakopesi'nde Belirtilen Yöntemler Kullanılarak Yapılan Analizlere İlişkin Bulgular

Leonuri cardiaca herba (Ph. Eur.) ile ilgili olarak Avrupa Farmakopesi'nde [35] yer alan analiz yöntemleri doğrultusunda deneyler yürütülmüştür. Tüm lokalitelerden toplanan bitkilerin toprak üstü kısımları toz edilip, farmakopede önerilen metoda göre hazırlanarak, ince tabaka kromatografisi (İTK) yöntemi kullanılmış ve farmakopede belirtilen bantlar ile elde edilen sonuçlar karşılaştırılmıştır. Ayrıca, yine Avrupa Farmakopesi'nde önerilen metot ile flavonoit tayini için, her bitki örneğinden stok solüsyonu, test solüsyonu ve kontrol solüsyonu hazırlanmıştır.

5.4.1. İnce tabaka kromatografisi (İTK) ile analiz

Türlerin kurutulmuş topraküstü kısımlarından farmakopeye göre hazırlanan ekstraktların karşılaştırılması amacıyla ince tabaka kromatografisi (İTK) kullanılmıştır. Deney sonuçları Avrupa Farmakopesi [35] verileri ile karşılaştırılarak değerlendirilmiştir (Şekil 5.49).



Şekil 5.49. İTK sonuçları

Elde edilen bulgulara göre, 21,22 ve 23 kodlu örneklerin içerik olarak birbirlerine yakın oldukları, ana bileşenlerinin benzer olabileceği, 27 kodlu örneğin de bu üç örneğe benzer içerikte olabileceği gözlenmiştir (Şekil 5.48). 21, 22 ve 23 kodlu örnekler *L. cardiaca* türüne ait olup, birbirlerine yakın olan lokalitelerden toplanmış örneklerdir. Bunlara benzerlik gösteren 27 kodlu örnek de *L. cardiaca* türü olup, farklı ve daha uzak lokaliteye ait bir örnektir. 17, 18 kodlu örneklerin içerik olarak birbirine yakın olabileceği değerlendirilmiştir ki bu örnekler *L. quinquelobatus* türünün farklı lokalitelerden toplanmış örnekleridir. Sonuç olarak, aynı türlere ait farklı lokaliteden toplanmış olan örneklerin içeriklerinin benzer olabileceği gözlenmiştir. Bunlara ek olarak, Avrupa Farmakopesi'nde *L. cardiaca*'da da belirttiği gibi, bitkilerde iridoitlerin varlığını gösteren gri-mavi bantların oluşumu da gözlenmiştir.

5.4.2. Flavonoit tayini

Avrupa Farmakopesi'nde Leonuri cardiaca herba ile ilgili olarak bitkinin toprak üstü kısımlarının en az %0.2 oranında flavonoit içermesi gerektiği belirtildiği için, farmakopedeki yöntemeye göre her bitki örneğinden stok solüsyonu, test solüsyonu ve kontrol solüsyonu hazırlanmıştır. Hazırlanan numuneler 30 dk bekletildikten sonra 425 nm'de okuma yapılmıştır (Şekil 5.50). Toplam flavonoit yüzdesini hesaplamak için aşağıdaki formül kullanılmıştır. Bitkilerin absorbans değerleri ve flavonoit yüzdeleri Tablo 5.9'da verilmiştir.

$$\frac{A \times 1.25}{m} \quad (5.1)$$

A: 425nm'deki absorbans

m: incelenecek maddenin kütlesi (gram olarak)

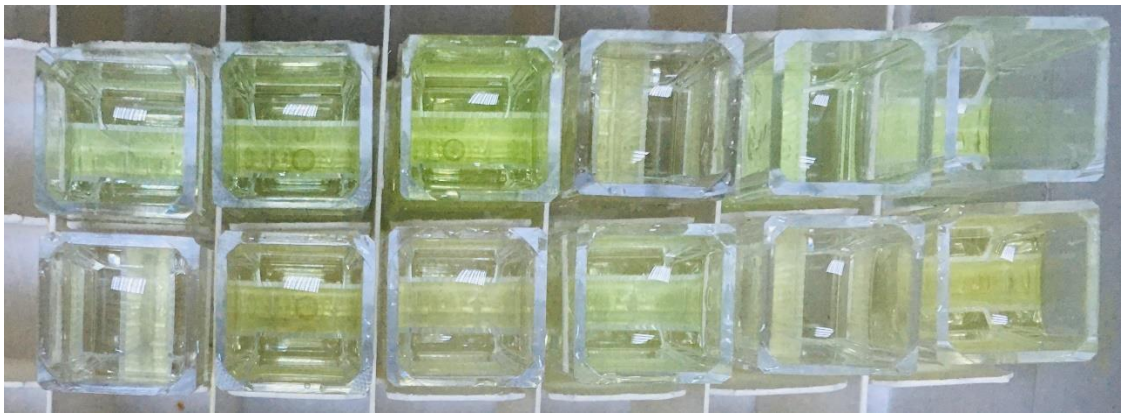
Tablo 5.9. Bitkilerin absorbans değerleri ve flavonoit yüzdeleri

Bitki	A	% Flavonoit
<i>L. quinquelobatus</i> (NS 17)	0.214	0.26
<i>L. quinquelobatus</i> (NS 18)	0.124	0.15
<i>L. glaucescens</i> (NS 19)	0.284	0.35
<i>L. glaucescens</i> (NS 20)	0.104	0.13
<i>L. cardiaca</i> (NS 21)	0.196	0.24
<i>L. cardiaca</i> (NS 22)	0.267	0.33
<i>L. cardiaca</i> (NS 23)	0.142	0.17
<i>L. cardiaca</i> (NS 24)	0.114	0.14
<i>L. persicus</i> (NS 25)	0.255	0.31
<i>L. glaucescens</i> (NS 26)	0.192	0.24
<i>L. cardiaca</i> (NS 27)	0.170	0.21
<i>L. cardiaca</i> (NS 28)	0.131	0.16

A: Absorbans

425 nm’de yapılan okumalarda, 7 farklı lokaliteden (NS17, NS19, NS21, NS22, NS25, NS26, NS27) toplanan bitkide flavonoit oranı %0.2’nin üzerinde bulunmuştur. Flavonoit yüzdesi en fazla olan rnekler, NS19 kodlu *L. glaucescens* (%0.35), NS 22 kodlu *L. cardiaca* (%0.33), ve NS25 kodlu *L. persicus* (%0.31)’tur. Ayrıca NS21 ve NS 27 kodlu *L. cardiaca* (%0.24-%0.21) ve NS26 kodlu *L. glaucescens* (%0.24) türlerinde de flavonoit yüzdesi %0.2’nin üzerinde bulunmuştur.

Elde edilen bulgular değerlendirildiğinde, *Leonurus* cinsinin Türkiye’de yetişen 4 türüne ait flavonoit oranının %0.2’nin üzerinde olduğu örnekler tespit edilmiştir (Tablo 5.9).



şekil 5.50. Toplam flavonoit miktar tayini

5.5. Ekstraksiyon Çalışmaları ve Ekstre Verimleri

Ekstrelerin verimleri kuru bitkisel materyal üzerinden hesaplanarak Tablo 5.10’da verilmiştir.

Tablo 5.10. *Leonurus türlerinden elde edilen ekstrelerin verimleri*

Bitki	Verim		
	%70 Etanol	Metanol	İnfüzyon
<i>L. quinquelobatus</i> (NS 17)	11	6.6	7.8
<i>L. quinquelobatus</i> (NS 18)	13.6	13.3	8
<i>L. glaucescens</i> (NS 19)	13.3	10.2	12
<i>L. glaucescens</i> (NS 20)	10	10.3	13.6
<i>L. cardiaca</i> (NS 21)	9.3	13.3	13.8
<i>L. cardiaca</i> (NS 22)	12	10.2	12
<i>L. cardiaca</i> (NS 23)	12	10.4	13.3
<i>L. cardiaca</i> (NS 24)	10	10.1	12
<i>L. persicus</i> (NS 25)	10.6	10.5	15.6
<i>L. glaucescens</i> (NS 26)	13	10.2	15.6
<i>L. cardiaca</i> (NS 27)	9.3	6.6	9.8
<i>L. cardiaca</i> (NS 28)	12	6.5	15.6
g ekstre /100 g bitki			

5.6. Ekstrelerin Analizleri

5.6.1. Antioksidan aktiviteye ilişkin bulgular

Antioksidan aktivitenin *in vitro* olarak belirlenmesinde, ekstrelerin antioksidan etkilerini belirlemek için DPPH[•] radikalini süpürücü etki ve Troloks eşdeğeri antioksidan kapasiteyi belirlemek amacıyla ABTS^{•+} radikalini süpürücü etki araştırılmıştır. Antioksidan aktivitelere ilişkin bulgular Tablo 5.11’de verilmiştir.

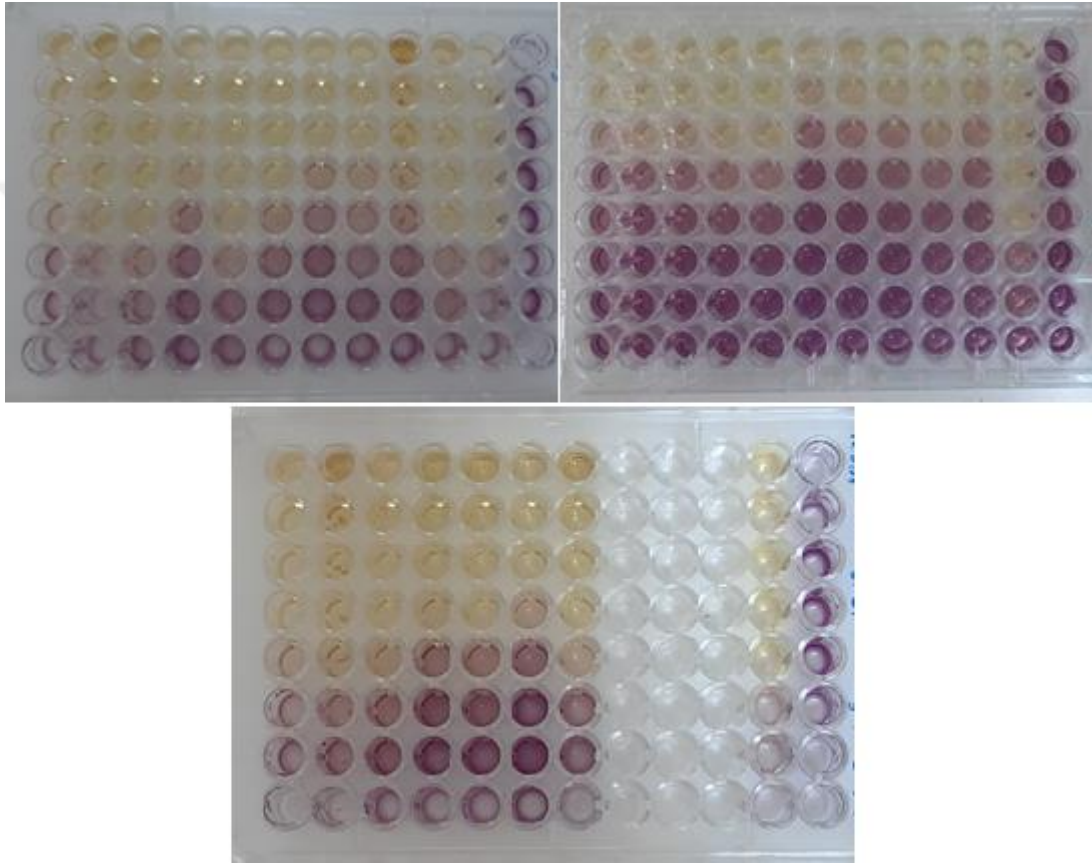
Tablo 5.11. Ekstrelerin antioksidan aktivitelerine ilişkin bulgular

Kod	DPPH [•] (IC ₅₀ mg/mL)	TEAK (mM)
NS 17E (<i>L. quinquelobatus</i> etanol ekstresi)	0.218±0.110	1.535± 0.14
NS 17M (<i>L. quinquelobatus</i> metanol ekstresi)	0.552±0.033	0.646± 0.04
NS17INF (<i>L. quinquelobatus</i> infüzyon)	0.198± 0.056	1.179± 0.04
NS 18E (<i>L. quinquelobatus</i> etanol ekstresi)	0.166±0.026	1.468± 0.12
NS18M (<i>L. quinquelobatus</i> metanol ekstresi)	0.405±0.254	0.630± 0.04
NS18INF (<i>L. quinquelobatus</i> infüzyon)	0.171±0.02	1.295± 0.01
NS 19E (<i>L. glaucescens</i> etanol ekstresi)	0.189±0.034	1.709 ± 0.03
NS 19M (<i>L. glaucescens</i> metanol ekstresi)	0.391±0.102	0.901± 0.06
NS 19INF (<i>L. glaucescens</i> infüzyon)	0.167±0.021	0.967± 0.06
NS 20E (<i>L. glaucescens</i> etanol ekstresi)	0.133±0.019	2.53± 0.01
NS 20M (<i>L. glaucescens</i> metanol ekstresi)	0.560±0.212	0.778± 0.02
NS 20INF (<i>L. glaucescens</i> infüzyon)	0.197±0.012	1.04± 0.02
NS 21E (<i>L. cardiaca</i> etanol ekstresi)	0.117±0.016	2.731± 0.01
NS 21M (<i>L. cardiaca</i> metanol ekstresi)	0.256±0.256	0.992± 0.05
NS 21INF (<i>L. cardiaca</i> infüzyon)	0.200±0.024	1.15± 0.04
NS 22E (<i>L. cardiaca</i> etanol ekstresi)	0.315±0.007	1.246± 0.01
NS 22M (<i>L. cardiaca</i> metanol ekstresi)	0.763±0.165	0.545± 0.04
NS 22INF (<i>L. cardiaca</i> infüzyon)	0.454±0.136	0.256± 0.02
NS 23E (<i>L. cardiaca</i> etanol ekstresi)	0.232±0.115	1.324± 0.05
NS 23M (<i>L. cardiaca</i> metanol ekstresi)	0.721±0.088	0.539± 0.04
NS 23INF (<i>L. cardiaca</i> infüzyon)	0.217±0,028	0.874± 0.07
NS 24E (<i>L. cardiaca</i> etanol ekstresi)	0.236±0.049	0.850± 0.04
NS 24M (<i>L. cardiaca</i> metanol ekstresi)	0.409±0.114	0.338±0.04
NS 24INF (<i>L. cardiaca</i> infüzyon)	0.282±0.042	0.795± 0.03
NS 25E (<i>L. persicus</i> etanol ekstresi)	0.182±0.046	2.251± 0.05
NS 25M (<i>L. persicus</i> metanol ekstresi)	0.629±0.037	0.633± 0.03
NS 25INF (<i>L. persicus</i> infüzyon)	0.232±0.030	1.207± 0.03
NS 26E (<i>L. glaucescens</i> etanol ekstresi)	0.268±0.060	1.437± 0.02
NS 26M (<i>L. glaucescens</i> metanol ekstresi)	0.467±0.02	0.712± 0.006
NS 26INF (<i>L. glaucescens</i> infüzyon)	0.155±0.007	0.785± 0.03
NS 27E (<i>L. cardiaca</i> etanol ekstresi)	0.227±0.045	1.168± 0.02
NS 27M (<i>L. cardiaca</i> metanol ekstresi)	1.181±0.197	0.304± 0,04
NS 27INF (<i>L. cardiaca</i> infüzyon)	0.206±0.002	0.747± 0.02
NS 28E (<i>L. cardiaca</i> etanol ekstresi)	0.214±0.035	1.551± 0.05
NS 28M (<i>L. cardiaca</i> metanol ekstresi)	0.645±0,093	0.527± 0.05
NS 28INF (<i>L. cardiaca</i> infüzyon)	0.198±0,051	0.899± 0.007
GA	0.003±0.001	2.926±0.03

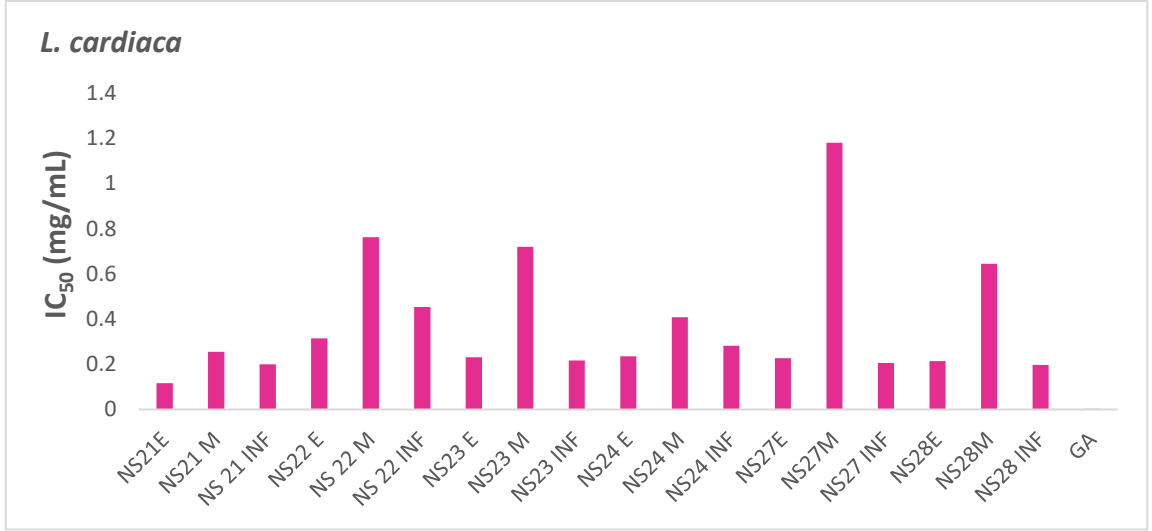
GA: Gallik asit, E: Etanol, M: metanol, INF: infüzyon

5.6.1.1. 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH') radikalini süpürücü etki tayini

Ekstrelerin radikal süpürücü etkileri, stabil serbest radikal DPPH''ın metanoldeki çözeltisi ile muamele edilerek, Kumarasamy ve diğerlerinin [327] yöntemi uygulanarak araştırılmıştır (Şekil 5.51). IC₅₀ değerleri, radikalın %50'sini süpürebilecek gerekli konsantrasyon olarak tanımlanır. Ekstrelerin DPPH' radikal süpürücü etkileri hazırlanan doğrusal olmayan eğriler kullanılarak hesaplanmış ve sonuçlar Tablo 5.11'de verilmiştir.

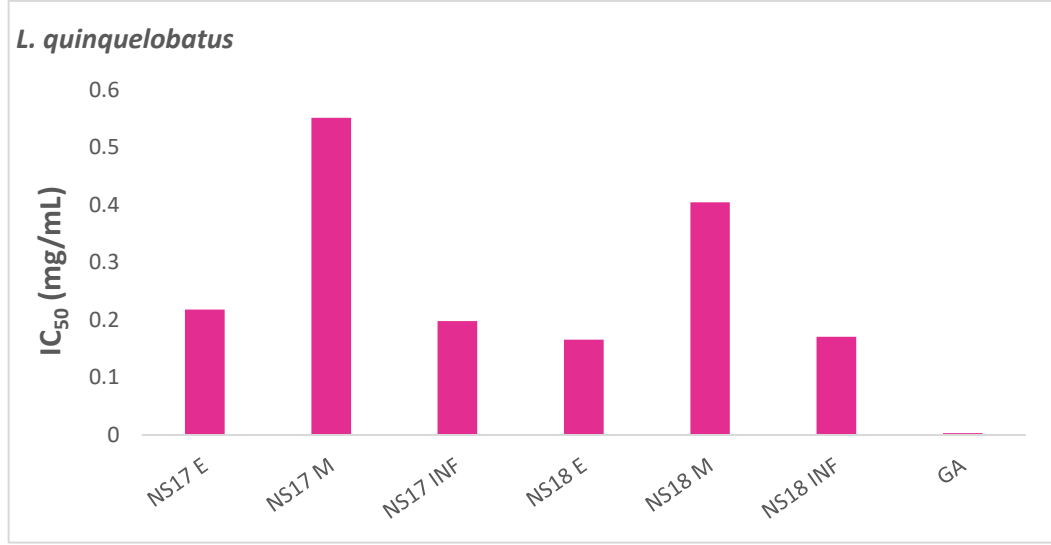


Şekil 5.51. Leonurus ekstrelerinin DPPH' radikalini süpürme etkisinin tespiti



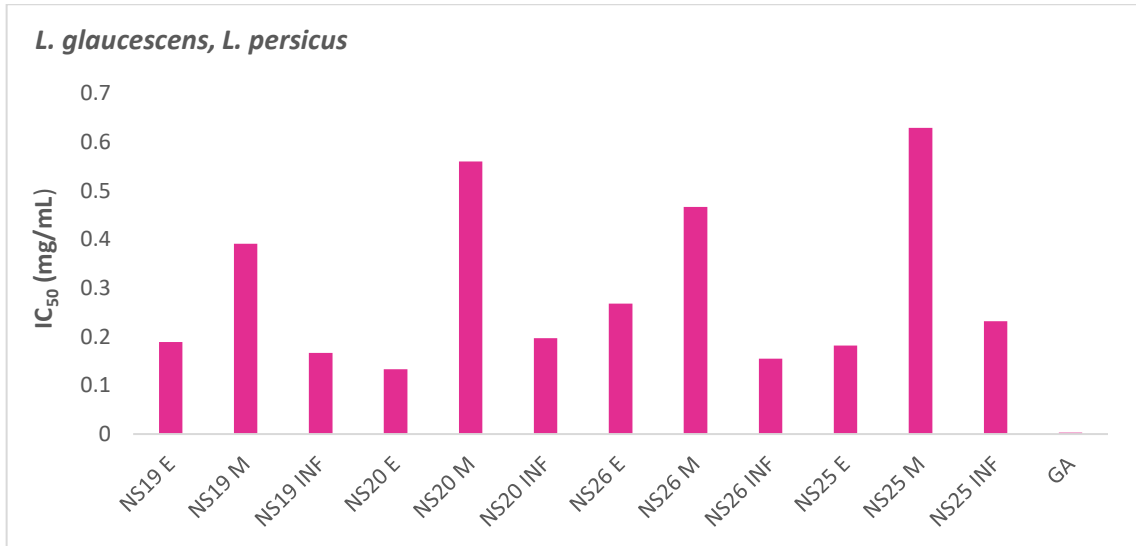
Şekil 5.52. *L. cardiaca* ekstrelerinin ve standartın DPPH' radikalini süpürme kapasiteleri

L. cardiaca ekstreleri ile yapılan çalışmalar sonucunda, tüm ekstrelerin pozitif kontrol olarak kullanılan gallik asit (IC₅₀ 0.003 mg/mL)'ten düşük radikal süpürücü etki gösterdiği görülmüştür. Elde edilen bulgular incelendiğinde, test edilen *L. cardiaca* örneklerinden NS 21E kodlu ekstrede (IC₅₀ 0.117 mg/mL) en yüksek etki gözlenmiş olup, diğerlerine göre daha aktif olarak bulunmuştur. Genel olarak bu türün infüzyon örnekleri ve etanol ekstrelerinde yakın değerler gözlenirken, metanol ekstrelerine göre daha etkili oldukları belirlenmiştir. Farklı lokalitelerden toplanan *L. cardiaca* türüne ait ekstrelerin DPPH' radikalini süpürücü etkileri sırasıyla şu şekilde sıralanmaktadır: NS 21E> NS 28 INF> NS 21INF> NS 27 INF> NS 28E> NS 23INF> NS 27E> NS 23E> NS 24E> NS 21 M> NS24INF> NS 22E> NS 24M> NS 22INF> NS 28M> NS 23M> NS 22M> NS 27M (Şekil 5.52).



Şekil 5.53. *L. quinquelobatus* ekstralarının ve standartların DPPH[•] radikalini süpürme kapasiteleri

Elde edilen veriler incelendiğinde, *Leonurus quinquelobatus* türünde NS 18E kodlu ekstre (IC₅₀ 0.166 mg/mL) diğerlerine göre daha aktif iken, her iki lokalitenin de metanol ekstralarının etanol ve infüzyon örneklerine kıyasla daha zayıf etkili olduğu belirlenmiştir. *L. quinquelobatus* türüne ait ekstraların DPPH[•] radikalini süpürücü etkileri sırasıyla şu şekilde sıralanmıştır: NS 18E> NS 18INF> NS 17INF> NS 17E> NS 18M> NS 17M (Şekil 5.53).



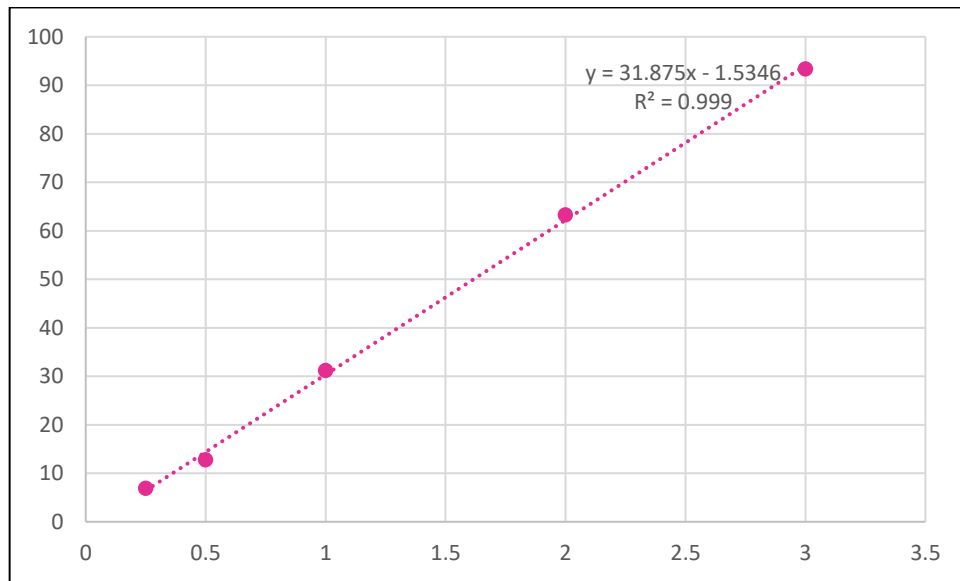
Şekil 5.54. *L. glaucescens* ve *L. persicus* ekstralarının ve standartların DPPH[•] radikalini süpürme kapasiteleri

Bulgular incelendiğinde, *L. glaucescens* ve *L. persicus* türlerinden hazırlanan ekstrelerin, pozitif kontrol olarak kullanılan galik asitten (IC_{50} 0.003 mg/mL) düşük radikal süpürücü etki gösterdiği görülmüştür. *L. glaucescens* için, NS 20E kodlu etanol ekstresi (IC_{50} 0.133 mg/mL) diğer ekstrelere göre daha aktif olarak bulunmuş olup, infüzyon örneklerinin etanol ekstrelerine yakın değerlerde olduğu gözlenmiştir. *L. glaucescens* türüne ait ekstrelerin DPPH[•] radikalini süpürücü etkileri sırasıyla şu şekilde sıralanmıştır: NS 20E> NS 26INF> NS 19INF> NS 19E> NS 20INF> NS 26E> NS 19M> NS 26M> NS 20M (Şekil 5.54).

L. persicus örneklerinde de etanol ekstresinde (NS 25E) en yüksek etki (IC_{50} 0.182 mg/mL) belirlenmiştir. Ekstrelerin DPPH[•] radikalini süpürücü etkileri sırasıyla şu şekilde sıralanmıştır: NS 25E> NS 25INF> NS 25M (Şekil 5.54).

5.6.1.2. ABTS^{•+} radikalini süpürücü etkiye ilişkin bulgular

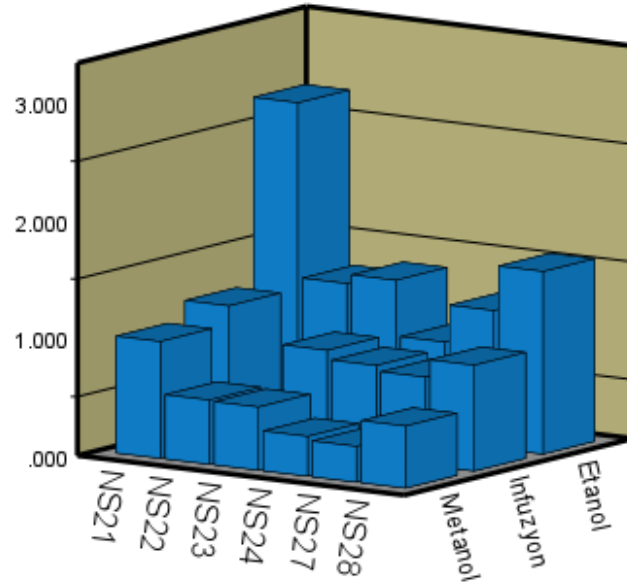
Leonurus türleri ekstrelerinin antioksidan etkisi, serbest ABTS^{•+} radikalini süpürme etkisine göre spektrofotometrik olarak tayin edilmiştir. Numunelerin antioksidan etkileri Troloks'un (standart madde) ABTS^{•+} radikalini süpürme etkisi ile karşılaştırılarak saptanmıştır. Numunelerin standart olarak kullanılan Troloks eşdeğeri antioksidan kapasiteleri Tablo 5.12, 5.13 ve 5.14'te verilmiştir. Hesaplamalarda kullanılan Troloks maddesinin 3; 2; 1; 0.5; 0.25 mM konsantrasyonlarında hazırlanan çözeltilerden elde edilen kalibrasyon eğrisi ve eğri denklemi Şekil 5.55'te gösterilmiştir. 2.5 mg/mL konsantrasyonda hazırlanan örnekler, Troloks ile aynı koşullarda çalışılmıştır.



Şekil 5.55. Troloks kalibrasyon eğrisi ve denklemi

Tablo 5.12. *L. cardiaca* ekstrelerinin Troloks'a eşdeğer antioksidan kapasiteleri

<i>L. cardiaca</i>		TEAK (mM)	
Kod	Etanollü ekstre	Metanollü ekstre	İnfüzyon
NS21	2.731± 0.01	0.992± 0.05	1.15± 0.04
NS22	1.246± 0.01	0.545± 0.04	0.256± 0.02
NS23	1.324± 0.05	0.539± 0.04	0.874± 0.07
NS24	0.850± 0.04	0.338±0.04	0.795± 0.03
NS27	1.168± 0.02	0.304± 0.04	0.747± 0.02
NS28	1.551± 0.05	0.527± 0.05	0.899±0.007

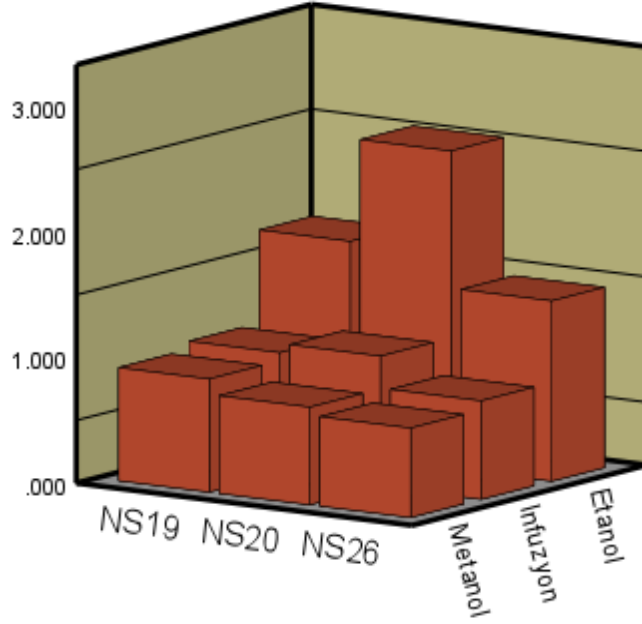


Şekil 5.56. *L. cardiaca* ekstrelerinin Troloks'a eşdeğer antioksidan kapasiteleri

L. cardiaca ekstrelerinin ABTS^{•+} radikalini süpürücü etkileri değerlendirildiğinde, en yüksek TEAK değeri, NS21 kodlu etanol ekstresinde 2.73 mM olarak hesaplanmıştır. Etanol ekstrelerinin metanol ve infüzyon örneklerinden daha aktif oldukları gözlenmiştir (Şekil 5.56).

Tablo 5.13. *L. glaucescens* ekstrelerinin Troloks'a eşdeğer antioksidan kapasiteleri

<i>L. glaucescens</i> Kod	TEAK (mM)		
	Etanollü ekstre	Metanollü ekstre	İnfüzyon
NS19	1.709 ± 0.03	0.901± 0.06	0.967± 0.06
NS20	2.53± 0.01	0.778± 0.02	1.04± 0.02
NS26	1.437± 0.02	0.712± 0.006	0.785± 0.03

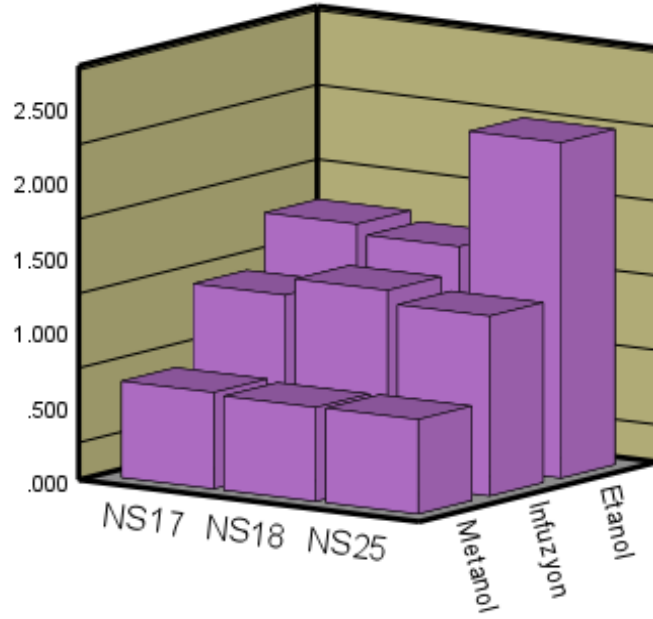


Şekil 5.57. *L. glaucescens* ekstrelerinin Troloks'a eşdeğer antioksidan kapasiteleri

L. glaucescens türünden hazırlanan ekstrelerden en yüksek TEAK değeri, NS20 kodlu etanol ekstresinde 2.53 mM olarak hesaplanmıştır. Etanol ekstrelerinin metanol ve infüzyon örneklerinden daha etkili oldukları gözlenmiştir (Şekil 5.57).

Tablo 5.14. *L. quinquelobatus* ve *L. persicus* ekstrelerinin Troloks'a eşdeğer antioksidan kapasiteleri

Kod/Bitki	TEAK (mM)		
	Etanollü ekstre	Metanollü ekstre	İnfüzyon
NS17 <i>L. quinquelobatus</i>	1.535± 0.14	0.646± 0.04	1.179± 0.04
NS18 <i>L. quinquelobatus</i>	1.468± 0.12	0.630± 0.04	1.295± 0.01
NS25 <i>L. persicus</i>	2.251± 0.05	0.633± 0.03	1.207± 0.03



Şekil 5.58. *L. quinquelobatus* ve *L. persicus* ekstrelerinin Troloks'a eşdeğer antioksidan kapasiteleri

L. quinquelobatus türünden hazırlanan ekstrelerde NS17 ve NS18 kodlu etanol ekstrelerinin TEAK değerlerinin birbirine yakın olduğu, metanol ekstrelerinin infüzyon ve etanol ekstrelerinden daha zayıf etkili olduğu belirlenmiştir. (Şekil 5.58).

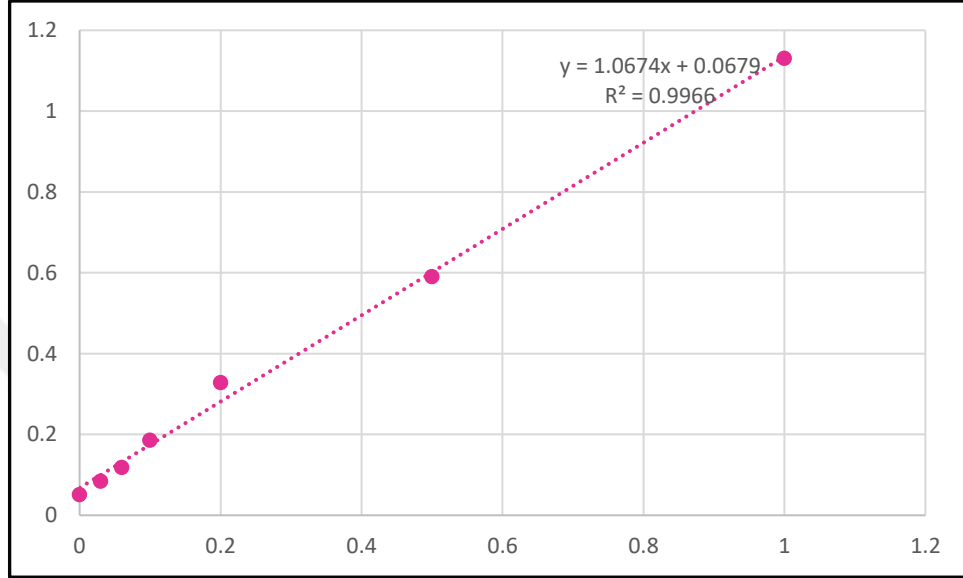
L. persicus türünden hazırlanan ekstrelerde antioksidan kapasitesi bakımından ekstrelerin sıralaması şu şekildedir: NS25E> NS25INF> NS25M.

Deney sonuçlarına göre tüm türler arasında en yüksek TEAK değeri, NS 21E kodlu *L. cardiaca* türünde 2.731 mM olarak hesaplanmıştır (Tablo 5.11). Bu örnekten sonraki en yüksek TEAK değerleri NS 20E kodlu *L. glaucescens* (2.53 mM) ve NS 25E kodlu *L. persicus* (2.25 mM) türlerinde belirlenmiştir. *Leonurus* cinsine ait tüm türlerin ekstrelerinin bu test içerisinde kayda değer etkiye sahip olduğu görülmüştür. Ekstreler arasında özellikle etanollü ekstrelerin ABTS^{•+} radikalini süpürme etkisinin, diğer çözücülere kıyasla daha fazla olduğu gözlemlenmiştir (Şekil 5.58).

5.6.1.3. Folin-Ciocalteu reaktifi (FCR) ile toplam fenolik yöntemine (Toplam Fenol Miktar Tayini) ilişkin bulgular

Bitkilerin toprak üstü kısımlarından elde edilen ekstrelerin içerdikleri toplam fenol miktarları Folin-Ciocalteu reaktifi kullanılarak spektrofotometrik yöntemle tayin edilmiştir. Ekstrelerin toplam fenol miktarları Gallik asit'e eşdeğer olarak Tablo 5.15,

5.16 ve 5.17’de verilmiştir. Çalışmada yer alan 4 *Leonurus* türüne ait gallik asite eşdeğer toplam fenolik madde miktarları 13.6 ile 170 mg GAE/g ekstre aralığında değişmiştir. Hesaplamalarda kullanılan gallik asidin kalibrasyon eğrisi ve eğri denklemini Şekil 5.59’da gösterilmiştir.

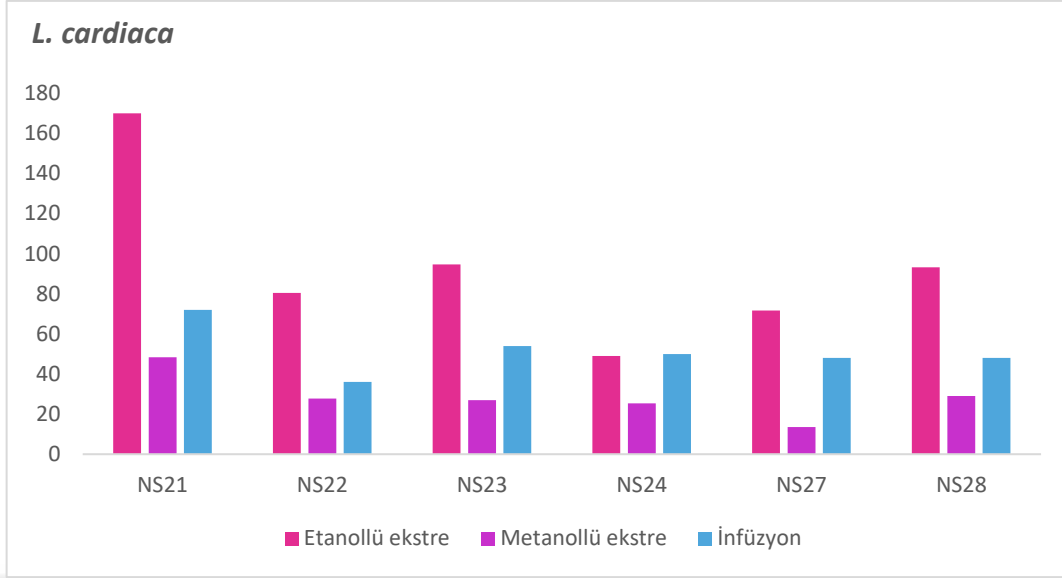


Şekil 5.59. Gallik asit kalibrasyon eğrisi

Tablo 5.15. *L. cardiaca* ’nın içerdiği Gallik asit’e eşdeğer toplam fenol miktarı

<i>L. cardiaca</i>		GAE	
Kod	Etanollü ekstre	Metanollü ekstre	İnfüzyon
NS21	170± 0.026	48.4± 0.022	72± 0.022
NS22	80.4± 0.014	27.81± 0.02	36± 0.024
NS23	94.7± 0.026	26.93± 0.009	54± 0.007
NS24	49± 0.012	25.43± 0.008	50± 0.014
NS27	71.7± 0.023	13.6± 0.009	48± 0.014
NS28	93.26± 0.004	29±0.027	48± 0.016

GAE: mg GAE/g ekstre Gallik asit’e eşdeğer fenol miktarı



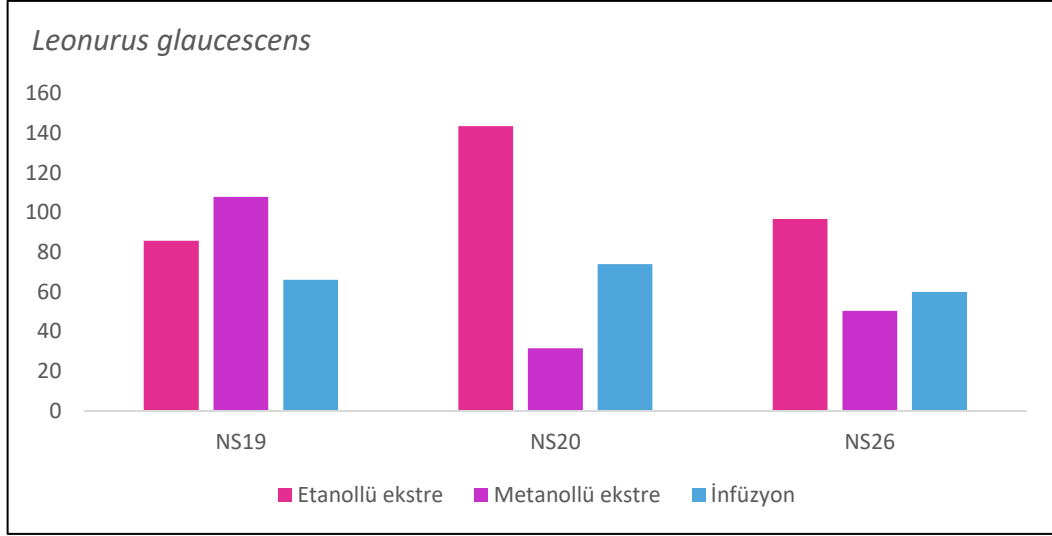
Şekil 5.60. *L. cardiaca* ekstralarının toplam fenol miktarı

Elde edilen bulgulara göre, farklı lokalitelerden toplanan *L. cardiaca* örneklerinde en yüksek toplam fenol miktarı (170 mg GAE/g ekst) NS21 kodlu etanollü ekstrede tespit edilmiştir. Metanollü ekstralar fenolik bileşikler açısından zayıf bulunmuştur. *L. cardiaca* türünün etanol ekstralarında toplam fenol içeriğine göre sıralama şu şekildedir: NS21E>NS23E> NS28E >NS22E>NSE27>NS24E (Şekil 5.60).

Tablo 5.16. *L. glaucescens*'in İçerdiği Gallik asit'e eşdeğer toplam fenol miktarı

<i>L. glaucescens</i>		GAE	
Kod	Etanollü ekstre	Metanollü ekstre	İnfüzyon
NS19	85.8± 0.015	107.8± 0.029	66± 0.02
NS20	143.4± 0.033	31.62± 0.017	74± 0.019
NS26	96.7± 0.006	50.4± 0.019	60± 0.002

GAE: mg GAE/g ekstre Gallik asit'e eşdeğer fenol miktarı



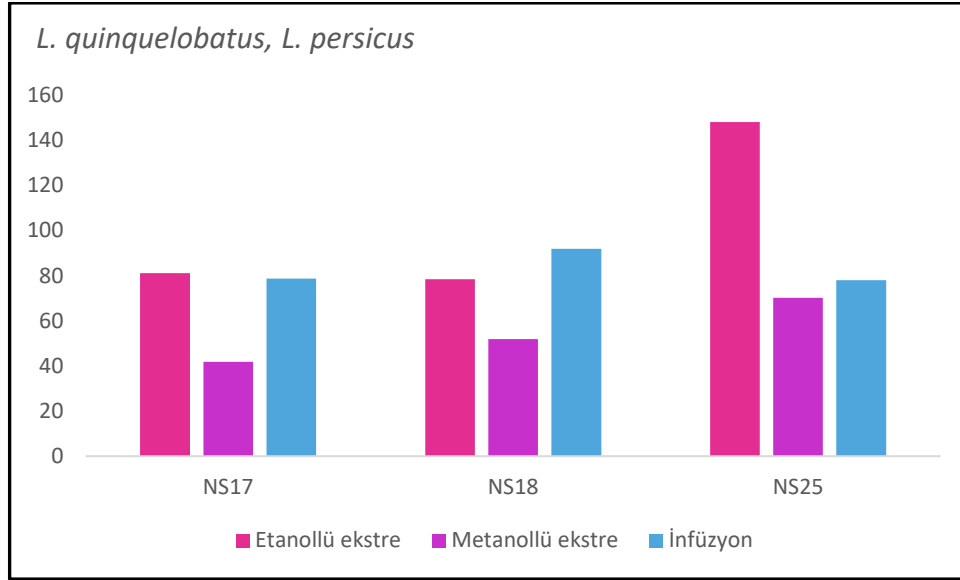
Şekil 5.61. *L. glaucescens* ekstralarının toplam fenol miktarı

Veriler değerlendirildiğinde, farklı lokalitelerden toplanan *L. glaucescens* örneklerinde en yüksek toplam fenol miktarı (143.4 mg GAE/g ekst) NS20 kodlu etanollü ekstrede tespit edilmiştir (Şekil 5.61). *L. glaucescens* türünün etanol ekstralarında toplam fenol içeriğine göre sıralama şu şekildedir: NS20E>NS26E> NS19E (Tablo 5.16).

Tablo 5.17. *L. quinquelobatus* ve *L. persicus*'un içerdiği Gallik asit'e eşdeğer toplam fenol miktarı

Kod/ Bitki	GAE		
	Etanollü ekstre	Metanollü ekstre	İnfüzyon
NS17 <i>L. quinquelobatus</i>	81.15± 0.023	41.9± 0.012	78.8± 0.046
NS18 <i>L. quinquelobatus</i>	78.52± 0.005	51.92± 0,004	92± 0.003
NS25 <i>L. persicus</i>	148.1± 0.046	70.2± 0.032	78± 0.016

GAE: mg GAE/g ekstre Gallik asit'e eşdeğer fenol miktarı



Şekil 5.62. *L. quinquelobatus* ve *L. persicus* ekstrelerinin toplam fenol miktarı

NS17: *L. quinquelobatus*; NS18: *L. quinquelobatus*; NS25: *L. persicus*

Bulgulara göre, farklı lokalitelerden toplanan *L. quinquelobatus* örneklerinde en yüksek toplam fenol miktarı (92 mg GAE/g ekst) NS18 kodlu infüzyonda tespit edilmiş olup, etanol ekstrelerindeki toplam fenol miktarının da yakın değerlerde olduğu görülmüştür (Şekil 5.62). *L. persicus* türü için de toplam fenol miktarına göre sıralamasının NS25E> NS25INF> NS25M şeklinde olduğu, infüzyon ve metanol ekstrelerinin yakın değerlerde fenolik bileşik içerdiği belirlenmiştir (Tablo 5.17).

Elde edilen tüm bulgular değerlendirildiğinde, *Leonurus* türlerinden farklı çözücülerle elde edilen ekstrelerde en yüksek değer (170 mg GAE/g ekst) *L. cardiaca* türünün NS21 kodlu etanollü ekstresinde tespit edilmiştir. Metanollü ekstrelerin fenolik bileşikler açısından daha zayıf olduğu bulunmuştur. Türler için toplam fenolik madde miktarı karşılaştırıldığında etanol ekstraksiyonu için sıralama; *L. cardiaca*> *L. persicus*> *L. glaucescens*> *L. quinquelobatus* şeklindedir.

Etanollü ekstreler değerlendirildiğinde ise gallik asite eşdeğer toplam fenol miktarları şu şekilde sıralanmıştır: NS21> NS25> NS20> NS26> NS23> NS28> NS19> NS17> NS22> NS18> NS27> NS24.

5.6.2. Antimikrobiyal aktiviteye ilişkin bulgular

5.6.2.1. Mikrodilüsyon yöntemiyle antibakteriyel etkinin belirlenmesi

Antibakteriyel aktivite deneylerinde *Leonurus* ekstrelerinin, 6 adet patojen bakteriye (*E. coli*, *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus*, *Salmonella enterica* subsp. *enterica*, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus epidermidis* ve *Pseudomonas aeruginosa*) karşı olan etkileri standart antibakteriyel maddeler eşliğinde çalışılmıştır (Şekil 5.63).

Üremenin olduğu alanların daha iyi belirlenebilmesi için her kuyucuğa eklenen mavi-mor renkli resazurinin üreme olan kuyucukları pembeye boyadığı gözlenmiş ve minimum inhibitör konsantrasyonları (MİK) belirlenmiştir. Üremeye bağlı renk değişiklikleri Şekil 5.63'te görülmektedir.



Şekil 5.63. *Leonurus* ekstrelerinin antibakteriyel etkisinin tespiti

Mikrodilüsyon yöntemiyle belirlenen minimum inhibitör konsantrasyonları (MİK), mg/mL cinsinden Tablo 5.18'de verilmiştir. Tablo 5.18'de görüldüğü gibi, kullanılan patojen bakterilere karşı standart antibakteriyel maddelerle kıyaslandığında ekstrelerin, 2 ile 8 mg/mL'nin üzerinde değişen konsantrasyonlarda zayıf inhibitör etkileri gösterdikleri belirlenmiştir. Genel olarak etanol ve metanol ekstrelerinin, farklı bakteri suşlarına karşı, infüzyon örneklerinden daha düşük dozda etkili oldukları gözlenmiştir. Tüm türlere ait

örneklerden hazırlanan ekstrelerin, *P. aeruginosa* ' a karşı zayıf etkili olmasının yanı sıra, ekstrelerin *E. coli* ve *Salmonella enterica* subsp. *enterica* türlerine karşı MİK değerlerinin 2 mg/mL olduğu belirlenmiştir. *Staphylococcus epidermidis*' e karşı NS17 kodlu (*L. quinquelobatus*) metanol ekstresinin MİK değeri 1mg/mL iken, diğer ekstreler için MİK değeri 2mg/mL olarak belirlenmiştir. Ayrıca NS17 kodlu (*L. quinquelobatus*) metanol ekstresi diğer ekstrelere göre, tüm bakteri türleri üzerinde daha etkili olup, MİK değerleri 1-2 mg/mL olarak bulunmuş iken, *P. aeruginosa* ' a karşı 4mg/mL olduğu gözlenmiştir. Ek olarak, NS19 (*L. glaucescens*) ve NS21 (*L. cardiaca*) kodlu metanol ekstrelerinin *Enterococcus faecalis*' e karşı MİK değerleri 1 mg/ml olarak belirlenmiştir. *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus*' a karşı tüm türlerin metanol ekstrelerinin MİK değeri de 2 mg/mL olarak bulunmuştur. *Leonurus* türlerinin toprak üstü kısımlarından hazırlanan ekstrelerinin 6 bakteriye karşı olan antibakteriyal etkisi ilk kez bu çalışma ile rapor edilmektedir (Tablo 5.18).

Tablo 5.18. *Leonurus* ekstrelerinin antibakteriyal etki sonuçları (MİK mg/mL)

Mikroorganizma	Suş No	NS17 E	NS17 M	NS17 INF	NS19 E	NS19 M	NS19 INF	NS21 E	NS21 M	NS21 INF	NS25 E	NS25 M	NS25 INF	Amp (µg/mL)	Klr (µg/mL)
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 8739	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	4	4
<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i>	ATCC 6538	2	2	>8	>8	2	4	4	2	4	2	2	4	2	4
<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i>	ATCC® 14028	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	4
<i>Enterococcus faecalis</i>	ATCC® 29212	2	1	2	2	1	2	2	1	2	2	2	2	4	2
<i>Staphylococcus</i> <i>epidermidis</i>	ATCC® 12228	2	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	4	4
<i>Pseudomonas</i> <i>aeruginosa</i>	ATCC® 27853	>8	4	>8	>8	>8	>8	>8	>8	>8	>8	>8	>8	8	16

NS17 E: *L. quinquelobatus* etanol ekstresi; NS17M: *L. quinquelobatus* metanol ekstresi; NS17INF: *L. quinquelobatus* infüzyonu; NS19E: *L. glaucescens* etanol ekstresi; NS19M: *L. glaucescens* metanol ekstresi; NS19INF: *L. glaucescens* infüzyonu; NS21E: *L. cardiaca* etanol ekstresi; NS21M: *L. cardiaca* metanol ekstresi; NS21INF: *L. cardiaca* infüzyonu; NS25E: *L. persicus* etanol ekstresi; NS25M: *L. persicus* metanol ekstresi; NS25INF: *L. persicus* infüzyonu.

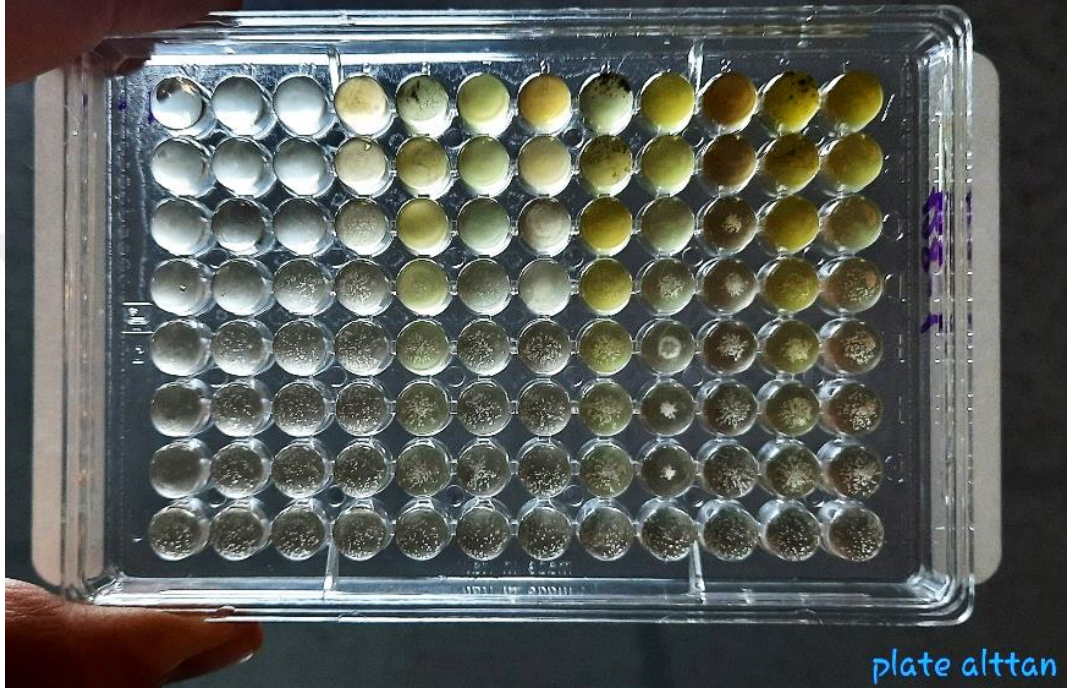
MİK: Minimum inhibitör konsantrasyonu

Amp: Ampisilin

Klr: Kloramfenikol

5.6.2.2. Mikrodilüsyon yöntemiyle antikandidal etkinin belirlenmesi

Mikrodilüsyon yöntemi kullanılarak gerçekleştirilen antikandidal aktivite deneylerinde *Candida albicans*'ın iki farklı suşu ile birlikte toplam 6 farklı *Candida* türü kullanılmıştır (Şekil 5.64). Bunlar; *Candida albicans*, *C. utilis*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* ve *C. krusei*'dir (Tablo 5.19).



Şekil 5.64. *Leonurus* ekstrelerinin antikandidal etkisinin tespiti

Deney sonucunda elde edilen MİK değerleri mg/mL cinsinden Tablo 5.19'da verilmiştir. Tablo 5.19'da görüldüğü gibi, ekstrelerin 0.1 ile 1 mg/mL arasında değişen konsantrasyonlarda antikandidal etki gösterdikleri belirlenmiştir. Standart antikandidal maddelerle karşılaştırıldığında ekstrelerin zayıf etkili oldukları saptanmıştır. Antikandidal etki test sonuçlarına bakıldığında, genel olarak etanol ve metanol ekstrelerinin, *Candida* türlerine karşı, infüzyon örneklerinden daha düşük dozda etkili oldukları gözlenmiştir. Standart antikandidal maddelerle karşılaştırıldığında tüm substratların orta derecede etkili olduğu saptanırken, *C. utilis* ve *C. krusei* türlerinin NS25M (*L. persicus*) kodlu metanol ekstresine karşı diğer ekstrelerden daha duyarlı olduğu gözlenmiştir. Ayrıca NS25E (*L. persicus*) kodlu etanol ekstresinin de diğer ekstrelerle kıyasla, *C. parapsilosis* ve *C. krusei* türleri üzerinde daha aktif olduğu (MİK =0.125 mg/mL) gözlenmiştir. Ek olarak, *C. albicans*, *C. utilis*, *C. tropicalis* ve *C. krusei*

suslarına karşı daha etkili olan ekstrenin NS25M (*L. persicus*) türünün metanol ekstresi olduğu belirlenmiştir. *C. albicans* (ATCC 90028) türü için *L. glaucescens*, *L. cardiaca* ve *L. persicus* türlerinin etanol ekstrelerinin MİK değerleri 0.5 mg/mL iken, *C. parapsilosis* türü için tüm türlerin metanol ekstrelerinin MİK değerleri 0.5 mg/mL olarak bulunmuştur. *Leonurus* türlerinin toprak üstü kısımlarından hazırlanan ekstrelerinin 6 *Candida* türüne karşı olan antikandidal etkisi ilk kez bu çalışma ile rapor edilmektedir (Tablo 5.19).



Tablo 5.19. *Leonurus* ekstrelerinin antikandidal etki sonuçları (MİK mg/mL)

Mikroorganizma	Suş No	NS17 E	NS17 M	NS17 INF	NS19 E	NS19 M	NS19 INF	NS21 E	NS21 M	NS21 INF	NS25 E	NS25 M	NS25 INF	Amp-B (µg/mL)	Keto (µg/mL)
<i>Candida albicans</i>	ATCC 10231	1	1	2	1	1	1	0.5	0.5	2	0.5	0.25	1	0.25	0.06
<i>C. utilis</i>	NRRL Y-900	0.5	0.5	1	0.5	0.5	1	0.25	0.25	1	0.25	0.125	0.5	0.125	0.03
<i>C. albicans</i>	ATCC 90028	1	1	2	1	0.5	1	0.5	0.5	2	0.5	0.5	1	0.5	0.03
<i>C. tropicalis</i>	ATCC 750	1	0.5	1	1	1	2	1	0.5	2	0.5	0.25	2	0.25	0.03
<i>C. parapsilosis</i>	ATCC 22019*	1	0.5	1	1	0.5	0.5	0.5	0.5	2	0.125	0.5	1	0.25	0.03
<i>C. krusei</i>	ATCC 6258*	0.5	0.25	0.5	0.25	0.25	0.5	0.25	0.5	2	0.125	0.125	0.5	0.25	0.06

NS17 E: *L. quinquelobatus* etanol ekstresi; NS17M: *L. quinquelobatus* metanol ekstresi; NS17INF: *L. quinquelobatus* infüzyonu; NS19E: *L. glaucescens* etanol ekstresi; NS19M: *L. glaucescens* metanol ekstresi; NS19INF: *L. glaucescens* infüzyonu; NS21E: *L. cardiaca* etanol ekstresi; NS21M: *L. cardiaca* metanol ekstresi; NS21INF: *L. cardiaca* infüzyonu; NS25E: *L. persicus* etanol ekstresi; NS25M: *L. persicus* metanol ekstresi; NS25INF: *L. persicus* infüzyonu.

MİK: Minimum inhibitör konsantrasyonu

Kalite kontrol suşları **Candida parapsilosis* ATCC® 22019--Amfoterisin-B: 0.25-2.0, Ketokonazol: 0.03-0.25

**Candida krusei* ATCC® 6258-Amfoterisin-B: 0.5-2.0, Ketokonazol: 0.25-1.00

5.6.3. Sitotoksik aktiviteye ilişkin bulgular

Leonurus türlerinden ekstraksiyon çalışmasıyla elde edilen çeşitli ekstrelerin doza-bağılı sitotoksik etkileri C6, A549 ve MCF7 kanser hücre hatlarına karşı *in vitro* MTT metodu ile incelenmiştir. Elde edilen bulgular doğrultusunda, pozitif kontrol (doksorubisin) ile kıyaslanabilir en yüksek etki C6 kanser hücre hattına karşı, *L. persicus* türünün metanol ekstresinde görülmüştür. MTT sonuçlarına göre her bir ekstrenin IC₅₀ değerleri hesaplanmış ve Tablo 5.20’de verilmiştir.

Tablo 5.20. Ekstrelerin A549, C6 ve MCF7 hücre dizilerine ait IC₅₀ değerleri (mg/mL)

Kod	A549	C6	MCF7
NS17 E	>1000	31.338±1.391	47.816±2.089
NS17 M	>1000	21.147±1.151	18.193±0.458
NS17 INF	>1000	114.782±1.391	288.612±2.654
NS19 E	>1000	31.221±0.606	39.269±1.656
NS19 M	>1000	32.385±0.278	21.223±0.937
NS19 INF	>1000	121.763±1.391	495.879±3.625
NS21 E	869.569±10.582	50.129±1.096	80.653±3.947
NS21 M	673.675±9.856	24.313±1.034	47.592±1.382
NS21 INF	>1000	113.644±1.391	165.915±1.561
NS25 E	>1000	33,969±0,396	85.651±3.715
NS25 M	601.860±8.663	16.438±0.170	51.799±2.365
NS25 INF	>1000	58.935±1.391	122.275±2.547
Doksorubisin	10.76±0.513	25.64±1.115	5.70±0.225

NS17 E: *L. quinquelobatus* etanol ekstresi; NS17M: *L. quinquelobatus* metanol ekstresi; NS17INF: *L. quinquelobatus* infüzyonu; NS19E: *L. glaucescens* etanol ekstresi; NS19M: *L. glaucescens* metanol ekstresi; NS19INF: *L. glaucescens* infüzyonu; NS21E: *L. cardiaca* etanol ekstresi; NS21M: *L. cardiaca* metanol ekstresi; NS21INF: *L. cardiaca* infüzyonu; NS25E: *L. persicus* etanol ekstresi; NS25M: *L. persicus* metanol ekstresi; NS25INF: *L. persicus* infüzyonu.

Elde edilen bulgulara göre, 4 *Leonurus* türünden hazırlanan ekstrelerin A549 hücre dizisine karşı IC₅₀ değerleri ile doksorubisinin IC₅₀ değeri (10.76 mg/mL) karşılaştırıldığında, ekstrelerin IC₅₀ değerlerinin doksorubisine oranla oldukça yüksek (>1000 mg/mL) olduğu belirlenmiştir. A549 hücre hattının ekstrelere karşı duyarlılığının düşük olduğu görülmüştür. Ayrıca, NS25M, NS21E ve NS21M kodlu ekstrelerin IC₅₀ değerlerinin A549 hattına karşı diğer ekstrelerden daha düşük olduğu belirlenmiştir. *Leonurus* türlerinin metanol, etanol ve infüzyon ekstrelerinin A549 hücre dizisine karşı sitotoksik etkileri IC₅₀ değerleri >1000 mg/mL olarak kaydedilirken, C6 kanser

hücrelerine karşı referans ilaç olan doksorubisin ile kıyaslanabilir ölçüde sitotoksik etki gösterdikleri belirlenmiştir. C6 kanser hücrelerine karşı en yüksek sitotoksik etki NS25M kodlu *L. persicus* türünde (IC₅₀: 16.4 mg/mL) gözlenmiş ve IC₅₀ değeri pozitif kontrol olarak kullanılan doksorubisinden (IC₅₀: 25.6) daha düşük bulunmuştur. C6 hücre hattına karşı sitotoksik etki bakımından NS17M (IC₅₀: 21.1 mg/mL) ve NS21M (IC₅₀: 24.3 mg/mL) kodlu ekstrelerde birbirine yakın sonuçlar kaydedilirken, bu ekstrelerin de IC₅₀ değerlerinin doksorubisinden düşük olduğu gözlenmiştir. Ayrıca, NS17E (IC₅₀: 31.3 mg/mL), NS19E (IC₅₀: 31.2mg/mL), NS19M (IC₅₀: 32.3 mg/mL) ve NS25E kodlu (IC₅₀: 33.9 mg/mL) ekstrelerde de IC₅₀ değerlerinin birbirine yakın olduğu ve NS21E (IC₅₀: 50.1 mg/mL) kodlu ekstrenin IC₅₀ değerinden daha düşük oldukları belirlenmiştir. İnfüzyon numunelerinde C6 hücre dizisine karşı, daha düşük sitotoksik etkiye rastlanmıştır. C6 kanser hücre hattına karşı ekstrelerin sitotoksik etkileri ise şu şekilde sıralanmaktadır: NS25M> NS17M> NS21M> NS19E> NS17E> NS19M> NS25E> NS21E> NS25INF> NS21INF> NS17INF. Referans ilaç olan doksorubisinin, C6 kanser hücrelerine karşı sitotoksik etkisi IC₅₀ değeri 25.64 mg/mL olarak hesaplanmıştır. Doksorubisinden daha düşük IC₅₀ değerlerine, IC₅₀ değerleri sırasıyla 16.4 mg/mL, 21.1 mg/mL ve 24.3 mg/mL olmak üzere, *L. persicus* metanol (NS25M), *L. quinquelobatus* metanol (NS17M) ve *L. cardiaca* metanol (NS21M) ekstrelerinde ulaşılmıştır.

Hazırlanan ekstrelerin MCF7 kanser hücrelerine karşı IC₅₀ değerleri ile doksorubisinin IC₅₀ değeri (5.70 mg/mL) karşılaştırıldığında, en yüksek sitotoksik etki NS17M kodlu *L. quinquelobatus* türünde (IC₅₀: 18.1 mg/mL) tespit edilirken, bunu NS19M kodlu *L. glaucescens* türü (IC₅₀: 21.2 mg/mL) izlemiştir. Ayrıca, NS17E (IC₅₀: 47.8 mg/mL), NS21M (IC₅₀: 47.5 mg/mL), NS25M (IC₅₀: 51.7 mg/mL) kodlu ekstrelerde IC₅₀ değerlerinin birbirine yakın olduğu ve NS19E (IC₅₀: 39.2 mg/mL) kodlu ekstrenin IC₅₀ değerinden biraz daha yüksek oldukları belirlenmiştir. NS17M ve NS19M kodlu ekstrelerin MCF7 hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisinin diğer ekstrelerden daha yüksek olduğu, ancak referans ilaç olan doksorubisine kıyasla daha düşük olduğu görülmüştür. İnfüzyon numunelerinde MCF7 hücre dizisine karşı düşük sitotoksik etkiye rastlanırken, metanol ve etanol ekstrelerinin sitotoksik etkileri daha yüksek bulunmuştur.

Elde edilen veriler tez konusunu oluşturan *Leonurus* türlerinden hazırlanan ekstrelerin, glioma ve meme kanseri hücrelerinin canlılığını inhibe ettiğini göstermektedir. Bu verilerden hareketle, MCF7 ve C6 kanser hücrelerinin ekstrele karşı daha duyarlı olduğu anlaşılmıştır. Ek olarak, NS25M kodlu ekstrenin A549 ve C6 kanser

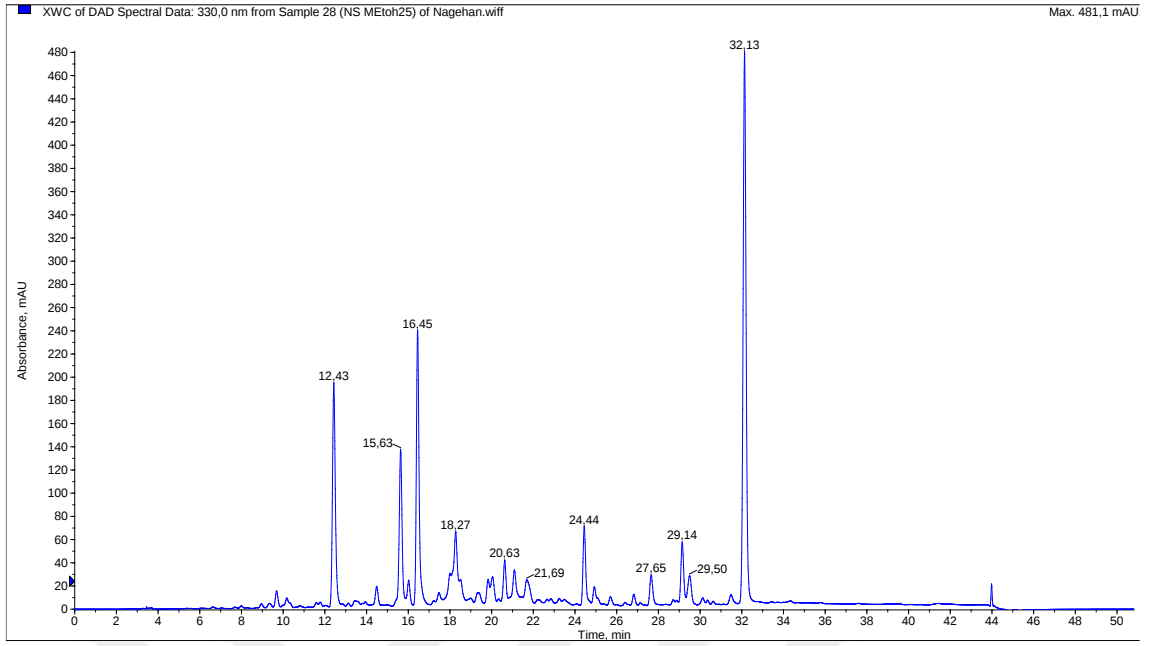
hücrelerine sitotoksik etkisinin diğer ekstrelerden daha fazla olduğu, NS17M kodlu ekstrenin de MCF7 hücrelerinde en yüksek sitotoksik etkili iken, C6 hücrelerinde sitotoksik etki bakımından NS25M kodlu ekstreyi izlediği belirlenmiştir.

5.7. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi/Kütle Spektroskopisi-Kütle Spektroskopisi (YPSK-KS/KS) ile Analizlerine İlişkin Bulgular

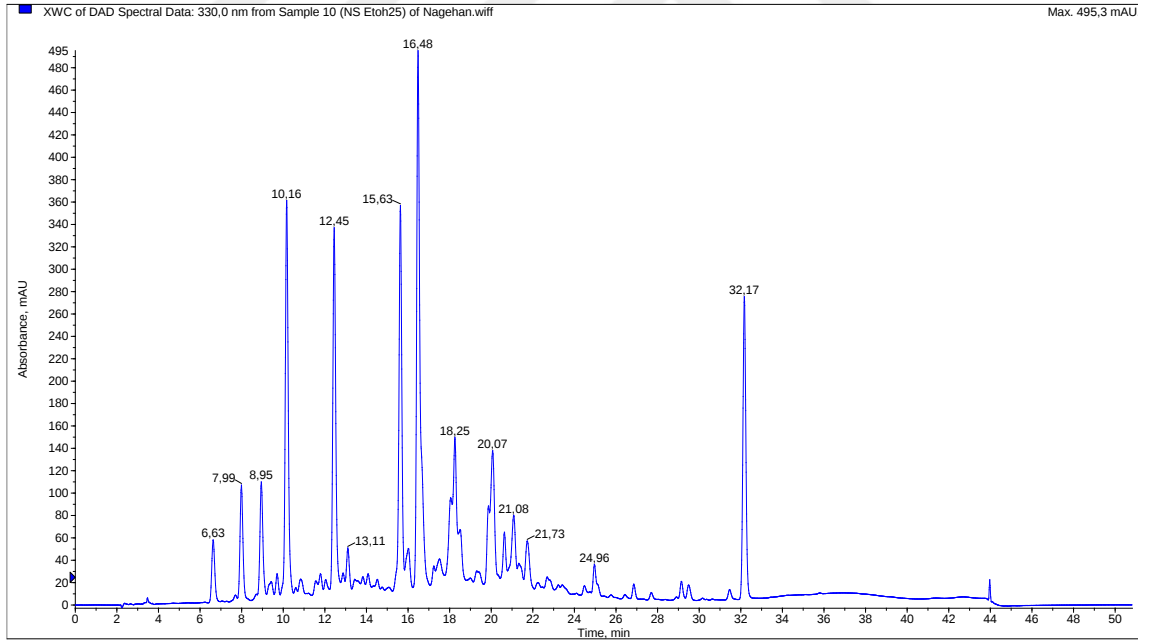
Elde edilen biyolojik etkilerin değerlendirilmesi açısından, her bir ekstrenin kimyasal bileşimlerinin YPSK-KS/KS ile belirlenmesi önem taşımaktadır. Analiz sonucu elde edilen kromatogram ve spektrumlar incelenerek literatürde mevcut çalışmalarla kıyaslanarak *Leonurus* türlerinin kimyasal bileşimleri belirlenmeye çalışılmıştır. Bu kapsamda tüm örneklerin bileşiminde bulunan maddelerin yapıları, YPSK-KS/KS analizlerinden elde edilen spektrumları, kaynak bilgileri ışığında yorumlanarak, aydınlatılmaya çalışılmıştır.

Yorumlamaların açıklanabilmesi için her bir bileşiğin bulunduğu ekstrelerin kodu (Rt değeri, dakika), molekül ağırlığı (MA), elektronegatif iyon modunda çalışıldığı için $[M-H]^-$ değeri, fragmentleri ve kütle spektrumları sırasıyla verilmiştir. Bu bölümde yapıları ile ilgili yorumlar yapılan ve isimlendirilen tüm bileşikler doğal olup, kaynak taramalarında tanımlamalarına rastlanan bileşiklerdir.

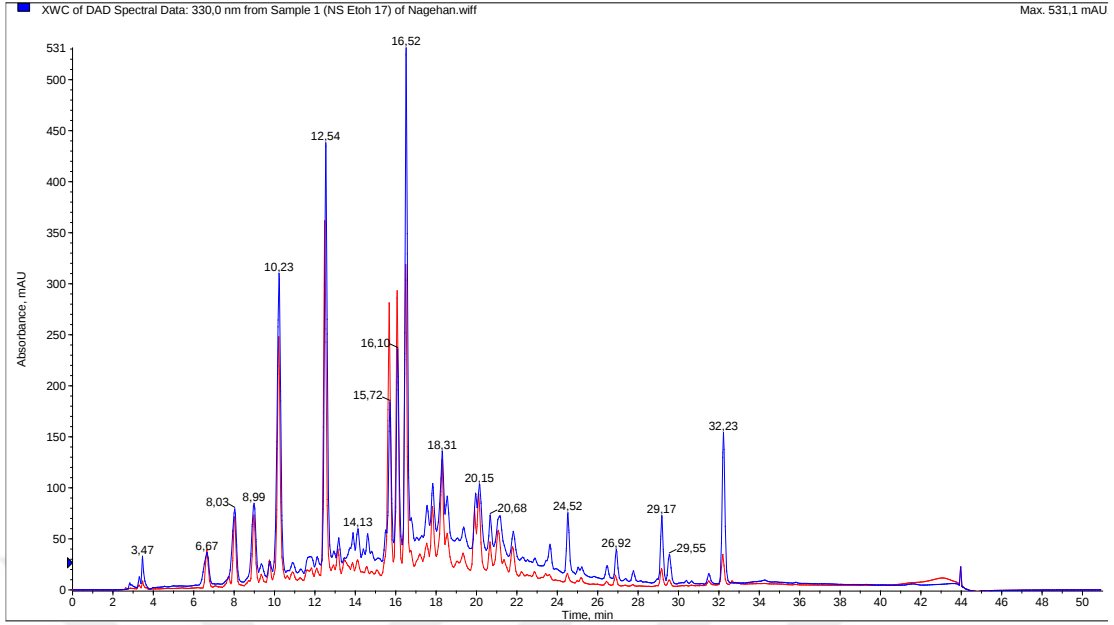
Ekstrelerin HPLC-MS/MS analizlerinden önce uygun kromatografik ayırımların belirlenmesi amacıyla Shimadzu 10AVp sistemi ile çalışılmıştır. Bu kromatogramların hepsi tezin sonunda ayrıca verilmiştir. HPLC-MS/MS analizleri ise en yüksek aktiviteye sahip *L. persicus*'un tüm ekstrelerine, diğer *Leonurus* türlerinin ise Etanol ve Sulu ekstrelerinin tamamına ve HPLC ön çalışmalarında farklılık gösterdiyse Metanol ekstrelerine yapılmıştır. Etkili çıkan *L. persicus*'un tüm ekstrelerine ait DAD kromatogramları tek tek verilmiş diğer türlere ait kromatogramların etanol ekstreleri daha sade ve anlaşılır olması açısından üst üste çakıştırılarak verilmiştir (Şekil 5.65-5.59).



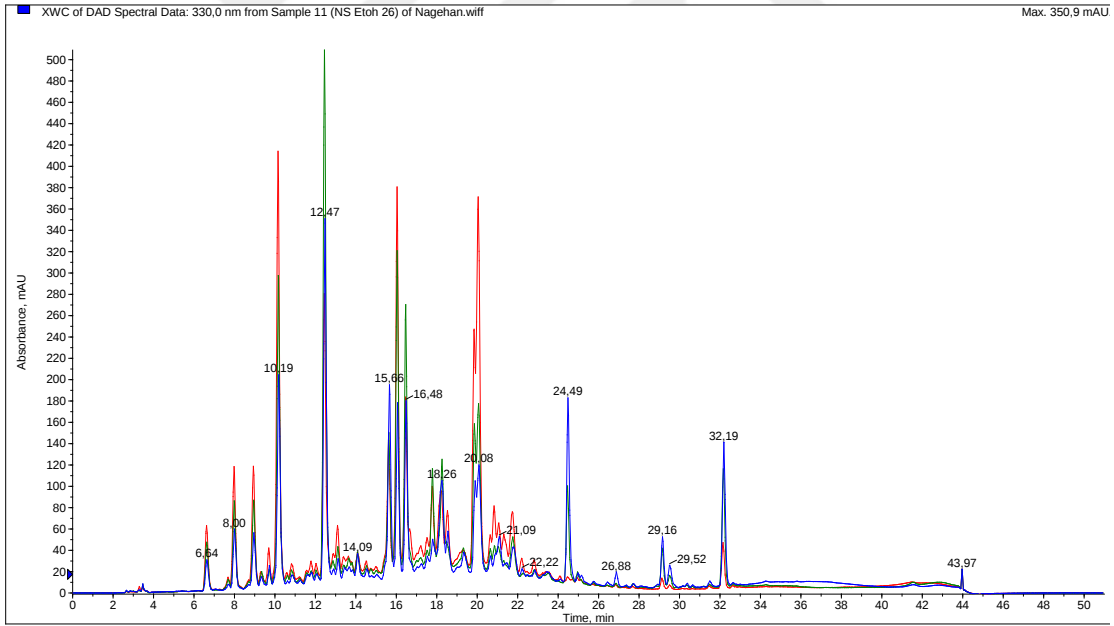
Şekil 5.65. *L. persicus* MeOH ekstresi HPLC-MS/MS analizinde elde edilen DAD kromatogramı



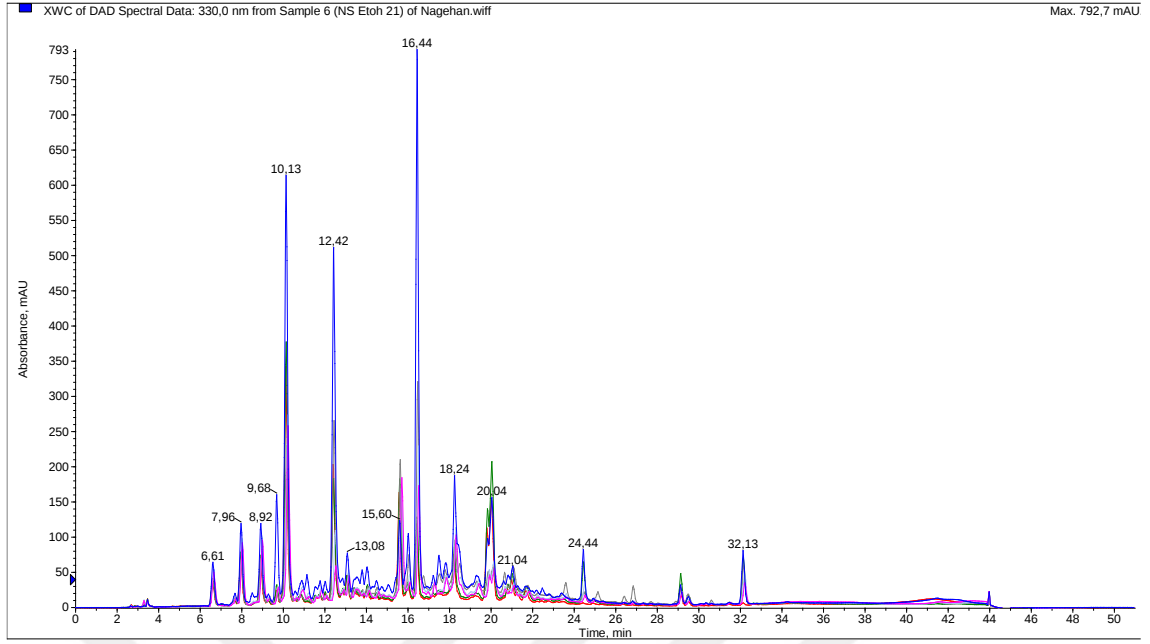
Şekil 5.66. *L. persicus* infüzyon HPLC-MS/MS analizinde elde edilen DAD kromatogramı



Şekil 5.67. *L. quinquelobatus* alkolü ekstresi tüm kromatogramlar çakıştırılmış



Şekil 5.68. *L. glaucescens* alkolü ekstresi tüm kromatogramlar çakıştırılmış



Şekil 5.69. *L. cardiaca* alkollü ekstresi tüm kromatogramlar çakıştırılmış

Tablo 5.21. *L. persicus* ekstrelerinin HPLC-MS analizleri

Rt (MS)	M-H	MS2	Tanımlama	Ekstre
6.6	-	-	Bilinmeyen	EMİ
8.0	363	201, 183, 165, 157	Bilinmeyen	EMİ
8.0	393	347, 231, 167	Bilinmeyen	EMİ
8.1	279	117	Bilinmeyen	EMİ
9.0	447	315, 135	Bilinmeyen	EMİ
9.5	315	153, 109	Protokateşik asit / gentisik asit heksozit	EMİ
9.7	341	179, 161	Kafeoil heksozit	EMİ
9.8	375	315, 213, 169, 151	Loganik asit	EMİ
10.3	209	191, 173, 147	Glukarik asit	EMİ
10.2	393	231, 213, 191	Bilinmeyen	EMİ
12.5	353	191, 179, 135	5-Kafeoilkinik asit	EMİ
13.4	387	207, 163	Mediaresinol veya İkarisit B5 benzeri	EMİ
15.7	179	135	Kafeik asit	EMİ
16.5	357	195, 151, 133	Deoksigeniposidik asit	EMİ
16.5	623	461, 161, 135	Verbaskozit	EMİ
16.6	625	463, 343, 300, 271	Kersetin diglukozit	EMİ
17.6	397	361, 299, 271	Bilinmeyen kersetin türevi	EMİ
18.3	507	179, 161, 135	Bilinmeyen kafeik asit türevi	EMİ
18.0	359	197, 179, 161, 153, 131	Rozmarinik asit benzeri	EMİ
19.9	609	300, 271, 179, 151	Kersetin rutinozit	EMİ
20.0	359	315, 287, 271	Bilinmeyen	EMİ
20.2	463	300, 271, 255	Kersetin heksozit	EMİ
20.5	435	393,375,331, 313, 287, 269	Bilinmeyen	EMİ
21.7	365	347, 321, 305, 251	Bilinmeyen	EMİ
24.5	581	461, 342, 315, 299, 119	Bilinmeyen C glukozit	EM
25.5	361	343, 317, 299, 257	Bilinmeyen	EM
27.6	347	303, 285, 259	Bilinmeyen	EMİ
29.6	407	363, 331, 299, 177, 151	Bilinmeyen	M
30.3	299	284	Hispidulin benzeri	EMİ
32.2	283	268, 239, 211, 151, 117	Genkvanin	EMİ

E: Etanol ekstresi, M: Metanol ekstresi, İ: İnfüzyon

Tablo 5.22. *L. quinquelobatus* ekstrelerinin HPLC-MS analizleri

Rt (MS)	M-H	MS2	Tanımlama	Ekstre
6.6	-	-	Bilinmeyen	17Eİ, 18Eİ
8.0	-	-	Bilinmeyen	17Eİ, 18Eİ
9.1	393	375, 231, 213, 191	Bilinmeyen	17Eİ, 18Eİ
10.2	487	179, 161, 135	Bilinmeyen Kafeik asit türevi	17Eİ, 18Eİ
10.3	209	191, 173	Sakkarik asit benzeri	17Eİ, 18Eİ
11.9	137	109	Protokateşik aldehit	17Eİ, 18Eİ
12.5	353	191,179,135	Kafeoilkinik asit	17EİM, 18EİM
15.7	179	135	Kafeik asit	17EİM, 18EİM
16.2	755	623, 462, 305, 179, 161, 135	Lavandulifoliosit	17EİM, 18EİM
16.5	623	461, 161, 135	Verbaskozit benzeri	17EİM, 18EİM
17.9	245	203,159	Bilinmeyen	17EİM, 18EİM
18.3	507	179, 161, 135	Bilinmeyen Kafeik asit türevi	17EİM, 18EİM
19.1	453	349	Bilinmeyen	17EİM, 18EİM
19.4	449	269	Apigenin glukozit benzeri (Apigenin + 180)	17Eİ, 18Eİ
19.9	609	300, 271, 179, 151	Kersetin rutinozit	17Eİ, 18Eİ
20.2	463	300, 271, 255	Kersetin glukozit	17Eİ, 18E
21.4	431	267	Apigenin glukozit	17E, 18E
23.7	405	387, 343, 301,	Bilinmeyen	17EM, 18EM
24.5	207	179, 161, 135	Bilinmeyen kafeik asit türevi (etil esteri olabilir)	17EM
26.7	577	431, 269	Apigenin rutinozit	17E, 18E
27.4	327	309, 291	Bilinmeyen	17E, 18E
29.6	293	249, 236, 221	Bilinmeyen	17Eİ, 18Eİ
32.2	283	268, 239, 211, 151, 117	Genkvanin	17EM, 18EM

E: Etanol ekstresi, M: Metanol ekstresi, İ: İnfüzyon

Tablo 5.23. *L. glaucescens* ekstrelerinin HPLC-MS analizleri

Rt (MS)	M-H	MS2	Tanımlama	Ekstre
6.6	-	-	Bilinmeyen	19,20,26 Eİ
8.0	279	117	Bilinmeyen	19,20,26 Eİ
9.0	315	152, 108	Protokateşik asit heksozit	19,20,26 Eİ
9.7	341	179, 161	Kafeoil glukozit	19,20,26 Eİ
10.2	393	231, 213, 191	Bilinmeyen	19,20,26 Eİ
12.5	353	191, 179, 135	5-Kafeoilkinik asit	19,20,26 Eİ
13.4	387	207, 163	Mediarsinol veya İkarisit B5 benzeri	19,20,26 EİM
15.7	179	135	Kafeik asit	19,20,26 EİM
16.1	755	593, 461, 161	Lavandulufoliosit	19,20,26 EİM
16.5	623	461, 161, 135	Verbaskozit benzeri	19,20,26 EİM
18.3	507	179, 161, 135	Bilinmeyen Kafeik asit türevi	19,20,26 E
19.4	447	285,151	Luteolin /kamferol glukozit	19,20,26 Eİ
19.9	609	300, 271, 179, 151	Kersetin rutinozit	19,20,26 EİM
20.2	463	300, 271, 255	Kersetin glukozit	19,20,26 EM
20.9	505	300, 271,179	Kersetin asetilglukozit	19,20,26 E
21.9	593	447, 285	Luteolin/kamferol rutinozit	19,20,26 E
24.5	581	461, 342, 315, 299, 119	Bilinmeyen C glukozit	19,20,26 EM
27.4	327	291, 229, 211,171	Bilinmeyen	19,20,26 EİM (20M eser)
29.6	407	363, 299, 177, 151	Bilinmeyen	19,20,26 Eİ
32.2	283	268, 239, 211, 151, 117	Genkvanin	19,20,26 E

E: Etanol ekstresi, M: Metanol ekstresi, İ: İnfüzyon

Tablo 5.24. *L. cardiaca* ekstrelerinin HPLC-MS analizleri

Rt (MS)	M-H	MS2	Tanımlama	Ekstre
6.6	-	-	Bilinmeyen	NS 21M ve 28M hariç tüm <i>L. cardiaca</i> ekstreleri
8.0	363	201, 183, 165, 157	Bilinmeyen	NS 21M ve 28M hariç tüm <i>L. cardiaca</i> ekstreleri
9.0	447	315, 135	Bilinmeyen	NS 21M-22İ 23 hariç tüm <i>L. cardiaca</i> ekstreleri
9.7	341	179, 161	Kafeoil glukozit	NS 2 İ, 21 E, 28İ
10.2	393	231, 213, 191	Bilinmeyen	NS22M, 23M, 24M, 28M hariç tüm <i>L. cardiaca</i> ekstreleri
12.5	353	191,179,135	Kafeoilkinik asit	Tüm <i>L. cardiaca</i> ekstreleri NS22İ ve 22M'de eser miktarda
15.7	179	135	Kafeik asit	NS28İEM NS22EM hariç tüm ekstreler
16.1	755	593, 461,161	Lavandulufoliosit	Tüm ekstrelerde eser
16.5	623	461, 161, 135	Verbaskozit	NS27İ ve NS27M hariç tüm ekstreler
18.3	507	179, 161, 135	Bilinmeyen Kafeik asit türevi	NS22M hariç tüm ekstreler
19.9	609	300, 271, 179, 151	Kersetin rutinozit	Tüm ekstrelerde M kodlularda eser
20.2	463	300, 271, 255	Kersetin glukozit	Tüm ekstrelerde M kodlularda eser
24.5	581	461, 342, 315, 299, 119	Bilinmeyen C glukozit	NS21EM, 22M, 23M 27E, 28EM
29.6	407	363, 299, 177, 151	Bilinmeyen	Tüm ekstrelerde eser miktar
32.2	283	268, 239, 211, 151, 117	Genkvanin	İnfüzyon hariç tüm ekstrelerde

E: Etanol ekstresi, M: Metanol ekstresi, İ: İnfüzyon

5.7.1. Tanımlamalar

Kolonu 9.5 dk'da terk eden ve m/z 315 $[M-H]^-$ moleküler ağırlığa sahip molekül yapısından bir heksoz (-162 amu) kopartarak m/z 153 protokateşik asit veya genistik asit asit olması muhtemel fragment iyonunu vermiştir (Şekil 5.78). Molekülden CO₂ (-44 amu) kopması ile oluşan m/z 109 iyonu da yapıda karboksilik asit olduğunu doğrulamaktadır. *Leonurus* cinsinde m/z 316 molekül ağırlıklı Leoheteronin A,

Leoheteronin B ve Leoleorin A tanımlanmış olmasına rağmen bu maddelerin hiçbirinde elde edilen parçalanmaları gösterecek yapıya sahip olmadığından 9.5 tutunma zamanı ile kolonu terk eden madde protokatesik asit heksozit veya genistik asit heksozit olarak tanımlanmıştır. Kütle spektrum verileri bu iki madde ile eşleşmektedir [334].

Kolonu 9.5 dk'da terk eden ve m/z 341 $[M-H]^-$ moleküler ağırlığa sahip molekül, yapısından bir heksoz (-162 amu) kopartarak m/z 179 iyonunu ve sonrasında H_2O (-18 amu) kaybı ile de m/z 161 iyonunu, yapıdan CO_2 çıkışı ile de m/z 135 iyonu oluşturmuştur (Şekil 5.79). Bu hali ile madde kafeoil heksozit olarak tanımlanmıştır. Kütle spektrum verileri kafeoil glukozit ile eşleşmektedir [236]. Kafeik asit *Leonurus* cinsinde bulunmaktadır [46] ve m/z 179 $[M-H]^-$ moleküler iyon piki ve m/z 179 ve m/z 135 iyonları ile kolonu 16. dk' da terk etmiştir (Şekil 5.74).

Ekstrelerde Kafeik asit ve kinik asit esterleşmesi de görülmektedir. Kolonu 13. dakikada terk eden m/z 353 $[M-H]^-$ moleküler iyon pikli madde temel pik olarak m/z 191 (kinik asit) iyonu ve kafeik asit esterleşmesi sonucu oluşan ve yukarıda bahsedilen parçalanmalardan m/z 179, m/z 161 ve m/z 135 iyonlarını göstermiştir (Şekil 5.75). m/z 179 iyonunun bağıl yoğunluğunun düşük olması bağlanmanın kinik asitin 5 numaralı C'nuna bağlı OH grubu üzerinden olduğunu düşündürmektedir ve bu hali ile madde 5-Kafeoilkinik asit olarak tanımlanmıştır. Spektrum verileri literatür verileri ile uyumludur [335]. *Leonurus* üyelerinde kafeoilkinik asitlere rastlanmıştır [46].

Kolonu 18. dakikada terk eden m/z 359 $[M-H]^-$ moleküler iyon pikli madde m/z 197 $[M-H-162]$ m/z 179 (kafeik asit) ve m/z 161, m/z 135 parçalanma iyonları göstermiştir. Kafeik asitle ilişkilendirilemeyen parçalanma ürünü ise m/z 153 olarak görülmüştür (Şekil 5.83). Rozmarinik asit, kafeik asit ve 3-(3,4-dihydroxyphenyl) laktik asit (m/z 197 $[M-H]^-$) esterleşmesiyle oluşur ve m/z 153 hariç benzer parçalanmalar gösterir [336]. *Leonurus* türlerinde rozmarinik asit bulunduğuna dair literatür bilgileri vardır [43]. Bu haliyle madde rozmarinik asit benzeri olarak adlandırılmıştır.

Ekstrelerde bulunan bir diğer kafeik asit türevi de kolonu 17. dakikada terk eden verbaskozit olmuştur. m/z 623 $[M-H]^-$ moleküler iyon piki ve kafeoil kaybı ile oluşan m/z 461 iyonu ($M-H-162$) spektrumda görülmektedir. Sonraki parçalanmalar m/z 315, 300, 161 ve 135 de eser miktarda görülmektedir (Şekil 5.82). Literatür verilerine göre bu madde verbaskozit olmalıdır [337] ve *Leonurus* cinsinde önceden tanımlanmıştır [127].

L. cardiaca, *L. glaucescens* ve *L. quinquelobatus*'ta rastlanan bir diğer kafeik türevi lavandulifoliosit olmuştur. m/z 755 $[M-H]^-$ moleküler iyon piki ve 162 amu kafeoil grubu

kaybıyla oluşan m/z 593 iyonu ve 132amu pentoz kaybıyla oluşan m/z 461 iyonu ve kafeik asit parçalanmalarından olan m/z 161 iyonu spektrumda görülmektedir (Şekil 5.76). Madde bu parçalanma şekli ile literatürde daha önce tanımlanan lavandulifoliosit ile uyushmaktadır [338] ve *Leonurus* cinsinde daha önce tanımlanmıştır [178].

m/z 507 $[M-H]^-$ moleküler iyon pikli madde tüm ekstrelerde görülmüş ve karakteristik kafeik asit parçalanmaları gösterdiği için bilinmeyen kafeik asit türevi olarak adlandırılmıştır (Şekil 5.85).

Kersetin türevlerine tüm ekstrelerde rastlanmıştır. Tüm kersetin türevleri yapılarında aglikonun glikondan homolitik veya heterolitik ayrılmasına bağlı olarak sırasıyla m/z 300 veya m/z 301 iyonları ve sonrasında oluşan m/z 271 iyonu karakteristik kersetin parçalanmasıdır [339] m/z 179 ve 151 iyonları da molekülün elajik asitten ayrılmasında yardımcı olmuştur [340].

Kersetinden 162 amu fazla moleküler iyon piki ve aglikon kersetin parçalanmalarına sahip m/z 463 $[M-H]^-$ moleküler iyon pikli madde kersetinle arasındaki 162 farktan dolayı Kersetin heksozit olarak tanımlanmıştır. *Leonurus* 'larda kersetin glukozit (izoksetin) ve kersetin galaktozit (hiperozit) önceki çalışmalarda tanımlandığından [58, 73], madde kersetin heksozit olarak tanımlanmıştır (Şekil 5.77). Sadece *L. glaucescens* Etanol ekstrelerinde kersetin heksozitten 42 amu fazla ile karakterize kersetin asetil heksozit bulunmuştur. Asetil kopması spektrumda m/z 463 olarak kendini göstermektedir (Şekil 5.79). *L. persicus* 'ta ise kersetin heksozit den 162 amu fazla moleküler iyon pikine sahip madde (Şekil 5.78) kersetin diheksozit olarak tanımlanmıştır [46].

Kersetinden 309 amu fazla moleküler iyon piki ve aglikon kersetin parçalanmalarına sahip m/z 609 $[M-H]^-$ moleküler iyon pikli madde kersetinle arasındaki 309 farktan dolayı Kersetin rutinozit olarak tanımlanmıştır (Şekil 5.80). *Leonurus* 'larda kersetin 3-O rutinozit (rutin) önceki çalışmalarda tanımlanmıştır [58].

m/z 269 aglikona bağlı heksoz ve rutinoz esterlerine taşıyan sadece *L. quinquelobatus* 'ta rastlanmıştır. m/z 269'un apigenin olma ihtimali yüksek görülmüştür zira apigenin glukozit (Şekil 5.87-5.88) *L. quinquelobatus* türünde daha önceden tanımlanmıştır [83]. Apigenin 7-metil eter olarak da bilinen genkvanin m/z 283 $[M-H]^-$ moleküler iyon piki ve metil kopmasına bağlı olarak ortaya çıkan apigenin radikal aglikon iyonu m/z 268 spektrumda görülmektedir. Genkvanin *Leonurus* 'lar için kimyasal bir

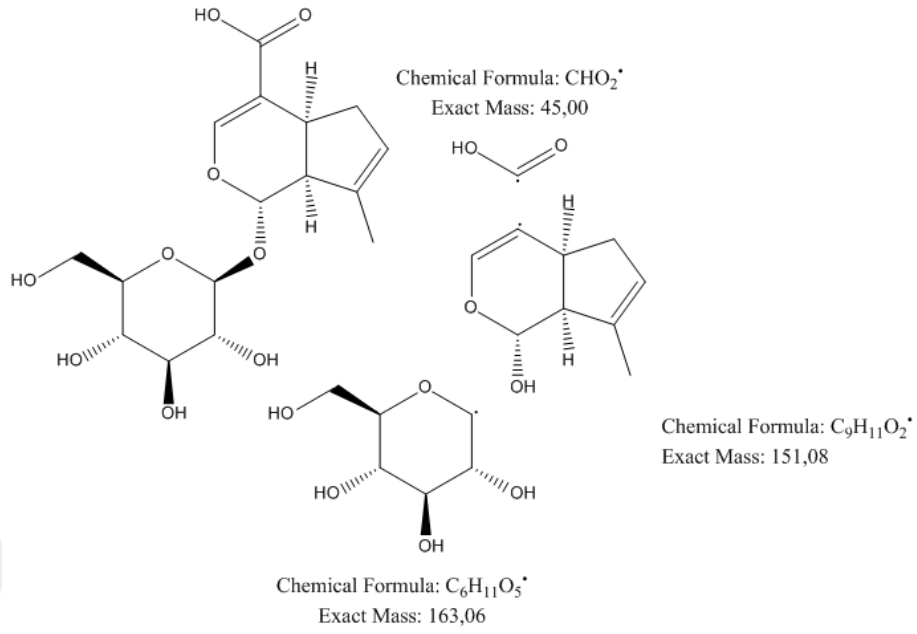
marker olarak da bilinir [341] ve tüm ekstrelerde rastlanmıştır (Şekil 5.92). Parçalanmalar genkvanin literatür bilgileri ile uyumludur [342].

L. glaucescens'de rastlanan ve m/z 285 iyonu aglikon (luteolin veya kamferol) olarak taşıyan iki madde luteolin/kamferol glukozit ve luteolin/kamferol rutinozit içinde yapılmıştır. Bu maddelerin moleküler iyon pikleri sırasıyla aglikondan 162 amu ve 309 amu fazla bulunduğu için bu şekilde tanımlanmıştır (Şekil 5.93-5.95). *Leonurus* 'larda Luteolin ve kamferol türevlerine rastlandığı için bu maddeler için bir ayırım yapılmamıştır [58].

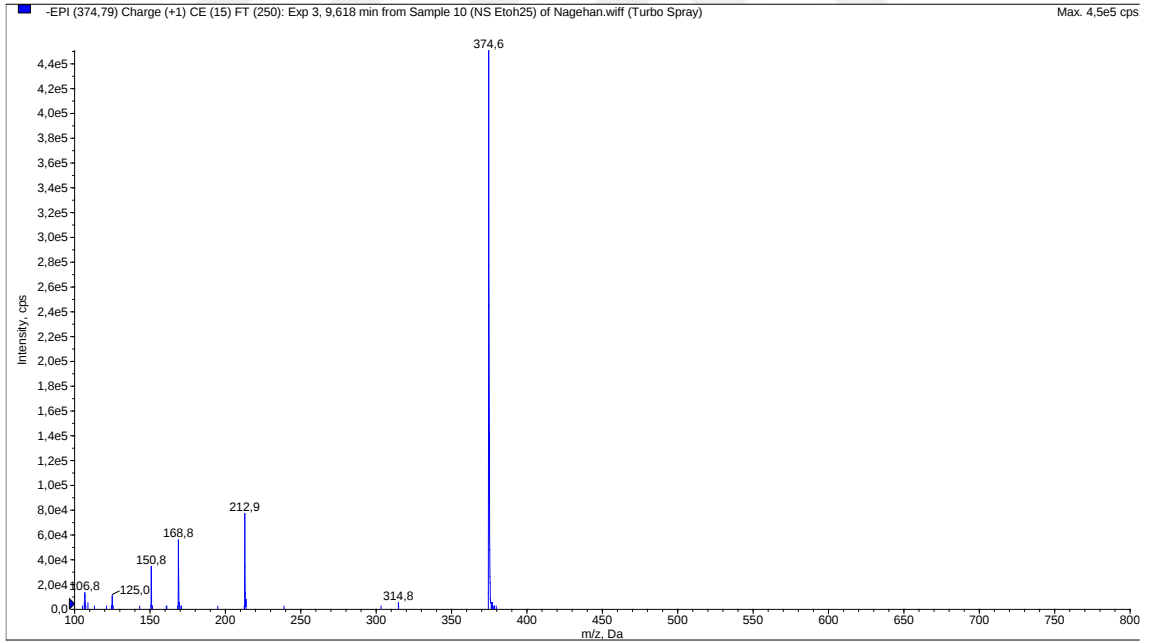
Verbaskozit ile beraber kolonu terk eden m/z 357 $[M-H]^-$ moleküler iyon pikli madde temel pik olarak m/z 195 iyonunu göstermiştir. Moleküler iyon piki ve temel pik arasındaki 162 amu'luk fark glukoz kaynaklı olmalıdır. Molekülde ayrıca 44 amu'luk CO_2 çıkışı m/z 151 iyonu ile gözlemlenmiştir (Şekil 5.81). Yapılan literatür çalışmalarında *L. persicus* 'ta m/z 357 $[M-H]^-$ moleküler iyon pikine sahip yapısında Karboksilik asit ve şeker bulunan maddeler araştırıldığında, iridoit glikozit yapısındaki deoksigeniposidik asidin bu tanımlamalara uyduğu görülmüştür [143] (Şekil 5.70).

330 nm'de yüksek UV absorbansı beraber geldiği verbaskozit kaynaklı olarak değerlendirilmiştir. Spektrum bilgilerinde görülen m/z 107 su çıkışıyla ilgili olmalıdır. Molekül yapı parçalanma davranışı olarak trihidroksi sinnamik asit glukozitlere de benzerlik göstermektedir [343]. Bu şekilde yüksek UV absorbansı ve su çıkışı ve spektrumda eser miktarda görülen m/z 177 iyonu daha kolay izah edilebilir hale gelmektedir. İki molekül'den birisi olduğu düşünülen bu madde için beraberinde gelen verbaskozit absorbansı yüzünden UV spektrum bilgilerinden faydalanılarak bir ayırım yapılamamış, fakat yine de *L. persicus* 'larda daha önce tanımlandığı göz önünde bulundurulduğundan tabloda bu madde deoksigeniposidik asit olarak adlandırılmıştır.

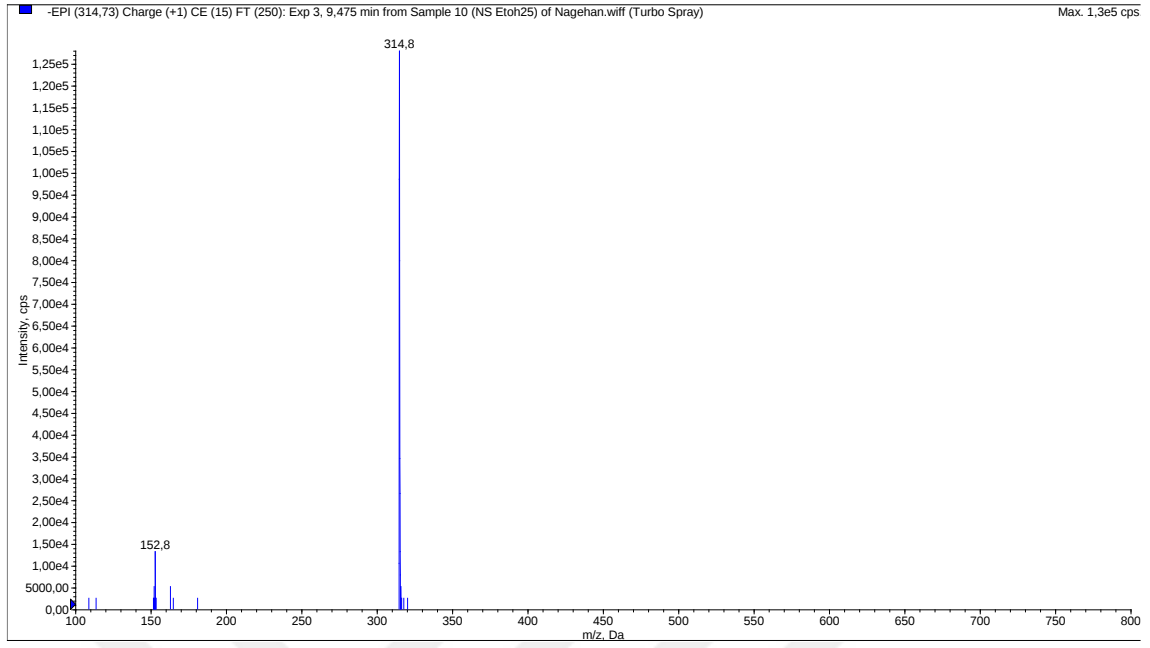
L. persicus 'ta tespit edilen diğer iridoit glukozitler m/z 375 $[M-H]^-$ moleküler iyon pikli ve sonrasında şeker ve CO_2 ve H_2O kayıpları ile sırası ile m/z 212, 169 ve 151 iyonlarını oluşturan loganik asit [143, 344] ve Glukarik asit olarak tespit edilmiştir. Loganik asit'in 7,8-epoxy-8-epi türevi *L. persicus* 'ta [143], Glukarik asit ise *L. japonicus* 'ta [345] daha önceki çalışmalarda tanımlanmıştır (Şekil 5.71).



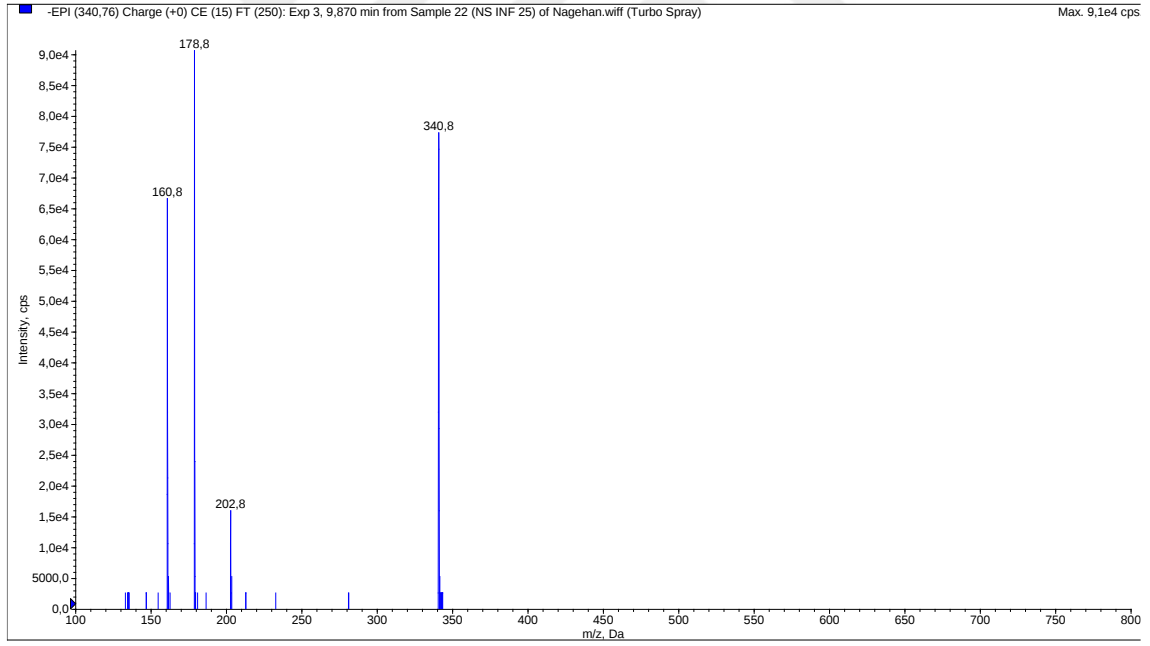
Şekil 5.70. Deoksigeniposidik asit Chemdraw ile çizilmiş parçalanmaları



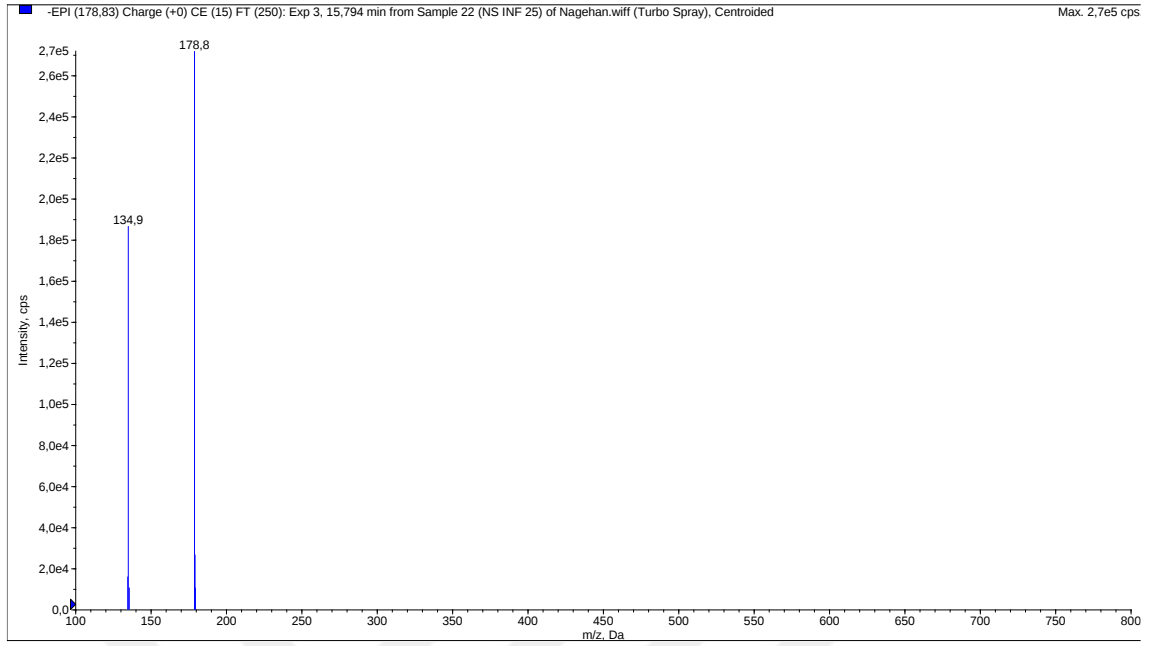
Şekil 5.71. Loganik asit kütle spektrumu



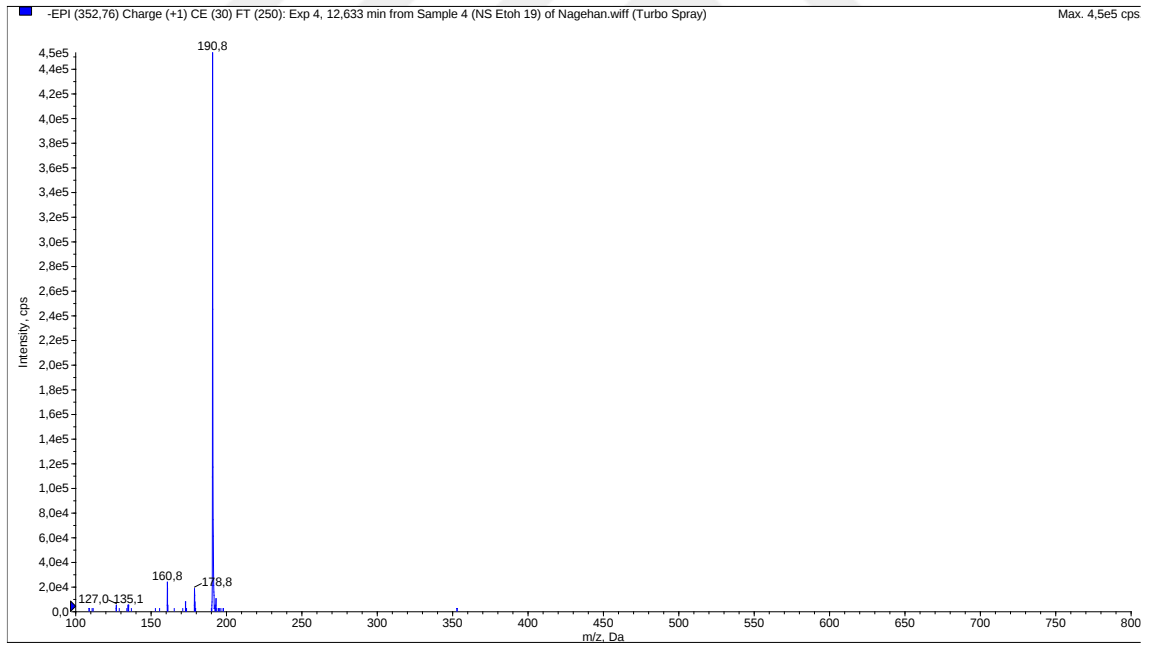
Şekil 5.72. Protokatesik asit heksozit kütle spektrumu



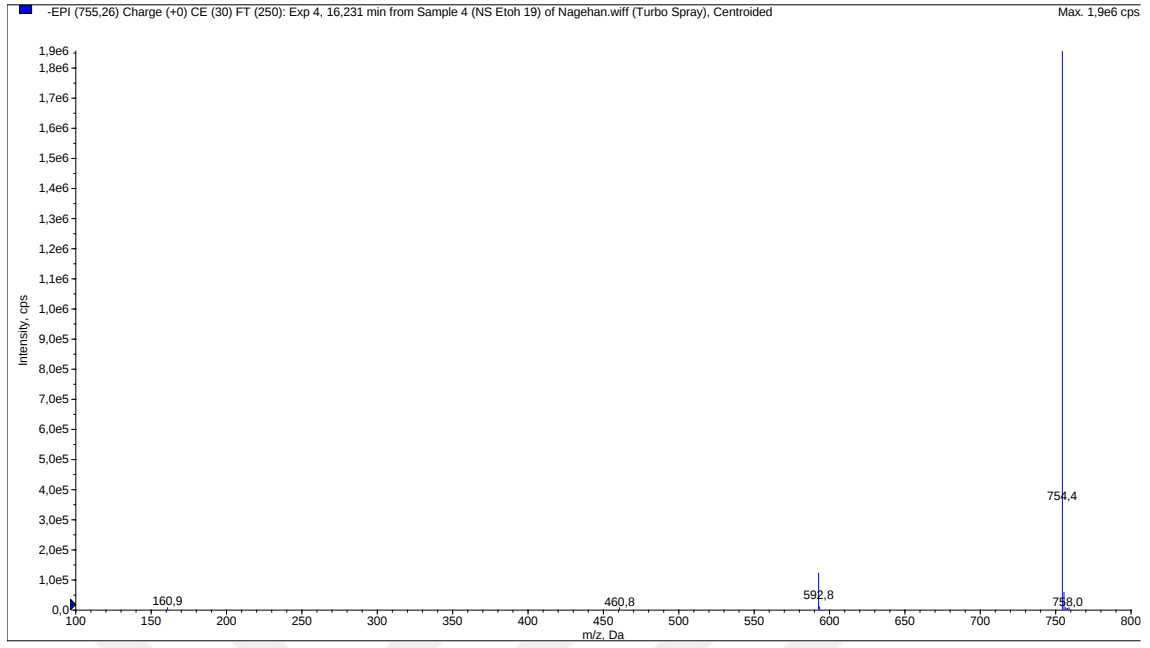
Şekil 5.73. Kafeoil heksozit kütle spektrumu



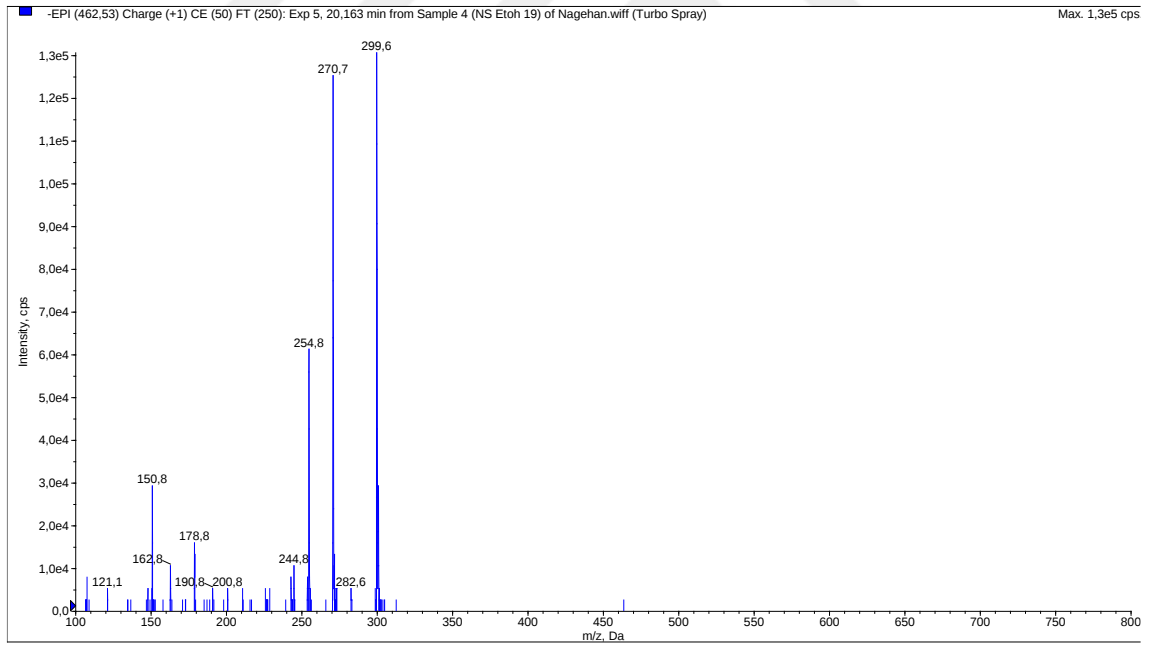
Şekil 5.74. Kafeik asit kütle spektrumu



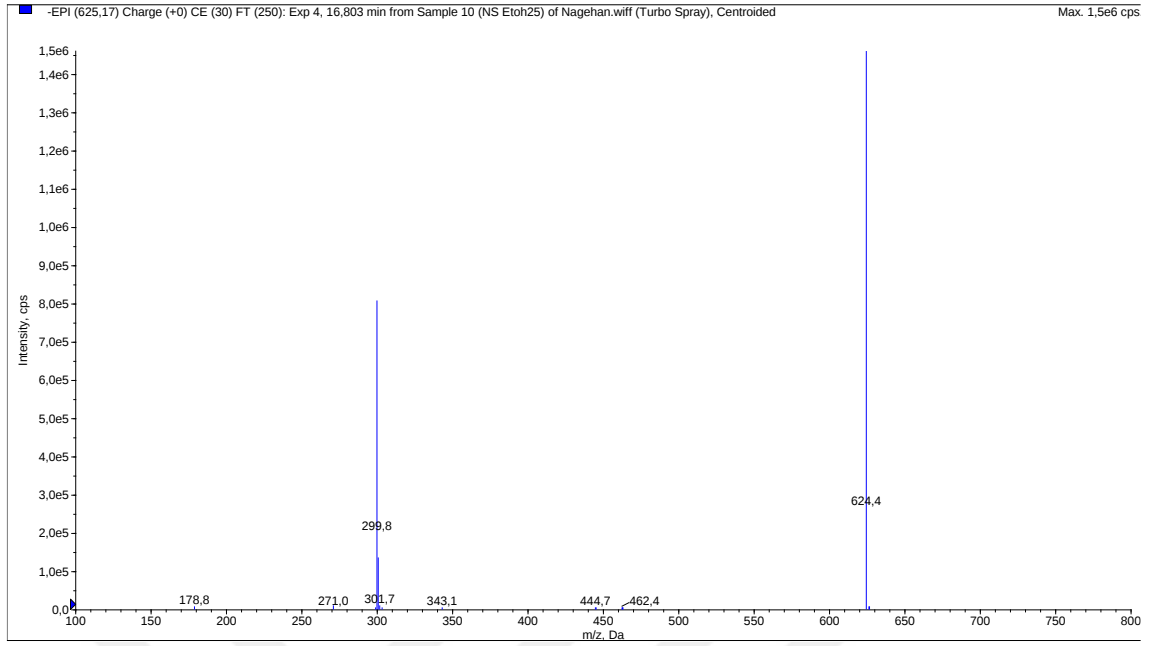
Şekil 5.75. 5-kafeoilkinik asit kütle spektrumu



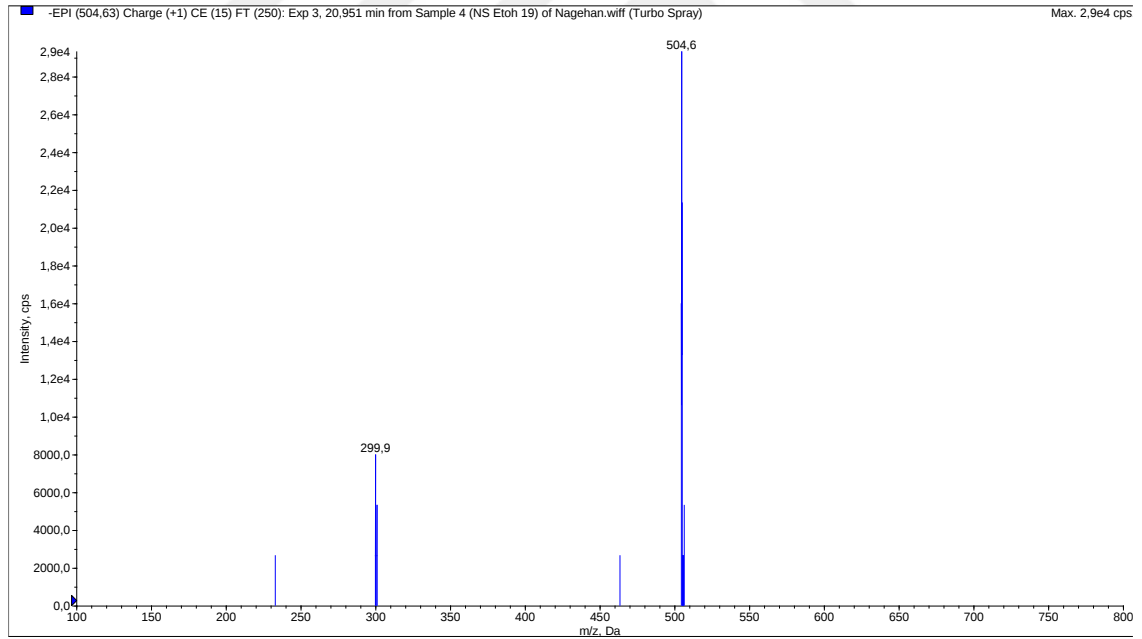
Şekil 5.76. *Lavandulifoliosit* kütle spektrumu



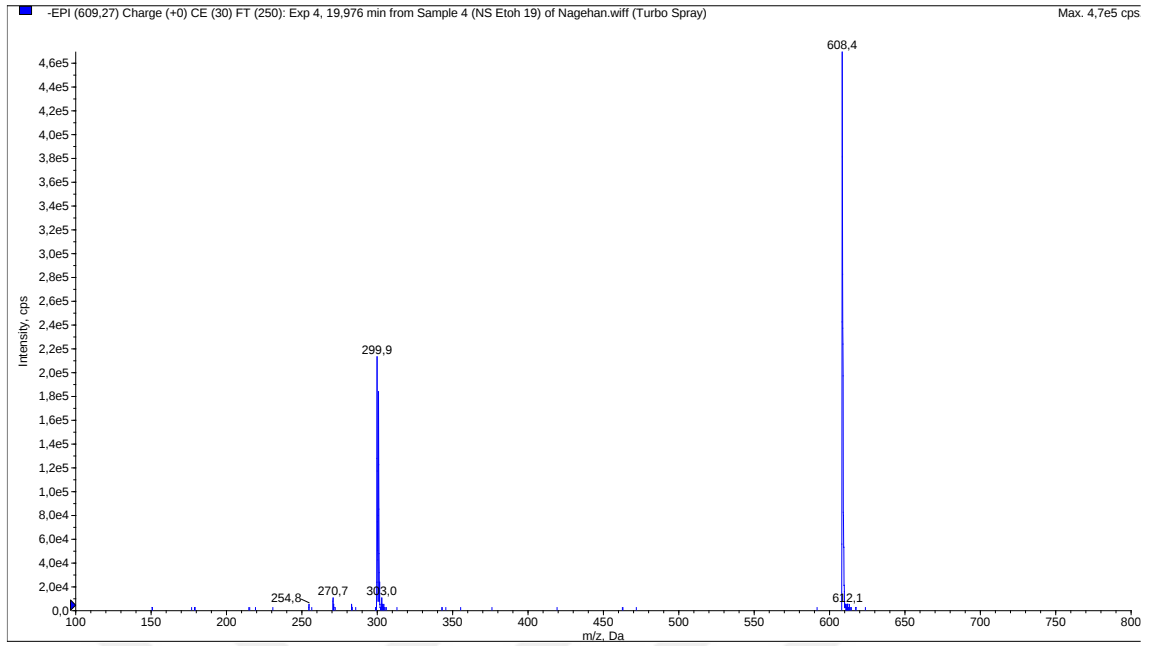
Şekil 5.77. *Kersetin heksozit* kütle spektrumu



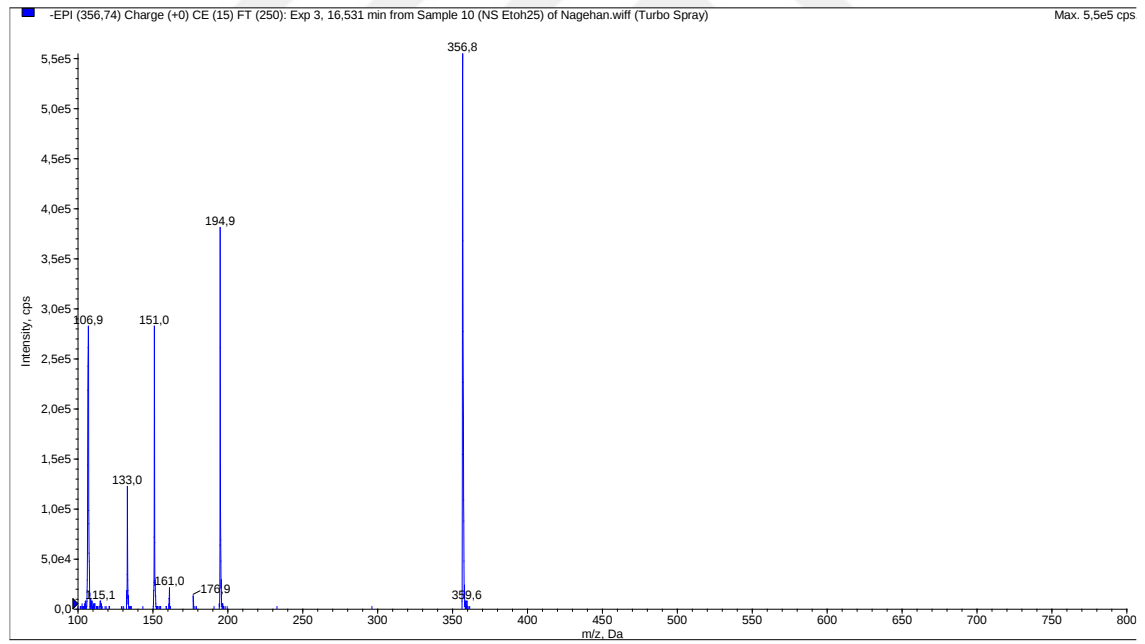
Şekil 5.78. Kersetin diglukozit kütle spektrumu



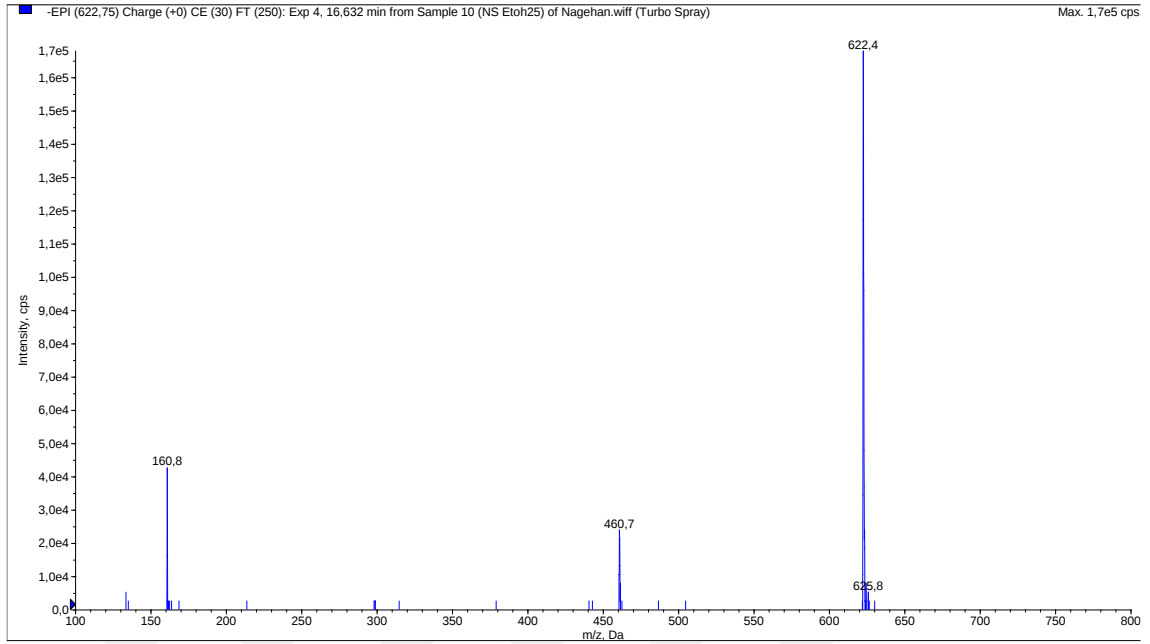
Şekil 5.79. Kersetin asetilheksozit



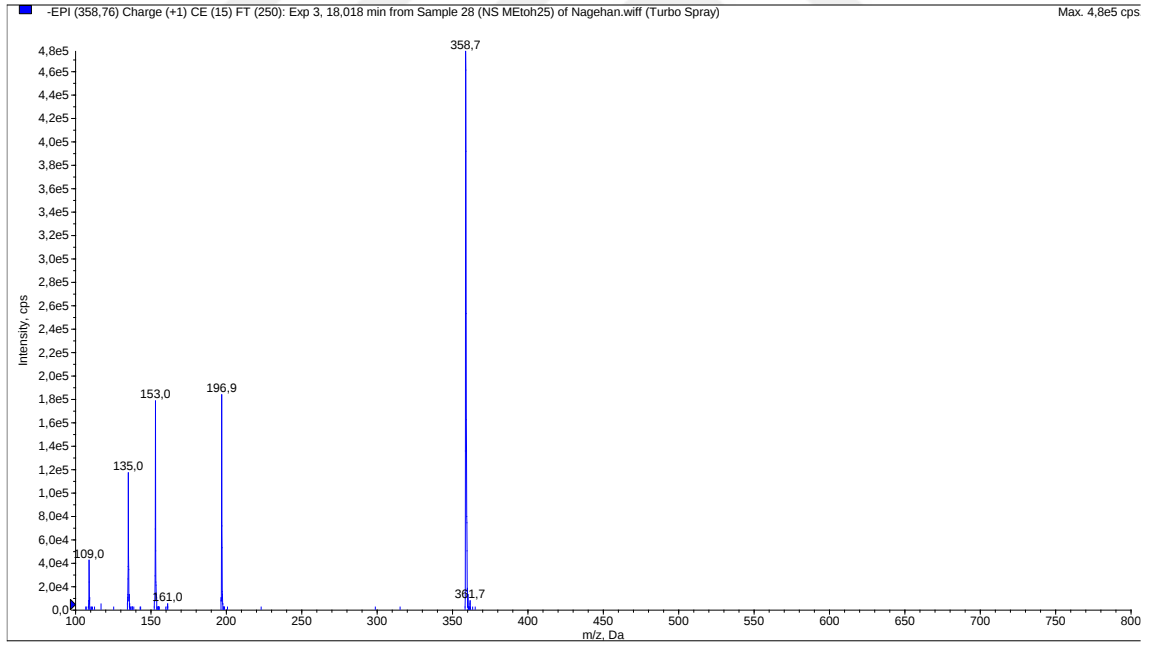
Şekil 5.80. Kersetin rutinozit kütle spektrumu



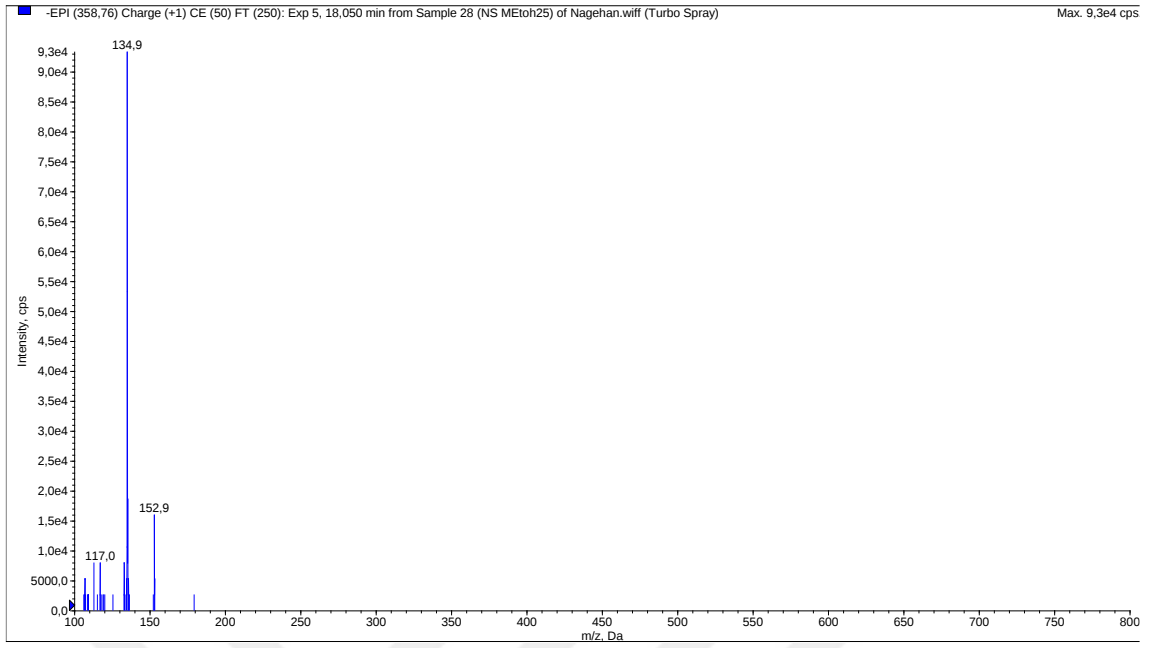
Şekil 5.81. Loganik asit veya trihidroksisinnamik asit-O-glukozit kütle spektrumu



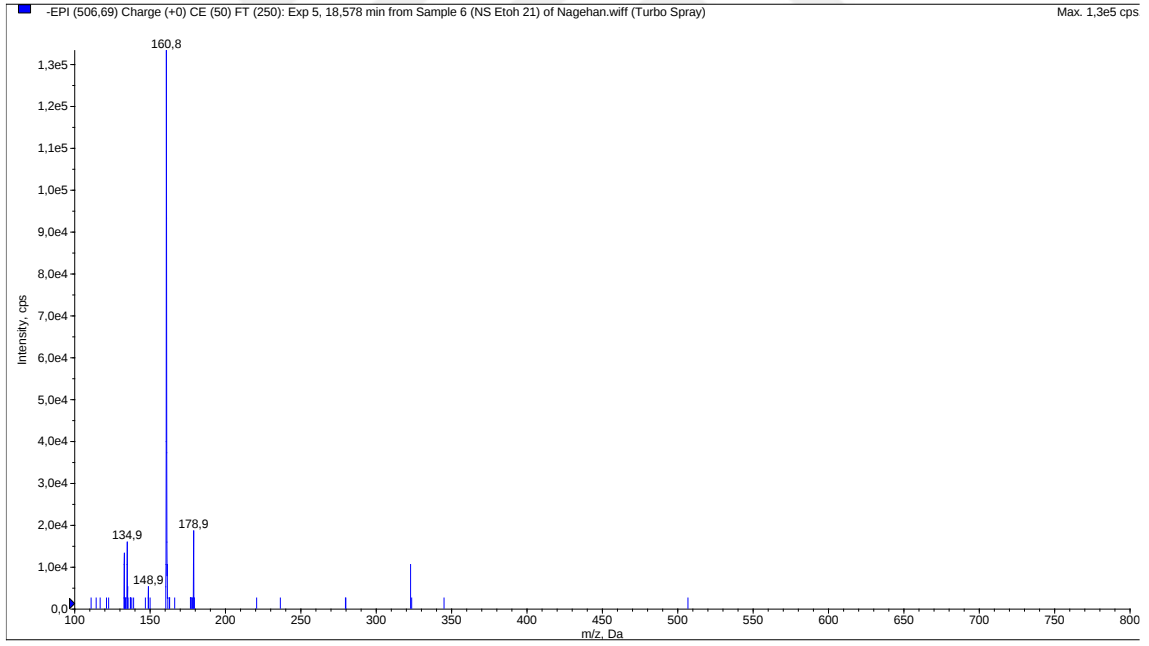
Şekil 5.82. Verbaskozit kütle spektrumu



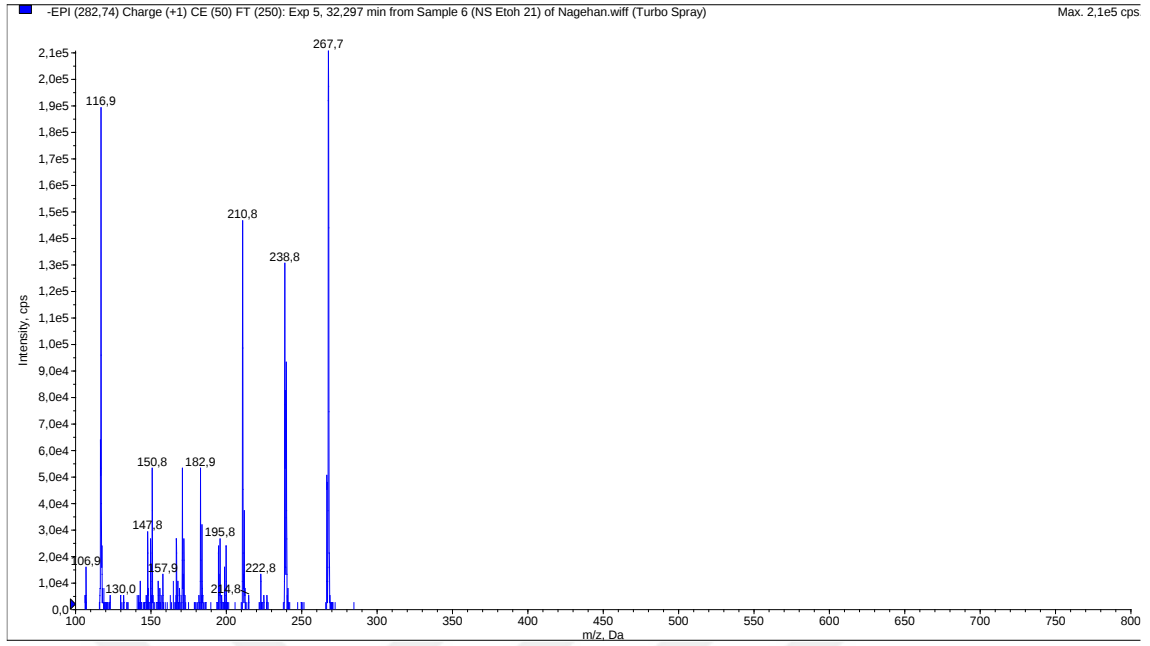
Şekil 5.83. Rozmarinik asit benzeri kütle spektrumu



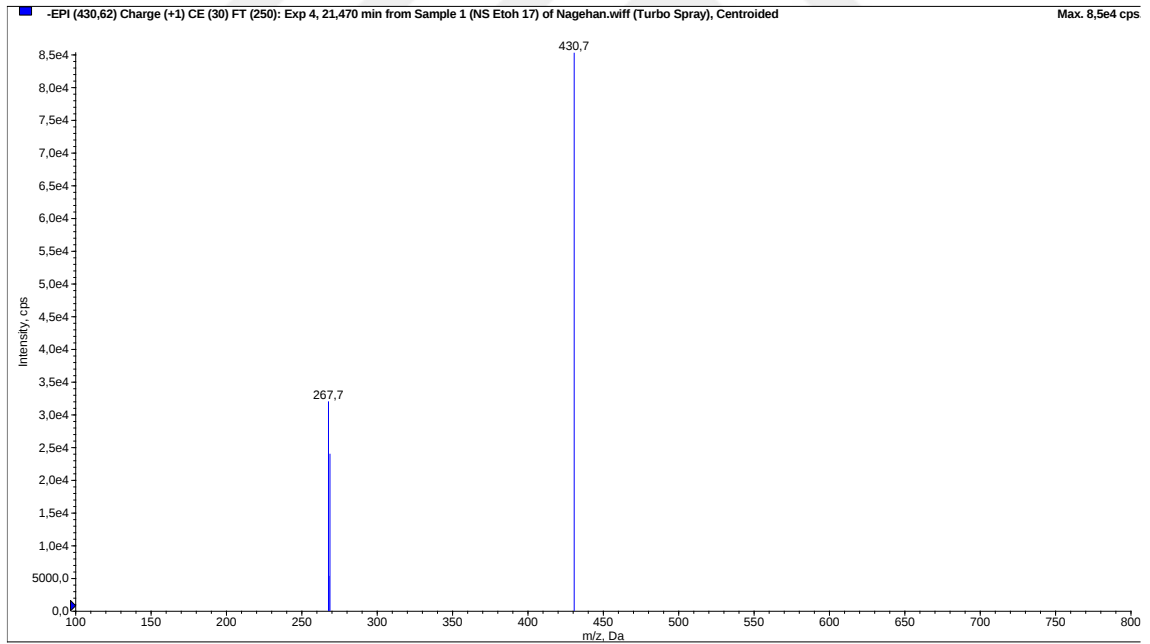
Şekil 5.84. *Rozmarinik asit CE 50*



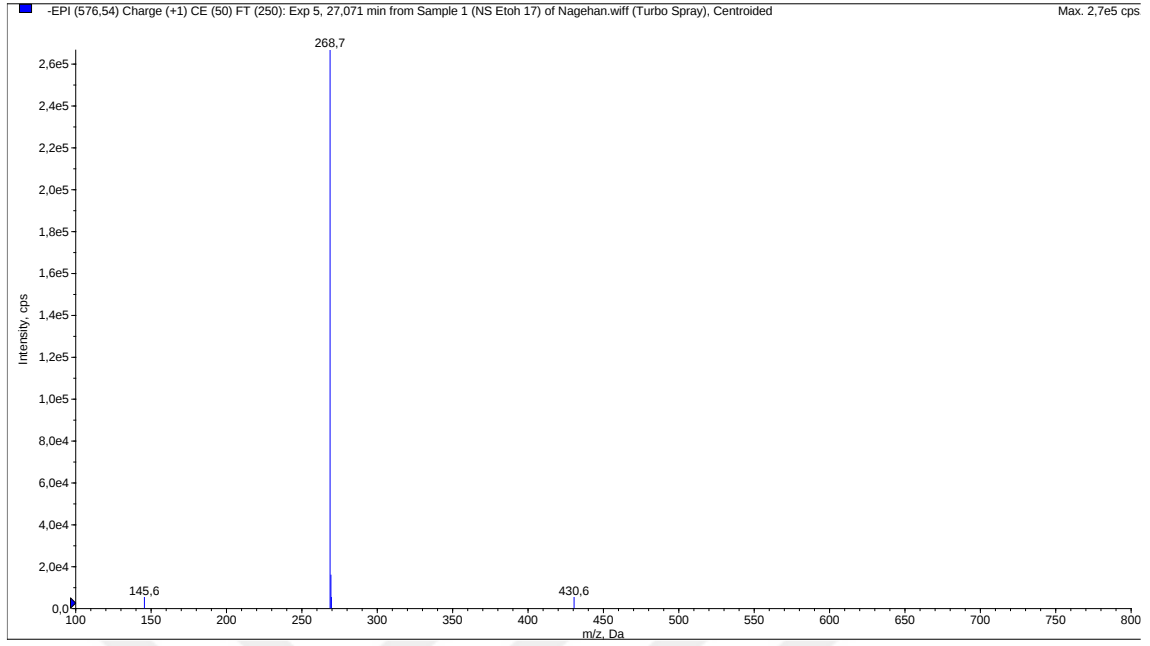
Şekil 5.85. *Bilinmeyen kafeik asit türevi kütle spektrumu*



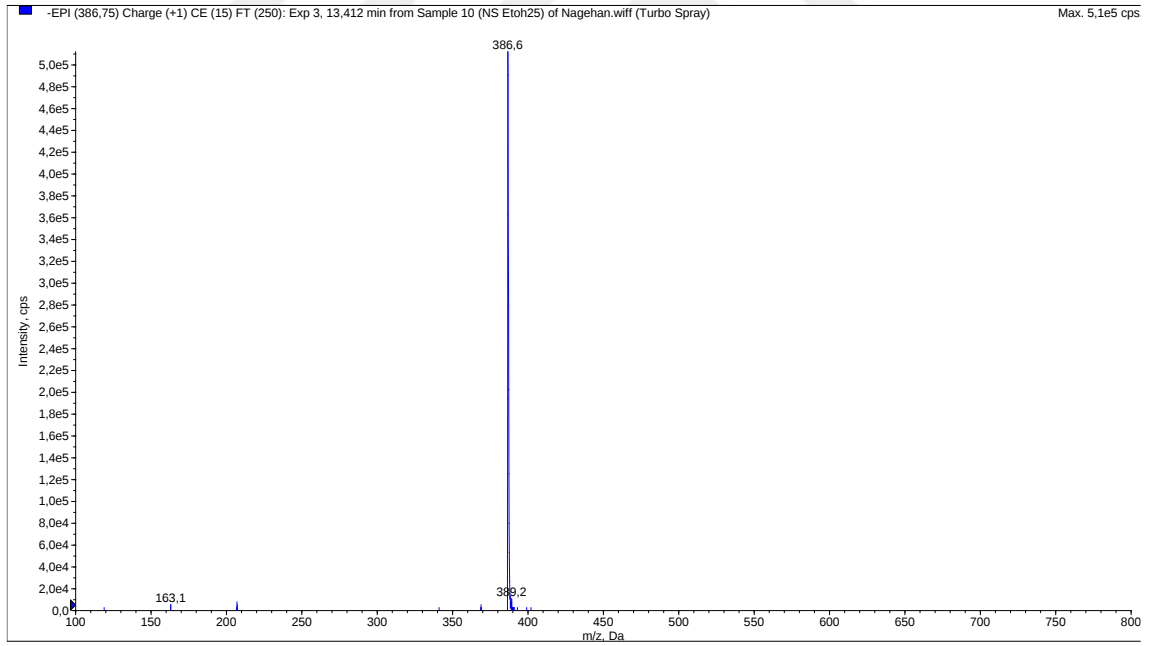
Şekil 5.86. Genkvanin kütle spektrumu



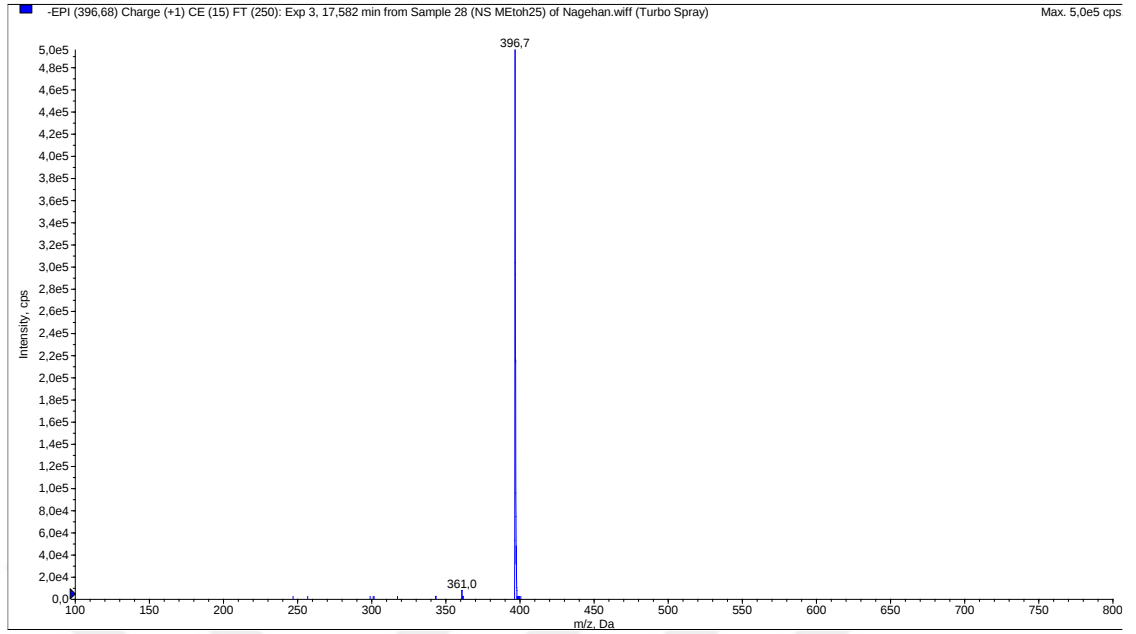
Şekil 5.87. Apigenin glukozit kütle spektrumu



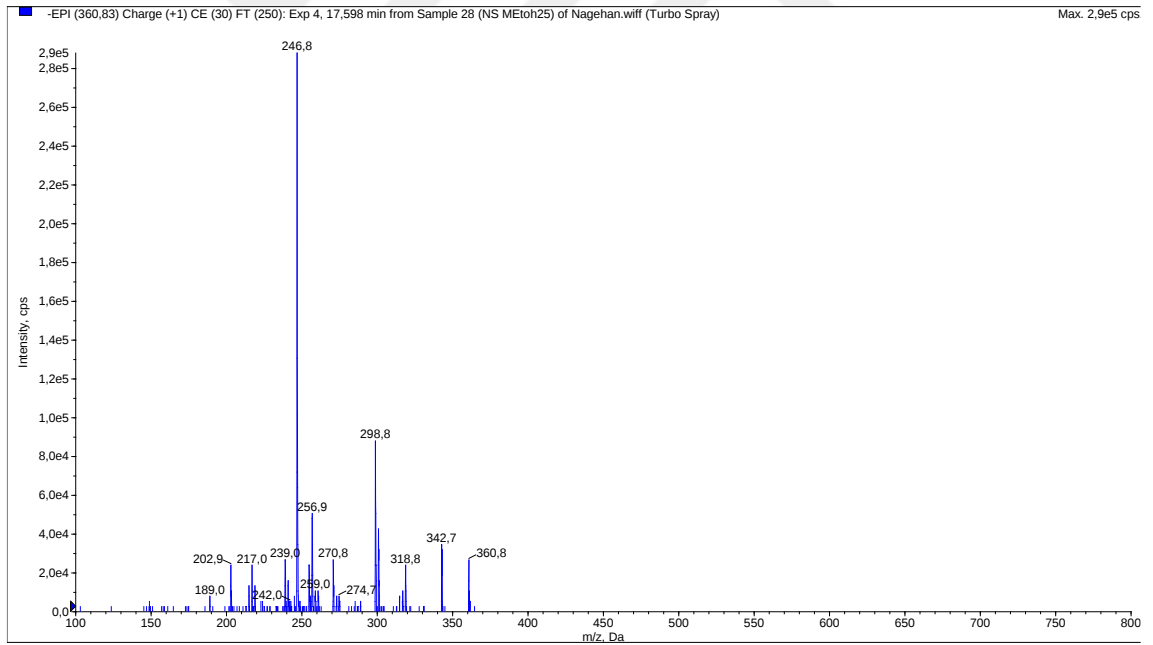
Şekil 5.88. Apigenin rutinozit kütle spektrumu



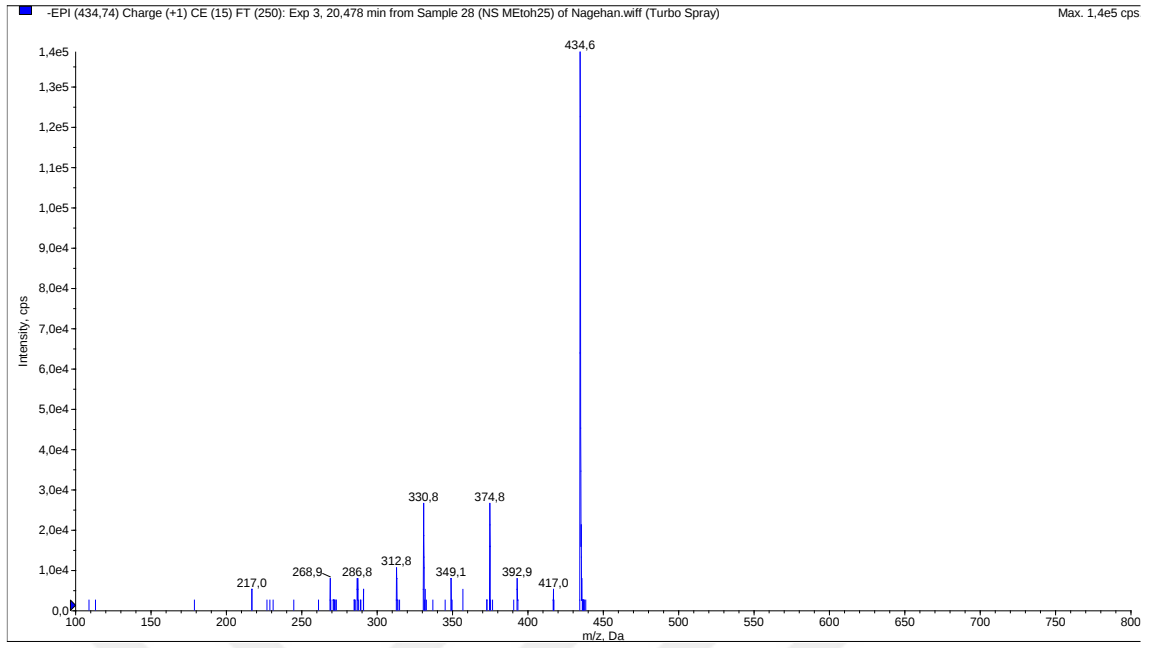
Şekil 5.89. Medioresinol veya ikarisit B5 benzeri kütle spektrumu



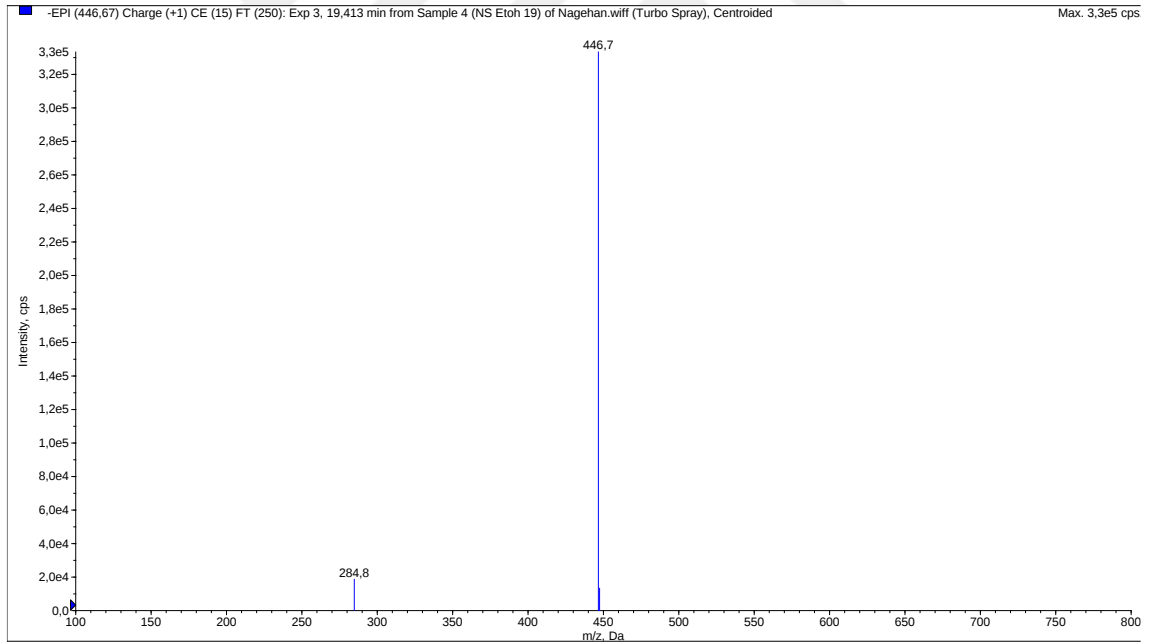
Şekil 5.90. Bilinmeyen kersetin türevi CE 15



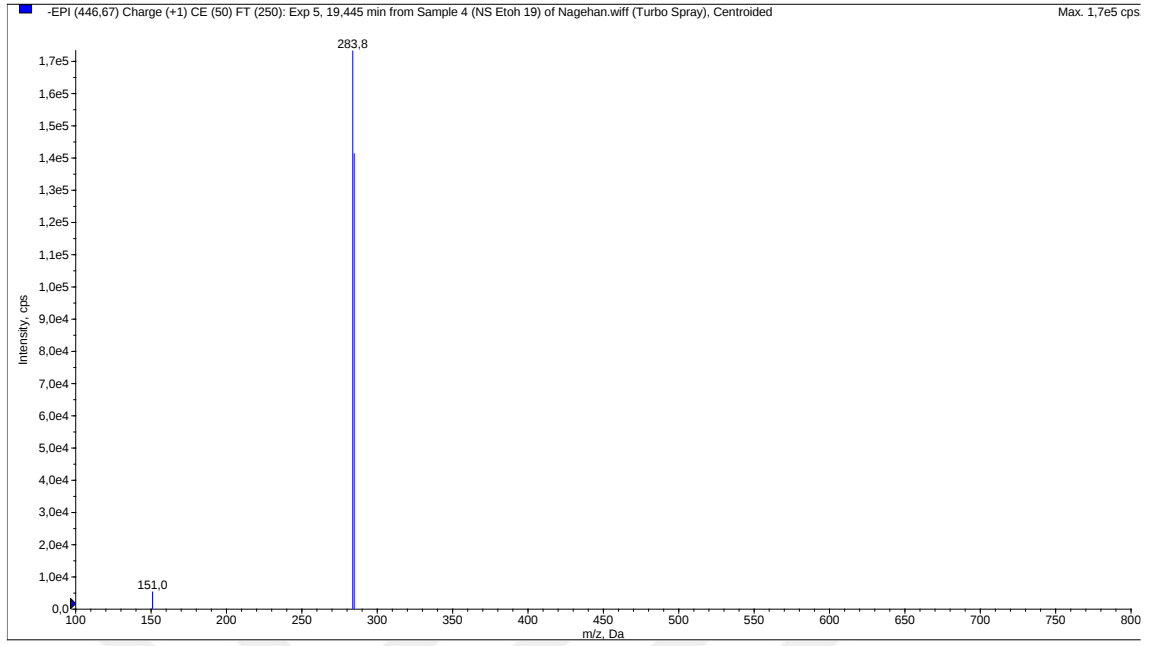
Şekil 5.91. Bilinmeyen kersetin türevi CE 30 361 (ayrıntılı)



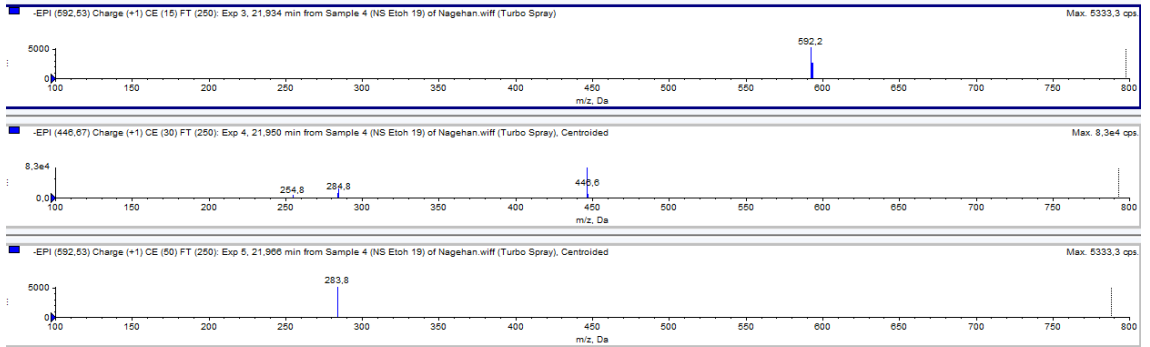
Şekil 5.92. Bilinmeyen maddeye ait kütle spektrumu



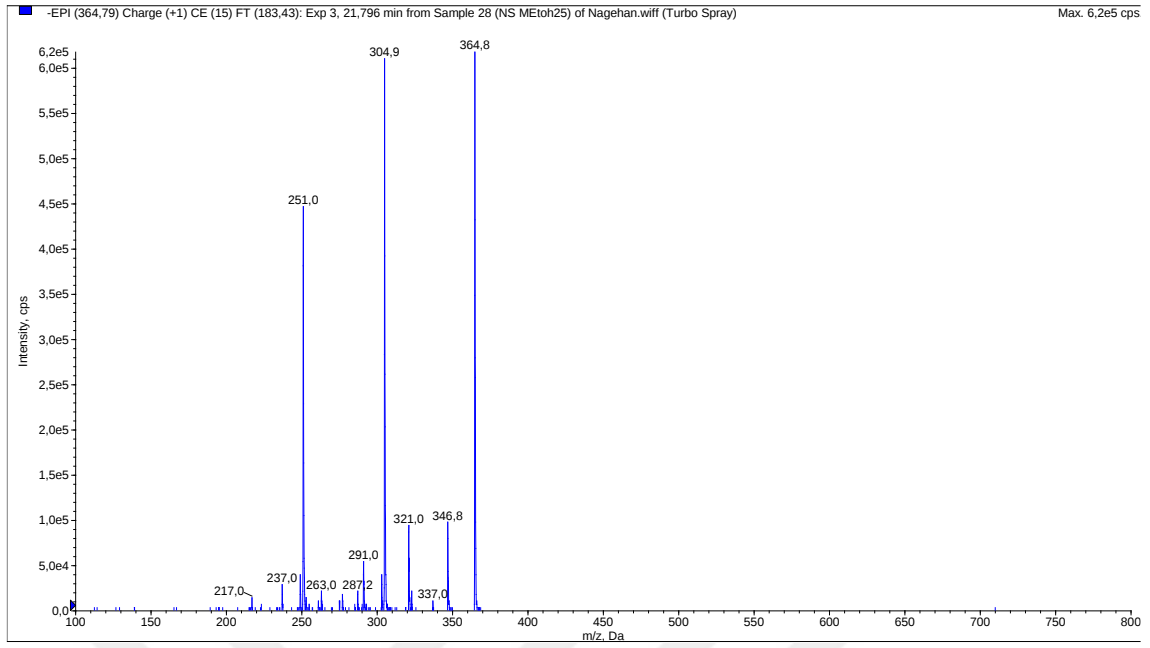
Şekil 5.93. Luteolin / kamferol glukozit kütle spektrumu CE 15



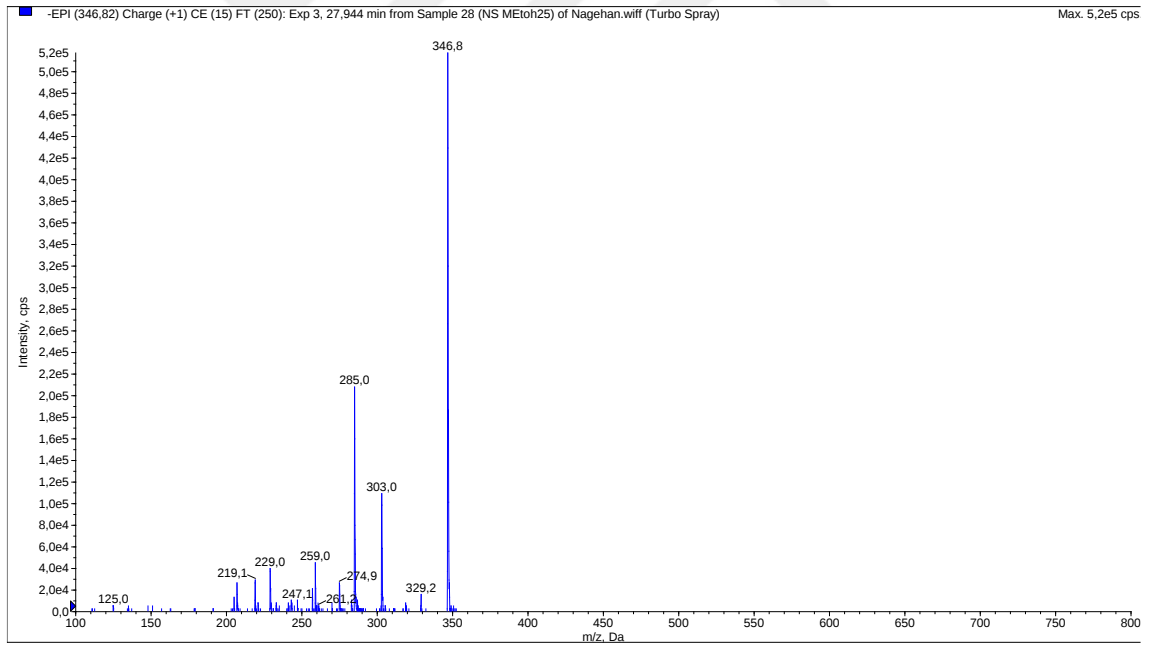
Şekil 5.94. Luteolin/kamferol glukozit kütle spektrumu CE 50



Şekil 5.95. Luteolin /kamferol rutinozit kütle spektrumu



Şekil 5.96. Bilinmeyen maddeye ait kütle spektrumu

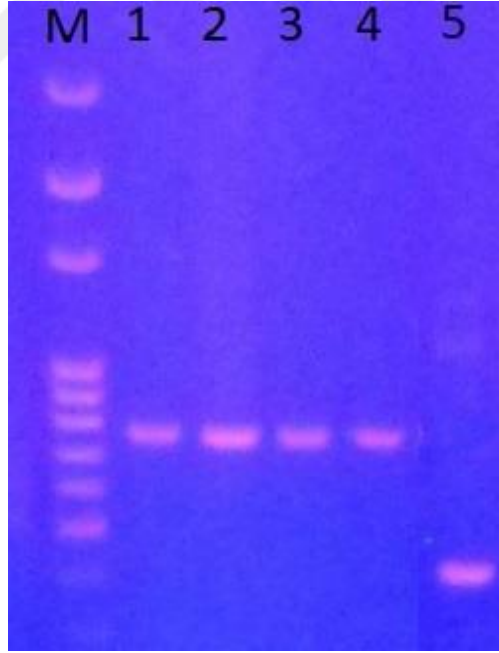


Şekil 5.97. Bilinmeyen maddeye ait kütle spektrumu

5.8. Moleküler Çalışmalara İlişkin Bulgular

Türkiye Florası'nda doğal yayılış gösteren *Leonurus* cinsine ait türleri kapsayan bu çalışmada şimdiye kadar kullanılan morfolojik karakterlere ek olarak, moleküler veriler kullanılarak filogenilerinin de aydınlatılması hedeflenmiştir. Bu amaçla elde edilen nuklear ribozomal DNA'nın ITS bölgeleri sekanslatılmış, sekans sonuçları değerlendirilmiştir. Primerlerin hem reversleri hem de forwardları kullanılarak sekanslama yapılmış, daha sonra elde edilen sekans bilgileri eşleştirilmiştir.

Bitki örneklerinden elde edilen genomik DNA'lara ITS primerleri ve gerekli kimyasallar kullanılarak yaklaşık 700 ve 350 bazlık bölgeyi çoğaltmak için tek aşamalı PCR işlemi gerçekleştirilmiştir. PCR reaksiyonu Solis Biodyne (Estonya) FIREPol® DNA Polymerase Taq polimeraz enzimiyle gerçekleştirilmiştir. PCR sonrasında agaroz jelde tek bant elde edilerek, PCR işleminin başarılı olduğu gözlemlenmiştir. Böylelikle PCR sonucunda taksonların gDNA'sının ITS bölgesi çoğaltılmıştır. Elde edilen *Leonurus* türlerine ait ITS bantlarının agaroz jel görüntüsü ise Şekil 5.98'de gösterilmiştir.



Şekil 5.98. *Leonurus* türlerinin ITS ile yapılan PCR görüntüsü

M: Markır, 1: *L. cardiaca* NS21, 2: *L. quinquelobatus*, 3: *L. persicus*, 4: *L. cardiaca* NS24, 5: *L. glaucescens*

ITS bölgesinin tamamı PCR ile elde edildikten sonra, PCR ürünü saflaştırılmış, ITS1-ITS4 ve ITS2-ITS5 primerleriyle elde edilen okumalar, bir konsensus dizi oluşturmak amacıyla kontig haline getirilmiştir. Bu işlemin gerçekleştirilmesinde BioEdit yazılımı içinde CAP contig assembly algoritması kullanılmıştır. ITS tür tanımlamaları NCBI üzerindeki en yakın türlere göre yapılmıştır. Tüm türlere ait sekanslara homolog sekansları tanımlamak için, türlerin sekansları bir sorgu olarak kullanılıp, Gen Bankası'ndaki verilerle benzerlikler karşılaştırılmıştır. NS21 kodlu *L. cardiaca*'dan elde edilen dizilerin Gen Bankası'ndaki en yakın temsilcileri ve benzerlik oranları Tablo 5.25'te verilmiştir. *L. glaucescens*'ten elde edilen dizilerin Gen Bankası'ndaki en yakın temsilcileri ve benzerlik oranları Tablo 5.26'da verilmiştir. *L. quinquelobatus* türünden elde edilen dizilerin Gen Bankası'ndaki en yakın temsilcileri ve benzerlik oranları Tablo 5.27'de verilmiştir. *L. persicus* türünden elde edilen dizilerin Gen Bankası'ndaki en yakın temsilcileri ve benzerlik oranları Tablo 5.28'de verilmiştir. NS24 kodlu *L. cardiaca*'dan elde edilen dizilerin Gen Bankası'ndaki en yakın temsilcileri ve benzerlik oranları Tablo 5.29'da verilmiştir. Hizalanan dizilerle filogenetik ağaç oluşturulmuş ve ayrıca sonuçlar MEGA X programı ile değerlendirilmiştir.

5.8.1. DNA dizileri ve benzerlik oranları

5.8.1.1. NS21 (*L. cardiaca*) – ITS1-ITS4

CTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTGTCGAAACCTGCAAAGCAGA
CCGCGAACACGTACGAAACAACCCCCGGGGCGGCGTCGGGGGGGCAACCT
CCCGATGCGGCCCCGAACCCGTCGGTGCGCGCCTTCGTGCCGTGCCGTGCG
GGATAACCAACTCGGGCGCGGAATGCGCCAAGGAAAACACAATGGAGCGT
TCCCCTCCCCTCCGCGCCCCGTTTCGCGGGGGCGACGGGGAGCAAGGGACGCC
TATCGAATGTCTAAACGACTCTCGGCAACGGATATCTCGGCTCTCGCATCGA
TGAAGAACGTAGCGAAATGCGATACTTGGTGTGAATTGCAGAATCCCGTGA
ACCATCGAGTCTTTGAACGCAAGTTGCGCCCCGAAGCCATTAGGCCGAGGGC
ACGTCTGCCTGGGCGTCACGCATCGCGTCGCCCCCCTCCCCCGCGGGGTGGG
GCGGAGATTGGCCCCCGTGCGCGCTACACGCGCAGCGGCCGGCCCAAATG
CGAATCCGCCGTGACGCACGTGCGGACCAGTGGTGGTTGAACATTCAACT
CGCGTGCTGTGCGGTTTCATCGGCGTCGTGCGTTGGGAGACGATAAAGAAAC
CCAACGGCGCGAGCACGCATCGTGCCACGACCGCGACCCCAGGTCAGGCG
G

Toplam Baz Sayısı: 664

Tablo 5.25. *L. cardiaca*'dan elde edilen dizilerin Gen Bankası'ndaki en yakın temsilcileri ve benzerlik oranları

Gen Bankası' ndaki yakın temsilcileri	Benzerlik oranı	Dizi benzeşme oranı	Gen Bankası numarası
<i>Leonurus turkestanicus</i>	%99.23	%97	EF395809.1
<i>Leonurus glaucescens</i>	%99.23	%97	EF395807.1
<i>Leonurus glaucescens</i>	%99.08	%97	EF395808.1
<i>Brandisia hancei</i>	%93.10	%97	EU366159.1
<i>Marrubium parviflorum</i>	%91.96	%99	MH684966.1
<i>Marrubium parviflorum</i>	%91.82	%99	MH684967.1
<i>Gomphostemma chinense</i>	%91.48	%99	KP092829.1
<i>Acanthoprasium frutescens</i>	%91.82	%99	MH684922.1
<i>Marrubium rotundifolium</i>	%91.67	%99	MH684975.1
<i>Ballota hirsuta</i>	%91.51	%99	JN680359.1

5.8.1.2. NS19 (*L. glaucescens*) – ITS2-ITS5

TTGCTGCGTTTTCTTCATCGATGCGAGAGCCGAGATATCCGTTGCCGAGAGTC
GTTTAGACATTTCGATAGGCGTCCCTTGCTCCCCCGTCGCCCCGCGAACGGGG
CGCGGAGGGGAGGGGAACGCTCCATTGCGTTTTCTTGCGCATTCGCGC
CCGAGTTGGTTATCCCGCACGGCACGGCACGAAGGCGCGCACCGACGGGTT
GGGGCCGCATCGGGAGGTTGCCCCCCCCGACACCGCCCCGGGGGTTGTTTCG
TACGTGTTTCGCGGTCTGCTTTGCAGGTTTCGACAATGATCCTTCCGCAGGTT
CACCTACGGAAACCTTGTTACT

Toplam Baz Sayısı: 331

Tablo 5.26. *L. glaucescens*’ten elde edilen dizilerin Gen Bankası’ndaki en yakın temsilcileri ve benzerlik oranları

Gen Bankası’ndaki yakın temsilcileri	Benzerlik oranı	Dizi benzeşme oranı	Gen Bankası numarası
<i>Leonurus turkestanicus</i>	%97.32	%90	EF395809.1
<i>Leonurus glaucescens</i>	%96.99	%90	EF395807.1
<i>Leonurus glaucescens</i>	%96.66	%90	EF395808.1
<i>Gomphostemma chinense</i>	%90.74	%96	KP092829.1
<i>Gomphostemma chinense</i>	%90.46	%96	KP092828.1
<i>Brandisia hancei</i>	%91.33	%90	EU366159.1
<i>Eriophyton wallichii</i>	%91.19	%88	JN176167.1
<i>Acanthoprasium frutescens</i>	%89.97	%92	MH684922.1
<i>Ballota hirsuta</i>	%88.92	%96	JN680359.1
<i>Marrubium parviflorum</i>	%89.66	%94	MH684967.1

5.8.1.3. NS17 (*L. quinquelobatus*) – ITS1-ITS4

CCGCGAACACGTACGAAACAACCCCCGGGGCGGCGTCGGGGGGGGCAACCT
CCCGATGCGGGCCCCGAACCCGTCGGTGCGCGCCTTCGTGCCGTGCCGTGCG
GGATAACCAACTCGGGCGCGGAATGCGCCAAGGAAAACGCAATGGAGCGT
TCCCCTCCCCTCCGCGCCCCGTTTCGCGGGGCGACGGGGGAGCAAGGGACGC
CTATCGAATGTCTAAACGACTCTCGGCAACGGATATCTCGGCTCTCGCATCG
ATGAAGAACGTAGCGAAATGCGATACTTGGTGTGAATTGCAGAATCCCGTG
AACCATCGAGTCTTTGAACGCAAGTTGCGCCCCGAAGCCATTAGGCCGAGGG
CACGTCTGCCTGGGCGTCACGCATCGCGTCGCCCCCTCCCCCGCGGGGTGG
GGCGGAGATTGGCCCCCGTGCGCGCTACACGCGCAGCGGCCGGCCCAAAT
TCGAATCCGCCGTGACGCGACGTCGCGACCAAGTGGTGGTTGAACATTCAAC
TCGCGTGCTGTCGCGTTCATCGGCGTCGTCGGTTGGGAGACGATAAAGAAA
CCCAACGGCGCGAGCACGCATCGTGCCACGACCGCGACCCCAGGTCAGGC
GGGATCACCCGCTGAGTTTAAGCATATCAATAAGCGGAGGA

Toplam Baz Sayısı: 653

Tablo 5.27. *L. quinquelobatus*’tan elde edilen dizilerin Gen Bankası’ndaki en yakın temsilcileri ve benzerlik oranları

Gen Bankası’ndaki yakın temsilcileri	Benzerlik oranı	Dizi benzeşme oranı	Gen Bankası numarası
<i>Leonurus glaucescens</i>	%98.92	%99	EF395807.1
<i>Leonurus turkestanicus</i>	%98.76	%99	EF395809.1
<i>Leonurus glaucescens</i>	%98.76	%99	EF395808.1
<i>Acanthoprasium frutescens</i>	%91.59	%98	MH684922.1
<i>Marrubium parviflorum</i>	%91.69	%98	MH684966.1
<i>Marrubium crassidens</i>	%91.42	%98	MH684958.1
<i>Marrubium rotundifolium</i>	%91.37	%98	MH684975.1
<i>Brandisia hancei</i>	%92.69	%94	EU366159.1
<i>Paraphlomis kuankuoshuiensis</i>	%90.94	%99	MN444857.1
<i>Marrubium cuneatum</i>	%91.24	%98	MH684959.1

5.8.1.4. NS25 (*L. persicus*) – ITS1-ITS4

CTGCAAGCAGAACCGCGAACATGTACGAAACAACCCCCGGGGCGGCGTCCG
GGGGGGCAACCTCCCGATGCGGCCCGAACCCGTCGGTGCGCGCCTTCGTG
CCGTGCCGTGCGGGATAACCAACTCGGGCGCGGAATGCGCCAAGGAAAAC
ACAATGGAGCGTTCCCCTCCCCTCCGCGCCCCGTTTGCGGGGCGACGGGGA
GCAAGGGACGCCTATCGAATGTCTAAACGACTCTCGGCAACGGATATCTCG
GCTCTCGCATCGATGAAGAACGTAGCGAAATGCGATACTTGGTGTGAATTG
CAGAATCCCGTGAACCATCGAGTCTTTGAACGCAAGTTGCGCCCGAAGCCA
TTAGGCCGAGGGCACGTCTGCCTGGGCGTCACGCATCGCGTCGCCCCCTCC
CCCGCGGGGTGGGGCGGAGATTGGCCCCCGTGC GCGCTACACGTGCAGCG
GCCGGCCCAAATGCGAATCCGCCGTCGACGCACGTGCGGACCAGTGGTGGT
TGAACATTCAACTCGCGTGCTGTCGCGTTTCATCGGCGTCGTGCGTTGGGAGA
CGATAAAGAAACCCAACGGCGCGAGCACGCATCGTGCCACGACCGCGACC
CCAGGTCAGGCGGGATCACCCGCTGAGTTTAAGCATATCAATAAGCGGAG

Toplam Baz Sayısı: 662

Tablo 5.28. *L. persicus*’tan elde edilen dizilerin Gen Bankası’ndaki en yakın temsilcileri ve benzerlik oranları

Gen Bankası’ndaki yakın temsilcileri	Benzerlik oranı	Dizi benzeşme oranı	Gen Bankası numarası
<i>Leonurus turkestanicus</i>	%99	%98.48	EF395809.1
<i>Leonurus glaucescens</i>	%99	%98.48	EF395807.1
<i>Leonurus glaucescens</i> isolate	%99	%98.33	EF395808.1
<i>Acanthoprasium frutescens</i>	%98	%91.16	MH684922.1
<i>Marrubium parviflorum</i>	%98	%91.24	MH684966.1
<i>Marrubium crassidens</i>	%98	%90.98	MH684958.1
<i>Marrubium rotundifolium</i>	%98	%90.92	MH684975.1
<i>Ballota africana</i>	%99	%90.42	MH684927.1
<i>Paraphlomis kuankuoshuiensis</i>	%99	%90.50	MN444857.1
<i>Brandisia hancei</i>	%93	%92.30	EU366159.1

5.8.1.5. NS24 (*L.cardiaca*) – ITS1-ITS4

GGGACCGCCTGACCTGGGGTCGCGGTTCGTGGGCACGATGCGTGCTCGCGCC
GTTGGGTTTCTTTATCGTCTCCCAACCGACGACGCCGATGAACGCGACAGCA
CGCGAGTTGAATGTTCAACCACCACTGGTCGCGACGTGCGTCGACGGCGGA
TTCGAATTTGGGCGCGCGCTGCGCGTGTAGCGCGCACGGGGGGCCAATCT
CCGCCCCACCCCGCGGGGGAGGGGGGCGACGCGATGCGTGACGCCCAGGC
AGACGTGCCCTCGGCCTAATGGCTTCGGGCGCAACTTGCGTTCAAAGACTC
GATGGTTCACGGGATTCTGCAATTCACACCAAGTATCGCATTTTCGCTACGTT
CTTCATCGATGCGAGAGCCGAGATATCCGTTGCCGAGAGTCGTTTAGACATT
CGATAGGCGTCCCTTGCTCCCCCGTCGCCCCGCGAACGGGGCGCGGAGGGG
AGGGGAACGCTCCATTGCGTTTTCTTGCGCATTCCGCGCCCCGAGTTGGTT
ATCCCGCACGGCACGGCACGAAGGCGCGCACCGACGGGTTTGGGGCCGCAT
CGGGAGGTTGCCCCCCCCGACGCCGCCCGGGGGTTGTTTCGTACGTGTTCCG
GGTCTGCTTTGCAGGTTTCGACAATGATCCTTCCGCAGGTTACCTACGGAA

Toplam Baz Sayısı: 668

Tablo 5.29. *L. cardiaca*'tan elde edilen dizilerin Gen Bankası'ndaki en yakın temsilcileri ve benzerlik oranları

Gen Bankası' ndaki yakın temsilcileri	Benzerlik oranı	Dizi benzeşme oranı	Gen Bankası numarası
<i>Leonurus turkestanicus</i>	%97	%98.62	EF395809.1
<i>Leonurus glaucescens</i>	%97	%98.62	EF395807.1
<i>Leonurus glaucescens</i>	%97	%98.46	EF395808.1
<i>Brandisia hancei</i>	%97	%93.11	EU366159.1
<i>Gomphostemma chinense</i>	%99	%91.49	KP092829.1
<i>Acanthoprasium frutescens</i>	%98	%91.83	MH684922.1
<i>Marrubium parviflorum</i>	%99	%91.68	MH684966.1
<i>Gomphostemma chinense</i>	%99	%91.36	KP092828.1
<i>Marrubium parviflorum</i>	%99	%91.53	MH684967.1
<i>Marrubium rotundifolium</i>	%99	%91.38	MH684975.1

5.9. Morfolojik Bulguların Değerlendirilmesi

Türkiye'de doğal olarak yetişen 4 *Leonurus* türü arazi çalışmaları sonucunda 12 lokaliteden toplanmıştır. Morfolojik çalışmalarda türlerin ayrıntılı tanımları ve bunları destekleyen mikromorfolojik özellikleri verilmiştir. Ayrıca aynı türün farklı lokalitelerden toplanan taksonları arasındaki bazı farklılıklar da tablolarda karşılaştırmalı olarak özetlenmiştir. Elde edilen bulgulara göre, gövde boyu, gövde tüy yapısı, gövde yaprak boyutları, şekli, tüy yapısı, brakte boyutları, şekli, korolla rengi, kaliks yapısı, nutlet tüy durumu türler arasında farklılık gösteren karakterler olarak dikkat çekmektedir.

Morfolojik bulgular Türkiye Florası'nda belirtilen özellikler de esas alınarak karşılaştırıldığında elde edilen sonuçların genel olarak uyumlu bir varyasyon sınırı sergilediği görülmüştür. Ayrıca Türkiye Florası'nda bulunmayan bazı karakterler de eklenerek deskripsiyonlar yeniden yazılmıştır. Morfolojik özellikleri bakımından türler birbirleri ile karşılaştırıldığında bazı farklılıklar olduğu açıkça görülmektedir. Karşılaştırmalı olarak elde edilen sonuçlar Tablo 5.31'de verilmiştir.

Araştırma konusunu oluşturan *Leonurus* türlerinin gövde, kaliks ve nutlet yüzeyleri SEM ile detaylı olarak incelenmiştir.

SEM bulgularında, *L. cardiaca* ve *L. glaucescens*'te gövdede yalnızca köşelerde gözlenen tüyler, oldukça seyrektir. *L. quinquelobatus*'ta gövdenin tüm yüzeyi uzun tüylerle kaplı iken, *L. persicus*'ta gövdenin tüm yüzeyinde kısa tüyler yoğun şekilde bulunmaktadır.

L. cardiaca'da kaliks yüzeyi kısa ve seyrekle tüylü ya da hemen hemen tüysüz iken, *L. glaucescens*'te kaliks yüzeyinde kısa tüylerin yaygın dağılımı gözlenmektedir. *L. quinquelobatus*'ta kaliks yüzeyi uzun tüylerle yoğun şekilde kaplı iken, *L. persicus*'ta kısa tüylerin tüm kaliks yüzeyini kapladığı gözlenmektedir. Tüm türlerde nutlet tepesi tüylüdür. *L. cardiaca*'da nutlet tepesi piloz olup, *L. glaucescens*'te kısa pilozdur. *L. quinquelobatus*'ta nutlet tepesi villoz iken, *L. persicus*'ta kısa pilozdur.

Polonya'da *L. cardiaca* ile *L. quinquelobatus* türlerinin morfolojik özelliklerinin karşılaştırıldığı çalışmada, *L. cardiaca*'da gövdenin sadece köşelerde kısa tüylü, kaliks ve yapraklardaki tüylerin 0.5 mm'den kısa olduğu, buna karşın, *L. quinquelobatus*'ta bitkinin yoğun ve 1 mm'den uzun tüylü olduğu bildirilmiştir [33]. Bu çalışmanın sonuçları ile tez çalışmasında elde edilen veriler uyumludur.

Tüm türlerde yaprak alt yüzeyi, üst yüze göre daha yoğun tüylü olup, alt yüz açık yeşil renktedir. Yapraklar uzun saplı, obovat, ovat, linear-lanseolat, 3 ve/veya 5 loblu veya yarık, kaba dişlidir. Çiçek durumu vertisillat, aralıklı, brakteler yapraksı, çiçekler sapsız; kaliks zigomorfik, meyvede hafifçe genişleyen, dişleri spinoz, korolla zigomorfik, 2 dudaklı, tüp kalikse eşit veya daha kısa, üst dudak tamamen ve hafif içbükey, alt dudak 3 loblu; üst dudak dışı tüylü, üst dudağın yanında bulunan stamenler 4 tane, didinam; ovaryum sapsız, stilus ginobazik; stigma bifid, nutlet obkonik, tepesi tüylü, yüzeyi pürüzsüzdür.

Bitkiler genel görünüşleri açısından değerlendirildiğinde, *L. persicus* hem yaşadığı habitat, hem de korolla rengi sebebiyle diğer türlerden ayrılır. *L. cardiaca* ve *L.*

quinuelobatus türleri genel olarak yarı gölgeli, hafif nemli alanlarda yayılış göstermektedir. Güneşli alanlarda yayılış gösteren bitkilerin boylarının yarı gölgeli alanlarda yetişenlere göre daha kısa olduğu gözlenmiştir. Tüm türlerde yaprak üst yüzeyi alt yüzeyine göre belirgin şekilde daha açık renktedir. Gövde boyu uzun olan *L. cardiaca* örneklerinde gövde morumsu, kalın ve içi boş olup, 4 köşeli yapı belirgindir ve tüyler seyrek olarak köşelerde bulunur. Kısa boylu bitkilerde gövdenin daha yeşil olduğu gözlenmiştir. Köy içlerinden toplanan örnekler, genellikle duvar diplerinde yayılmıştır. En uzun boylu örnek, *L. cardiaca* türünün orman içinden toplanan taksonudur. *Vertisillastrum* çiçek durumu çok çiçekli ve 11-16 cm aralıklı olup, gövde boyu 150 cm ve üzerinde olan örneklerde kökten 50-70 cm sonra görülmeye başlamaktadır. Kaliks dikenli ve batıcıdır. Korolla açık pembe renkte olup, alt dudak içi sıklıkla eflatunkahverengi lekeli ve üst dudak konkav olup, dışı yoğun tüylüdür, beyaz renkli tüyler 1 mm'yi geçmemektedir.

İşcan ve diğerleri tarafından yapılan çalışmada da *L. cardiaca*'da gövde kısımlarının tüylü olduğu, kaliksin huni şeklinde 5 dişli, korollanın 2 dudaklı ve alt dudağın beyaz, mor noktalı olduğu bildirilmiştir [346]. Yine elde edilen bulgular, *L. cardiaca*'nın çiçek yapısı ile ilgili olarak Shekari ve diğerleri [347] tarafından yapılan çalışmadaki çiçeğin karakterleri ile ilgili verilerle de paralellik göstermiştir.

L. quinquelobatus; gövde yüzeyi, alt yüz daha yoğun olmak üzere yaprak yüzeyleri, yaprak sapı, korolla üst dudak arkası ve nutlet tepesi yoğun tüylerle kaplı olan, en yoğun ve uzun tüylere sahip türdür. Boyları 105-181 cm arasında değişen örneklerde dallanma kökten 50-68 cm sonra başlayıp, 14-17 cm aralıklarla devam etmektedir. Gilibert (1793) tarafından, *L. quinquelobatus* uzun ve yoğun tüylerinden dolayı ayırt edilmiş ve tanımlanmıştır. Tüylü yapısı ve büyük yaprakları dikkat çeken tür, *L. persicus*'tan tüylerinin uzunluğu ve yapraklarının büyüklüğü ile ayırt edilir. Korolla lila renkte, üst dudağın arkası ve tüp üzeri yoğun olarak villoz tüylü ve alt dudakta korolla boğazının yakını sıklıkla mor-kahverengi lekeli.

Doğu Anadolu Bölgesi'nde yayılış gösteren *L. glaucescens* gövdenin morumsu olması, gövdede sadece köşelerde tüylerin seyrek olarak bulunması gibi özelliklerle ayırt edilir. Boyları 50-160 cm arasında değişen örneklerde, çiçeklenme kökten itibaren 17-25 cm sonra başlamaktadır. Gövdenin köşelerinde, kaliks ve nutlet yüzeyinde bulunan tüyler oldukça kısadır. Korolla soluk leylak, koyu pembe renkli olup, üst dudak dışı yoğun tüylüdür.

Korollasının beyaz olması, gövde yüzeyi ve yaprak kısımlarının kısa tüylerle yoğun şekilde kaplı olması gibi morfolojik özellikleri ile diğer türlerden ayırt edilen *L. persicus* türünde gövde boyu 50-70 cm aralığında olup, diğer türlere kıyasla gövde boyu daha kısadır. Bitkinin gövde, yaprak, kaliks yüzeyi gibi kısımları yoğun tüylüdür.

Lamiaceae'deki nutlet morfolojisinin, taksonomik hiyerarşinin farklı seviyelerinde değişen derecelerde yararlı olduğu kanıtlanmıştır [348]. SEM kullanılarak yapılan çalışmada *Leonurus* türlerindeki nutletlerin, boyut, şekil, yüzey, tepe ve tabana ait mikromorfolojik özellikleri belirlenmiştir (Tablo 5.30). SEM incelemesi sonuçlarına göre, tüm türlerin nutletleri obkonik, yüzeyleri pürüzsüz, tabanları trunkat, boyutları 1.5-3 mm arasındadır. Veriler değerlendirildiğinde, nutlet tepesinde yer alan tüylerin uzunluklarının farklı olduğu, *L. cardiaca*'da nutletin tepe kısmındaki tüylerin, *L. glaucescens*'e kıyasla daha uzun olduğu ve nutlet tepesindeki en uzun tüylerin *L. quinquelobatus*'ta olduğu gözlenmiştir.

Tablo 5.30. *Leonurus* türlerinin nutlet özelliklerinin karşılaştırılması

Nutlet özellikleri	Boyut	Şekil	Yüzey	Tepe	Taban
<i>L. cardiaca</i>	2-2.5 mm	obkonik	pürüzsüz tüysüz	trunkat, üçgen piloz	trunkat
<i>L. glaucescens</i>	1.5-2.5 mm	obkonik	pürüzsüz tüysüz	trunkat, üçgen kısa piloz	trunkat
<i>L. quinquelobatus</i>	2-3 mm	obkonik	pürüzsüz tüysüz	trunkat, üçgen viloz	trunkat
<i>L. persicus</i>	1.5-3 mm	obkonik	pürüzsüz tüysüz	trunkat, üçgen kısa piloz	trunkat

Badamtsetseg tarafından nutlet morfolojisinin, taksonomik hiyerarşinin alt aile, cins ve tür seviyelerinde değişen derecelerde farklılık gösterebileceği bildirilmiştir. Nutlet morfolojisi; boyut, renk (açık turuncu-sarı, açık kahve, koyu kahve, soluk gri, siyah), şekil (obovoid, subobovoid, eliptik), yüzey süslemesi (tip I, tip II), yüzey (tüylü, tüysüz, pürüzsüz), tepe (yuvarlak, üçgen) ve taban (trunkat, akut, yuvarlak) karakterleriyle değerlendirilmiştir [97]. Bu çalışmanın sonuçları ile verilerimiz kıyaslandığında tez konusunu oluşturan *Leonurus* türlerinin tip II içerisinde yer aldığı, ek olarak nutlet karakterlerinin cins ve tür düzeyinde tutarlı olduğu gözlenmiştir.

Tablo 5.31. *Leonurus* türlerinin morfolojik sonuçlarının Türkiye Florası [3] ile karşılaştırılması

Morfolojik karakterler	<i>L. cardiaca</i>				<i>L. glaucescens</i>				<i>L. quinquelobatus</i>				<i>L. persicus</i>			
	Bulgular		Türkiye Florası		Bulgular		Türkiye Florası		Bulgular		Türkiye Florası		Bulgular		Türkiye Florası	
BB (cm)	44-245		-		65-120		35-75		50-181		-		50-75		-	
GY	Köşelerde tüylü	seyrek	Köşelerde tüylü	seyrek	Köşelerde morumsu	tüylü	Köşelerde morumsu	tüylü	yoğun tüylü villoz 1-1.5mm	yoğun tüylü, villoz, 1-2mm			yoğun puberuloz		yoğun puberuloz	
GY (mm)	10-77 x 20-88		orta lop 20-30x 15-25		13-88x21-76		40-75x25-75		17-104x22-111 villoz	- villoz			12-34x 16-56		16-50x 20-50	
GYS (mm)	7-49		-		15-39		25-40		9-52	-			11-55		5-15	
BR (mm)	6-42 x 12-78		-		7-35x10-50 mm		alt (35)50-65x (ll)20-40, orta 1.3-2x yanlar		7-46x10-57	-			10-30x10-45		-	
BRT (mm)	1.5-5 linear, akut uçlu		-		1-4 linear, akut uçlu		-		1-3 linear, akut uçlu	-			2-3.5 linear, akut uçlu		-	
KA (mm)	5-8 5 dişli dikenli, seyrek tüylü		6-7		5-9 5 dişli, puberuloz		6-9 5 dişli, puberuloz		5-9 2'si geri kıvrık 5 dişli, dikenli	6-9			6-8 5 dişli, spinoz, kısa tüylü		-	
KT (mm)	3-5		3-4		3-6		3.5-6		3-5	4-5			4-6		-	
KO (mm)	6-11, açık pembe		-		7-11, soluk leylak, koyu pembe		9-10.5 (-12 mm) soluk leylak villoz		7-11, lila villoz	10.5-12			9-11, krem rengi villoz		10-12	
ST	4, didinam anter 0.8-1 mm		4, didinam		4, didinam anter 0.3-0.4 mm		4, didinam		4, didinam anter 0.8-1 mm	4, didinam			4, didinam anter 0.3-0.5mm		4, didinam	
Gİ (mm)	7-9		-		9		-		8-9	-			7-9		-	
NU (mm)	1.5-2.5, obkonik		-		1.5-3, obkonik		-		2-3, obkonik	-			1.5-3, obkonik		-	

BB: Bitki boyu, GY: gövde yüzeyi, GY: gövde yaprağı, GYS: gövde yaprak sapı, BR: brakte, BRT: brakteol, KA: kaliks, KT: kaliks tüpü, Ko: korolla, ST: stamen, Gİ: ginekeum, NU: nutlet

Morfolojik karakterler değerlendirildiğinde, türler arası belirgin farklılıklar gözlenmesine ek olarak aynı türün farklı lokalitelerden toplanmış olması nedeniyle, ortam koşullarına bağlı olarak ortaya çıktığı bazı ayrımlar da belirlenmiştir.

L. cardiaca'nın bitki boyu yapılan çalışmada 44-245 cm iken, florada belirtilmemiş; gövde yaprağı 10-77 x 20-88 mm iken, flora deskripsiyonunda orta lop 20-30 x 15-25 mm; brakte 6-42 x 12-78 mm iken, florada belirtilmemiş; kaliks 5-8 mm iken florada 6-7 mm; korolla 6-11 mm iken florada belirtilmemiştir (Tablo 5.31).

Arizona'da yayılış gösteren *L. cardiaca* türünün 25-90 cm arasında olduğu, kaliksin 3-4-(7) mm, korollanın 8-10 mm olduğu ve benekler taşıdığı iç kısmının da tüylü olduğu bildirilmiştir [86]. Elde edilen bulgularla kıyaslandığında, sonuçlarımızdaki türün boyunun daha uzun olduğu, kaliks ve korolla özelliklerinin ise benzer olduğu görülmüştür.

L. glaucescens'te bitki boyu yapılan çalışmada 65-120 cm iken, florada 35-75 cm; gövde yaprağı 13-88x21-76 mm mm iken, flora deskripsiyonunda 40-75 x 25-75 mm; korolla 7-11 mm iken florada 9-10.5 (-12 mm) olarak belirtilmiştir (Tablo 5.31).

L. quinquelobatus'ta bitki boyu yapılan çalışmada 50-181 cm iken, florada belirtilmemiş; gövde yaprağı 17-104x22-111 mm iken, flora deskripsiyonunda belirtilmemiş; brakte 7-46x10-57 mm iken, florada belirtilmemiş; korolla 7-11 mm iken florada 10.5-12 mm olarak belirtilmiştir (Tablo 5.31).

L. persicus'ta bitki boyu yapılan çalışmada 50-75 cm iken, florada belirtilmemiş; gövde yaprağı 12-34x 16-56 mm iken, flora deskripsiyonunda 16-50 x 20-50 mm; brakte 10-30x10-45 mm iken, florada belirtilmemiş; kaliks 4-6 mm iken, florada belirtilmemiş; korolla 9-11 mm iken, florada 10-12 mm olarak belirtilmiştir (Tablo 5.31).

L. glaucescens'in Türkiye Florası'na göre bitki boyunun daha uzun olduğu, diğer karakterlerin yakın değerlerde olduğu belirlenmiştir (Tablo 5.31). *L. glaucescens*'in bulgulara maksimum bitki boyu 120 cm olarak tespit edilmiş iken, Türkiye Florası'nda 75 cm olarak belirtilmiştir.

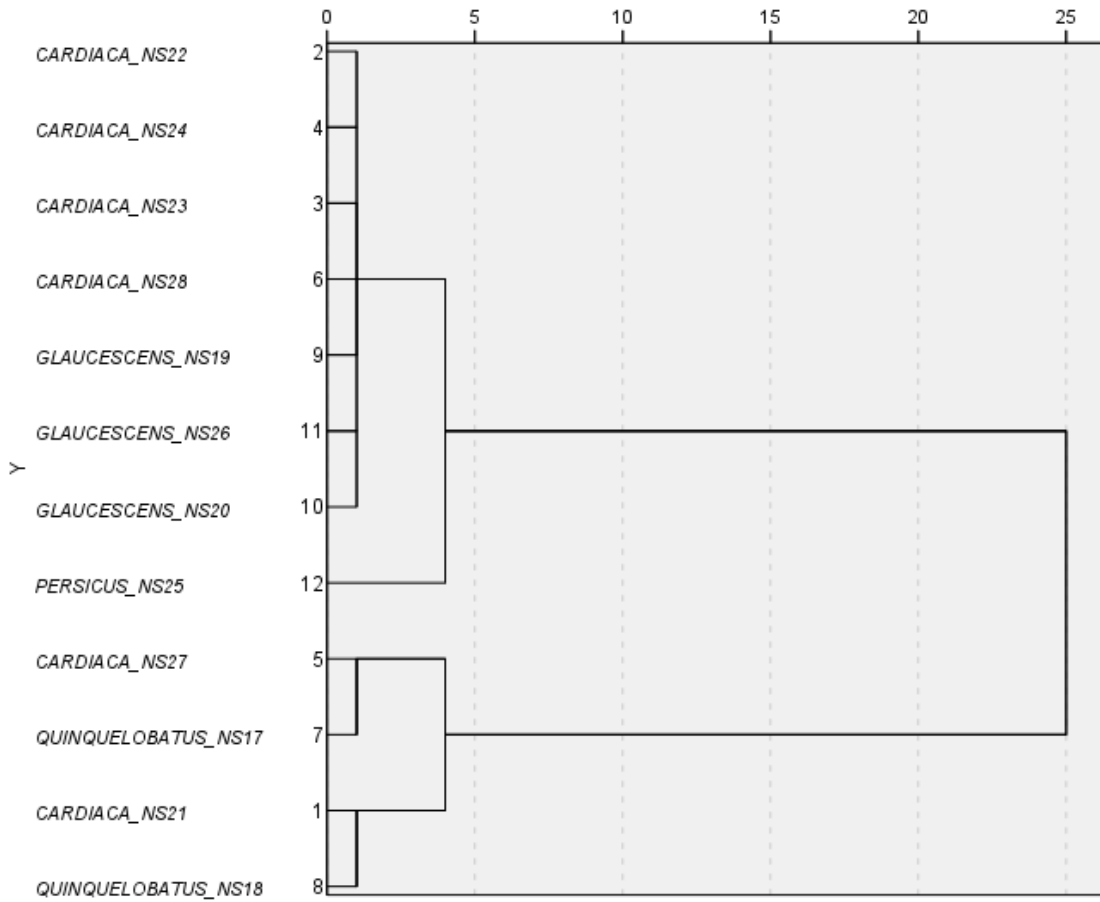
Kazakistan'da yetişen *L. glaucescens* türünün boyunun 50-100 cm, kaliksin 7-8 mm, korollanın ise 10-12 mm olduğu bildirilmiştir [84]. Bitki boyunun sonuçlarımıza benzer olduğu, kaliks ve korollanın ise daha uzun olduğu görülmüştür.

Türler arasında üst sınır açısından boyu en uzun olan bitki *L. cardiaca* olup, Edirne'den toplanmıştır. Türler arasında üst sınır açısından boyu en kısa olan bitki türü ise *L. persicus*'tur. Genel değerlendirmede morfolojik bulgular Türkiye Florası ile

örtüşmektedir (Tablo 5.31). Ancak florada yer alan deskripsiyona ilave olarak; kaliks, kaliks tüpü, korolla, brakteol gibi karakterlere ait ölçümler de yapılmıştır.

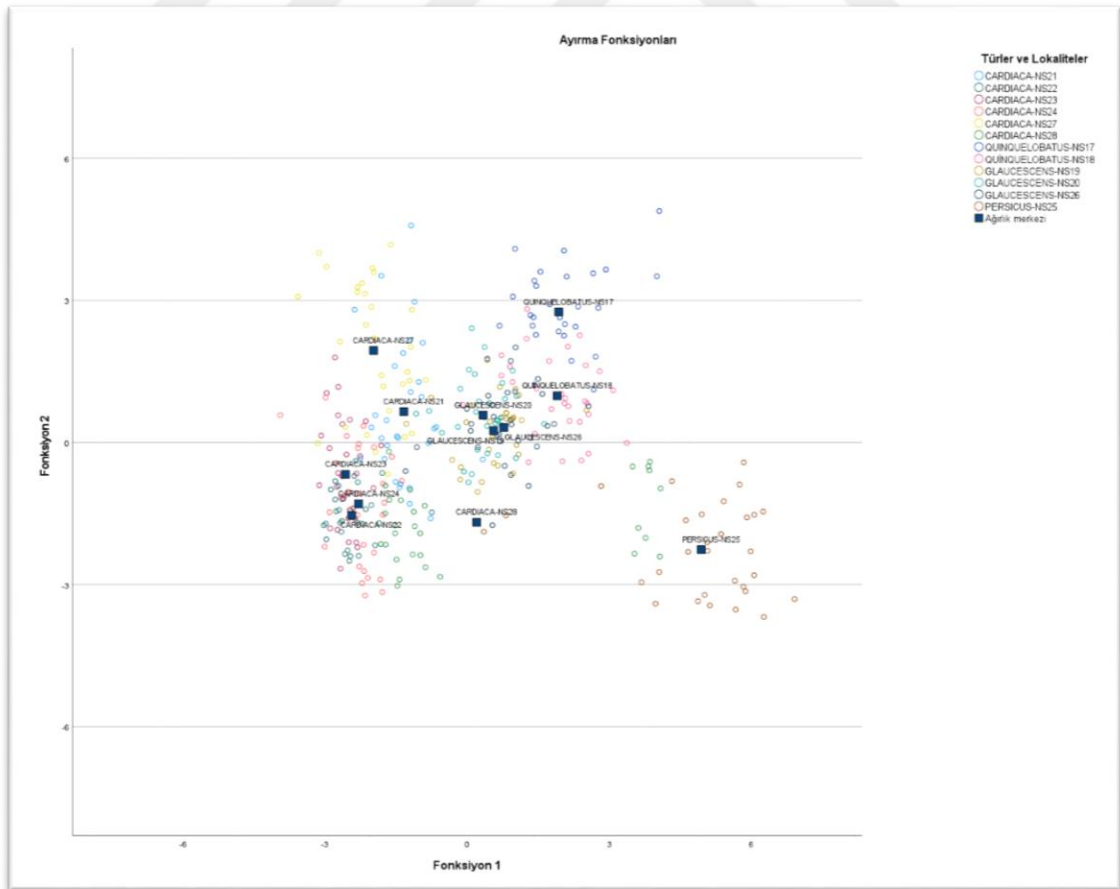
Morfolojik karakterler ön değerlendirme için faydalıdır, çünkü hızlı ve basit değerlendirmeyi kolaylaştırır ve morfolojik olarak ayırt edilebilir bireyler arasındaki genetik çeşitliliği değerlendirmek için genel bir yaklaşım olarak kullanılabilirler. En yaygın olarak uygulanan küme analizi gibi çok değişkenli istatistiksel yöntemlerle birleştirilmiş morfolojik karakterizasyon, birçok bitki için bireyleri taramak açısından yararlı araçlardır. Çok değişkenli teknikler, büyük veri setlerini değerlendirmeye ve birkaç fenotipik ve genotip ölçümünü daha az yorumlanabilir ve daha kolay görselleştirilebilir gruplara ayırmaya yardımcı olabilir.

Türkiye’de yayılış gösteren *Leonurus* türlerinin morfolojik karakterlerine göre akrabalık ilişkilerini belirlemek amacıyla yapılan kümeleme analizi sonuçları ile dendogram çizilmiştir (Şekil 5.99).



Şekil 5.99. Taksonların morfolojik özelliklerine göre yapılan kümeleme analizi dendogramı

Bitkiler morfolojik karakterleri bakımından 2 kümede toplanmıştır. Kümeleme dendogramı incelendiğinde; *L. cardiaca*'nın 2, 4, 3, 6 nolu örnekleri, *L. glaucescens*'in 9, 11, 10 nolu örnekleri ve *L. persicus*'un 12 nolu örneği bir grup iken, *L. cardiaca*'nın 5 ve 1 nolu örnekleri ile *L. quinquelobatus*'un 7 ve 8 nolu örnekleri bir grup oluşturmıştır. *L. cardiaca*'nın 2, 4, 3, 6 nolu örnekleri ile *L. glaucescens*'in 9, 11, 10 nolu örneklerinin birbirlerine yakın olduğu, *L. persicus*'un 12 nolu örneğinin bu gruba daha sonraki aşamalarda katıldığı görülmektedir. Ayrıca *L. cardiaca*'nın 5 nolu örneği ile *L. quinquelobatus*'un 7 nolu örneğinin, *L. cardiaca*'nın 1 nolu örneği ile de *L. quinquelobatus*'un 8 nolu örneğinin benzer olduğu ve sonraki aşamalarda bu iki grubun birleştiği görülmektedir (Şekil.5.99). Morfolojik özelliklerine göre türlerin popülasyonlarının doğal olarak kendi grupları içinde kaldıkları, aynı kümelerde yer aldıkları belirlenmiştir. *L. cardiaca*'nın 1 ve 5 numaralı örnekleri 2, 3, 4, 6 nolu örneklerinden ayrılmıştır. Bunun nedeni ekolojik faktörlerden kaynaklanmaktadır. Özellikle edafik (toprak) koşullar morfolojiyi etkileyerek, ekotiplerin oluşmasına neden olmaktadır.



Şekil 5.100. Taksonların morfolojik özelliklerine göre yapılan ayırma analizinin grafiksel gösterimi

Bir diğerk istatistiksel teknik olan diskriminant analizinde ise türlerin morfolojik özelliklerine göre yapılan ayırmada, fonksiyonlar aracılığıyla gruplar arası ayırma en fazla etki eden ayırıcı değişkenler belirlenmiştir. En fazla katkı sağlayan değişkenlerde olabilecek farklılıklar, diğerk morfolojik özelliklerde olabilecek farklılıklara göre daha fazla ayırma yol açacaktır. Dolayısıyla söz konusu türler öncelikle bu özellikleri bakımından farklıdır. Belirlenen değişkenlere göre türlerin sınıflandırma başarısı %77.2 olarak bulunmuştur (Tablo 5.6).

Bu değişkenler kullanılarak yapılan istatistiksel analizlere dayalı olarak ayırma analizinin grafiksel gösteriminde türlerin büyük oranda kendi grupları içerisinde kaldığı belirlenmiştir (Şekil 5.100). Çalışmanın botanik kısmında yapılan morfolojik ölçümleri anlamlandırmak için, iki farklı teknik ile elde edilen istatistiksel sonuçlar birbirini desteklemektedir.

5.10. Anatomik Bulguların Değerlendirilmesi

Anatomik veriler, bitki sistematigi çalışmalarında taksonomik olarak bilgilendirici olabilmektedir. Bazı Lamiaceae cinslerindeki morfolojik ve anatomik yapılar üzerine yapılan birçok çalışma, bu verilerin farklı taksonomik seviyelerde yararlı olduğunu göstermiştir. Petioldeki vasküler demetlerin yapısının Lamiaceae familyasında taksonomik önemi olduğu gösterilmiştir [349]. Ayrıca, yüksek bitkilerdeki yaprak enine kesitlerinin özelliklerini içeren karşılaştırmalı yaprak anatomisinin tür sınırlamasında büyük önem taşıdığı belirtilmiştir [350]. Bu tez çalışması kapsamında yapılan anatomik çalışmalarda, farklı lokalitelerden toplanan *Leonurus* cinsine ait türlerin anatomik özellikleri karşılaştırmalı olarak incelenmiştir. Taksonların, gövde anatomik yapısında; kollenkima tabakası, endodermis tabakası, perisikl tabakası, tüy örtüsünün bulunuşu, yoğunluğu ve yapısı bakımından bazı farklılıklar gözlemlenmiştir. Yaprak anatomik yapısında ise; tüy örtüsünde farklılıklar tespit edilmiştir.

Anatomik bulgulara göre tüm taksonlarda gövde tipik dört köşelidir. Bütün türlerde epiderma kalınlaşmış bir kütikula ile örtülüdür. Epiderma tek sıralı, alt ve üst çeper yan çeperlere göre daha kalın bir yapıdadır. Örtü tüyleri basit, 1-5 hücreli olup, üzeri kütikula kabarcıklıdır. Gövdede bulunan örtü tüyleri *L. cardiaca* ve *L. glaucescens* türlerinde yalnız köşelerde gözlenirken, *L. quinquelobatus* ve *L. persicus* türlerinde gövdenin tüm yüzeyinde yoğun olarak görülmüştür. *L. quinquelobatus*'un gövde yüzeyindeki örtü tüyleri 3-4 hücreli olup, *L. persicus*'un gövdedeki 1-2 hücreli örtü tüylerinden çok daha uzundur. Ayrıca *L. quinquelobatus* tüm türler arasında örtü tüyleri en uzun olan türdür.

Çalışılan taksonlarda tespit edilen salgı tüyleri taksonların hepsinde seyrek olarak bulunmaktadır. Bu tüylerde sap kısa olup 1 hücreli, baş 1-2 hücrelidir. Peltat (Labiatae) tipi salgı tüyü taksonların çoğunda seyrek bulunurken, *L. quinquelobatus*'ta diğer taksonlardan daha yoğun olduğu gözlenmiştir (Tablo 5.32).

Tablo 5.32. İncelenen taksonlarda gövde tüy yapısının karşılaştırılması

Tür	Örtü tüyü	Salgı tüyü	Peltat tüy
<i>L. cardiaca</i>	Köşelerde, 2-3 hücreli	seyrek	seyrek
<i>L. glaucescens</i>	Köşelerde geriye doğru eğik, 1-2 hücreli	seyrek	seyrek
<i>L. quinquelobatus</i>	Köşelerde daha yoğun olmak üzere gövde yüzeyi yoğun 3-4 hücreli, uzun	seyrek	yoğun
<i>L. persicus</i>	Köşelerde daha fazla olmak üzere gövde yüzeyi çok yoğun 1-2 hücreli, kısa	seyrek	seyrek

Yaprak dorsiventral olup, yaprağın orta damar bölgesinde alt ve üst epidermanın altında her taksonda değişik sayılarda kollenkima tabakası yer almaktadır. Tek sıralı palizat parenkiması sıkı dizilmiş, uzun silindirik şekilli ve bol kloroplastlı hücrelerden oluşmuştur. Palizat parenkimasının altında yuvarlak ya da düzensiz şekilli 2-3 tabakadan oluşan sünger parenkiması yer almaktadır.

Yapraktaki örtü tüyleri incelenen taksonlarda genelde 1-4 hücreli, basit tiptir. En kısa örtü tüyüne sahip tür *L. persicus*'tur. İncelenen taksonlarda salgı tüylerinde, sap 1 hücreli, baş 1-2 hücreli olarak değişmektedir. Tüm türlerde salgı tüyleri yaprak üst yüzünde seyrek olarak bulunurken, alt yüzde yaygın olarak bulunmaktadır. Peltat (Labiatae) tipi salgı tüyleri ise, incelenen tüm taksonlarda yaprağın alt yüzeyinde yoğun, üst yüzeyinde ise daha seyrek. *L. quinquelobatus* ve *L. persicus*'ta diğer türlere göre yoğun olarak bulunan peltat tüyler, yaprak alt yüzünde oldukça yoğun olarak gözlenmiştir (Tablo 5.33).

Tablo 5.33. *İncelenen taksonlarda yaprak tüy yapısının karşılaştırılması*

Tüyler	<i>L. cardiaca</i>	<i>L. glaucescens</i>	<i>L. quinquelobatus</i>	<i>L. persicus</i>
Örtü tüyü	2-3 hücreli	1-2 hücreli	3-4 hücreli	1-2 hücreli
(üst yüz/alt yüz)	seyrek/yaygın	seyrek/yaygın	yoğun/daha yoğun	yoğun/daha yoğun
Salgı tüyü				
(üst yüz/alt yüz)	seyrek/yaygın	seyrek/yaygın	seyrek/yaygın	seyrek/yaygın
Peltat tüyü				
(üst yüz/alt yüz)	seyrek/yoğun	seyrek/yoğun	yoğun/daha yoğun	yoğun/daha yoğun

Stomalar, incelenen taksonların hepsinde yaprağın yalnızca alt yüzünde (hipostomatik) bulunmakla birlikte anomositik ve diasitik tiptedir.

Stefanova ve Koleva (2014) tarafından, *L. cardiaca* bitkilerinin *in vitro* ortamda kültürlen yapraklarından alınan enine kesitlerde, yaprağın dorsiventral ve hipostomatik olduğu, stomaların epidermanın biraz yukarısında yer aldığı bildirilmiştir [351].

İşcan ve diğerleri tarafından yapılan çalışmada *L. cardiaca*'da dorsiventral yaprakta, yaprak üst yüzünün yeşil ve seyrek tüylü iken, alt yüzün açık yeşil puberuloz olduğu ve stomaların alt yüzde bulunup, diasitik olduğu bildirilmiştir [346].

L. sibiricus türünün yaprak ve gövde morfo-anatomisinin analiz edildiği çalışmada yaprağın dorsiventral olduğu, epidermisin tek tabakalı olup, anomositik tipte stomaların bulunduğu ve her iki yüzde de glandüler ve glandüler olmayan trikomların bulunduğu tespit edilmiştir [95]. Elde edilen bulgular bu çalışmaların sonuçları ile uyumludur.

Sonuç olarak, incelenen taksonların anatomik yapılarının birbirlerine genel olarak benzerlik gösterdikleri görülmüştür. Ancak, gövde anatomik yapısında; tüy örtüsü, kollenkima ve perisikl tabakasının yapısı, floem ve ksilem tabakalarının kalınlığı, yaprak anatomik yapısında ise; tüy örtüsü ve yoğunluğu gibi yapılarda farklılıklar tespit edilmiştir.

5.11. Palinolojik Bulguların Değerlendirilmesi

Polen morfolojisi çalışmaları, özellikle de elde edilen taramalı elektron mikroskobu verileri, polen morfolojisinin bitki sistematğinde familya ve cins içindeki sınıflandırmalarda oldukça yararlı ve doğru sonuçlar ortaya çıkardığını göstermiştir. Birçok araştırmacı tarafından araştırılan Lamiaceae familyasının farklı üyelerindeki apertür sayısı, şekli ve yüzey ornamentasyonlarını içeren polen morfolojisi incelenmiş ve bu özelliklerin familya üyelerinin taksonomisinde yararlı olduğu bulunmuştur.

Lamiaceae ailesinin çeşitli cinslerinde polenlerin morfolojik özellikleri ile ilgili birçok çalışma yapılmıştır [26, 99, 332, 333]. Erdtman Lamioideae alt familyasının polenlerinin üç kolpuslu (trikolpat) ve binükleat olduğunu bildirmiştir [26].

Lamioideae alt familyası polenlerinin, polar eksenleri 15-59 µm, ekvatorial eksenleri 13-52 µm arasında olup, şekli euprolat, prolattır. Taneler inoperkülattır ve genellikle trikolpattır; birkaç cins içinde tetrakolpat ve heksapantokolpat taneler bulunmaktadır. Ekzin, çoğu türde mikroretikülat, bazılarında retikülat veya foveolattır. Ornamentasyon çoğu türde supretikülat, retikülat olup, psilat, granülat, rugulat ve supretikülat-rugulat olan cinsler de bulunmaktadır [333]. Lamioideae alt familyasındaki birçok cinsle ilgili olarak çeşitli palinolojik çalışmalar bulunsa da, *Leonurus* cinsinin polen özelliklerini ortaya koyan kapsamlı bir çalışma bulunmamaktadır.

Bu tez çalışmasında SEM kullanılarak, Türkiye’de yayılış gösteren 4 türün polen özellikleri ve ornamentasyonları ilk kez ortaya konulmuştur. Polenler radyal simetrlili, isopolar, trikolpat ve eliptik olup, polen şekli prolat, ornamentasyon ise retikülattır. Türkiye’de yayılış gösteren *Leonurus* türlerine ait polen özellikleri Tablo 5.34’te verilmiştir.

Tablo 5.34. *Leonurus* polenlerinin özellikleri

Polen özellikleri	<i>L. cardiaca</i>	<i>L. glaucescens</i>	<i>L. quinquelobatus</i>	<i>L. persicus</i>
Polar eksen (P)	23.1-34.6 µm	29.4-33.0 µm	26.2-29.1 µm	29.9-31.7 µm
Ekvatorial eksen (E)	16.2-19.2 µm.	16.9-18.3 µm	15.5-14.6 µm	16.8-16.6 µm.
P/E oranı	1.39-1.80 µm	1.73-1.80 µm	1.69-1.99 µm	1.77-1.90 µm
Polen şekli	prolat	prolat	prolat	prolat
Ornamentasyon	retikülat	retikülat	retikülat	retikülat

Erdtman, polen tanesinin boyut aralığını şu şekilde önermiştir; polen 10 µm'nin altında ise çok küçük, 10-25 µm arasında ise küçük, 25-50 µm arasında ise orta ve 50-100 µm arasında ise büyüktür [26]. Elde edilen bulgular değerlendirildiğinde *Leonurus* polenlerinin orta büyüklükte olduğu belirlenmiştir.

Zhi ve diğerleri tarafından *Leonurus* cinsindeki 9 tür ve 1 varyetenin polen morfolojisi LM ve SEM ile incelenmiştir. Polen tanelerinin elipsoit veya subferoit olduğu, polenlerin trikolpat olduğu, kolpusların neredeyse kutuplara kadar uzandığı, ekzin ornamentasyonunun retikülat, retikülat-mikroperforat olduğu bildirilmiştir. Ayrıca, *L. cardiaca*’nın polen boyutlarının 20.5-(21.6)-4.3x15.4-(18.2)-20.5 µm ve polen

şeklinin subprolat olduğu, *L. glaucescens* polen boyutlarının 16.6-(17.2)-17.8x17.8-(18.9)-20.8 µm ve polen şeklinin oblat spheroidal olduğu bildirilmiştir [99].

Abu-Asab ve Cantino'nun Lamioideae ve Pogostemonoideae subfamilyalarının polenleri üzerine yaptıkları çalışmada *Leonurus* polenlerinin trikolpat olduğu, *L. cardiaca* için; polar eksenin 22.7 µm, ekvatorial eksenin 21.1 µm, P/E oranının 1.08 µm, ornamentasyonun ise supraretikulat olduğu, *L. sibiricus* türü için; polar eksenin 25.5 µm, ekvatorial eksenin 21.3 µm, P/E oranının 1.20 µm, ornamentasyonun ise supraretikulat olduğu bildirilmiştir [333]. Bu veriler sonuçlarımızla paralellik göstermektedir.

5.12. Biyolojik Aktivite Bulgularının Değerlendirilmesi

Literatür bilgileri incelendiğinde, sıklıkla *L. cardiaca* türü üzerine yapılmış aktivite çalışmalarına rastlanırken, diğer türlerle ilgili çalışmaların sınırlı sayıda olduğu görülmektedir. Halk arasında çeşitli ve yaygın kullanımlarının olmasına rağmen bu bilgiler doğrultusunda yapılan çalışmalar oldukça sınırlı sayıdadır.

Tez çalışması kapsamında, yeni potansiyel doğal antioksidan kaynaklar olabileceklerinin düşünülmesi sebebiyle tez konusunu oluşturan türlerden farklı çözücülerle hazırlanan ekstreler, toplam fenolik içeriği ve antioksidan aktiviteleri açısından değerlendirilmiştir.

Leonurus türleri; fenolik bileşikler, lavandulifoliosit [173] gibi fenilpropanoit glikozitler, klorojenik, rozmarinik, kafeik, *p*-kumarik, *p*-hidroksibenzoik, vanilik ve ferulik asitler gibi fenolik asitler ve fenolik glikozit içermektedir [104].

Önceki çalışmalarda, *L. cardiaca* 'nın toprak üstü kısımlarında terpen bileşikleri; monoterpenler (iridoitler) [154], diterpenler [157], triterpenler [160], nitrojen içeren bileşikler (leonurin, stakidrin), fenilpropanoitler (lavandulifoliosit), flavonoitler, fenolik asitler, uçucu yağlar, steroller (β -sitosterol ve stigmasterol) ve tanenler gibi birçok bileşik tanımlanmıştır.

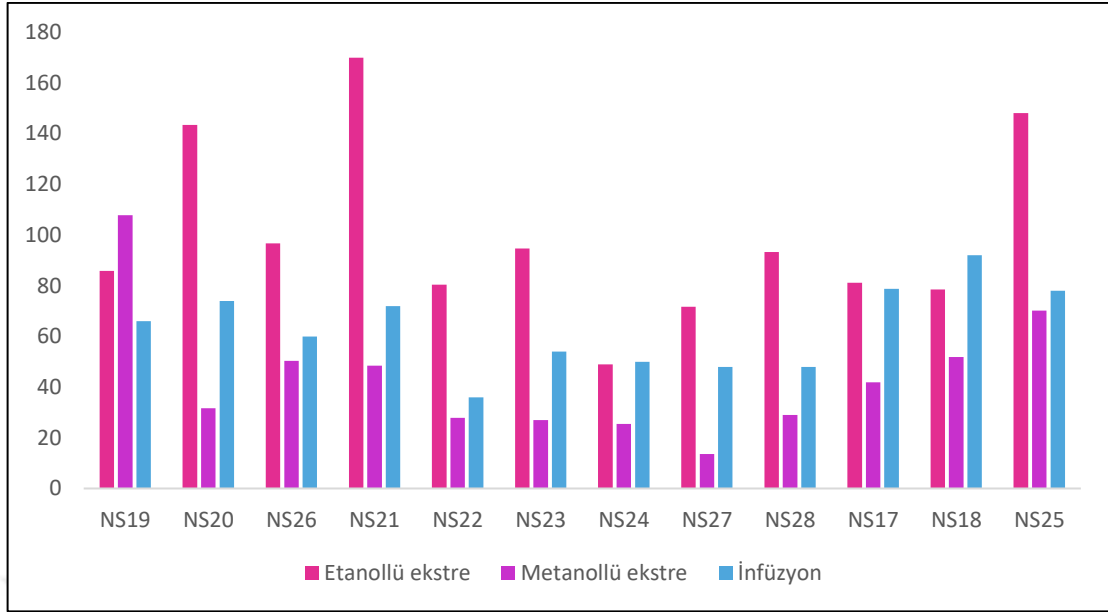
Fenolik maddelerin varlığı ve miktarı genetik ve çevre faktörleri dışında, toplama zamanı ve şekli, kurutma tekniği ve sıcaklığı, ekstraksiyon yöntemi ve analiz metodu gibi birçok faktöre bağlı olarak önemli farklılıklar gösterebilmektedir. Doğal kurutmada nem miktarının fazla olmasının, toplam fenolik madde miktarının rakamsal değerini düşürdüğü bildirilmiştir [352]. Bu çalışmada *Leonurus* türlerinin doğal kurutma yapılarak kullanıldığı göz ardı edilmemelidir.

Leonurus cinsine ait türlerin uzun bir tıbbi geleneğe sahip olduğu ve fenolik maddelerce zengin olduğu literatür çalışmalarından anlaşılmaktadır. Bu yüksek fenolik

madde miktarının, beraberinde yüksek bir antioksidan etki kapasitesini getirdiği düşünülmektedir. Bu tez çalışması ile *Leonurus* türlerinin toplam fenolik madde miktarları farklı lokasyonlardan toplanan örnekler kullanılarak araştırılmış ve birbiri ile kıyaslanmıştır. Toprak üstü kısımlardan hazırlanan ekstrelerin fenolik miktarları Folin-Ciocalteu testi ile, içerdikleri flavonoit yüzdeleri ise Avrupa Farmakopesi'nin önerdiği yöntem ile belirlenmiştir. Ayrıca, ekstrelerin antioksidan aktivitesi DPPH' ve ABTS^{•+} testleri ile değerlendirilmiştir.

Avrupa Farmakopesi'ne [35] göre, *Leonuri cardiaca* herba minimum %0.2 flavonoit içermelidir. Farmakopedeki metoda göre yapılan deneyler sonucunda, farklı lokalitelerden toplanan *L. cardiaca* örneklerinden 3 tanesinde (NS21, NS22, NS27) flavonoit miktarı sırasıyla %0.24, %0.33 ve %0.21 olarak gözlenirken, Avrupa Farmakopesi'nde yer almayan diğer türlerdeki flavonoit miktarları da belirlenmiştir (NS17: % 0.26, NS18: %0.15, NS19: %0.35, NS20: %0.13, NS23: %0.17, NS24: 0.14, NS25: %0.31, NS26: %0.24, NS28: %0.11). Elde edilen veriler bu anlamda değerli olup, *L. cardiaca* dışındaki diğer türlerle ilgili olarak ilk kez ortaya konmuştur.

Literatürden de anlaşılaacağı üzere birçok araştırmacı, total fenolikler ve antioksidan özellikler arasında güçlü bir korelasyon olduğunu bildirmiştir. Folin-Ciocalteu testi sonucunda çalışma konusunu oluşturan *Leonurus* türlerinin toprak üstü kısımlarından hazırlanan ekstrelerde gallik asite eşdeğer toplam fenolik madde miktarları 13.6 ile 170 mg GAE/g ekstre aralığında değişmiştir (Şekil 5.101).

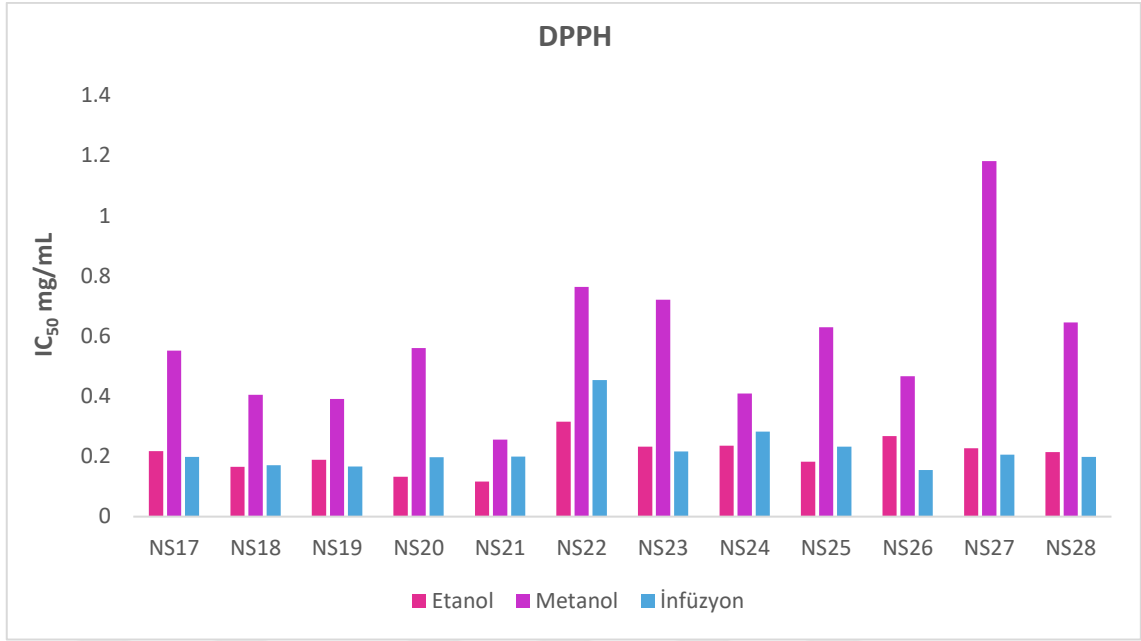


Şekil 5.101. *Leonurus* ekstrelerinin toplam fenol miktarı

Grafik incelendiğinde metanolü ekstrelerin, fenolik bileşikler açısından etanolü ekstrelere ve infüzyon örneklerine kıyasla daha düşük değerlerde olduğu gözlenmektedir.

Leonurus türlerinden farklı çözücülerle elde edilen ekstrelerde en yüksek değer (170 mg GAE/g ekst) NS21 kodlu etanolü ekstrede tespit edilmiştir. 4 türe ait toplam fenolik madde miktarı karşılaştırıldığında etanol ekstraksiyonu için sıralama; *L. cardiaca* (NS21)> *L. persicus* (NS25)> *L. glaucescens* (NS20)> *L. quinquelobatus* (NS17) şeklindedir. 4 türün infüzyonlarının içerdikleri fenolik madde miktarı kıyaslandığında; *L. quinquebatus* (NS18)> *L. persicus* (NS25)> *L. glaucescens* (NS20)> *L. cardiaca* (NS21) şeklinde sıralanmaktadır (Şekil 5.101).

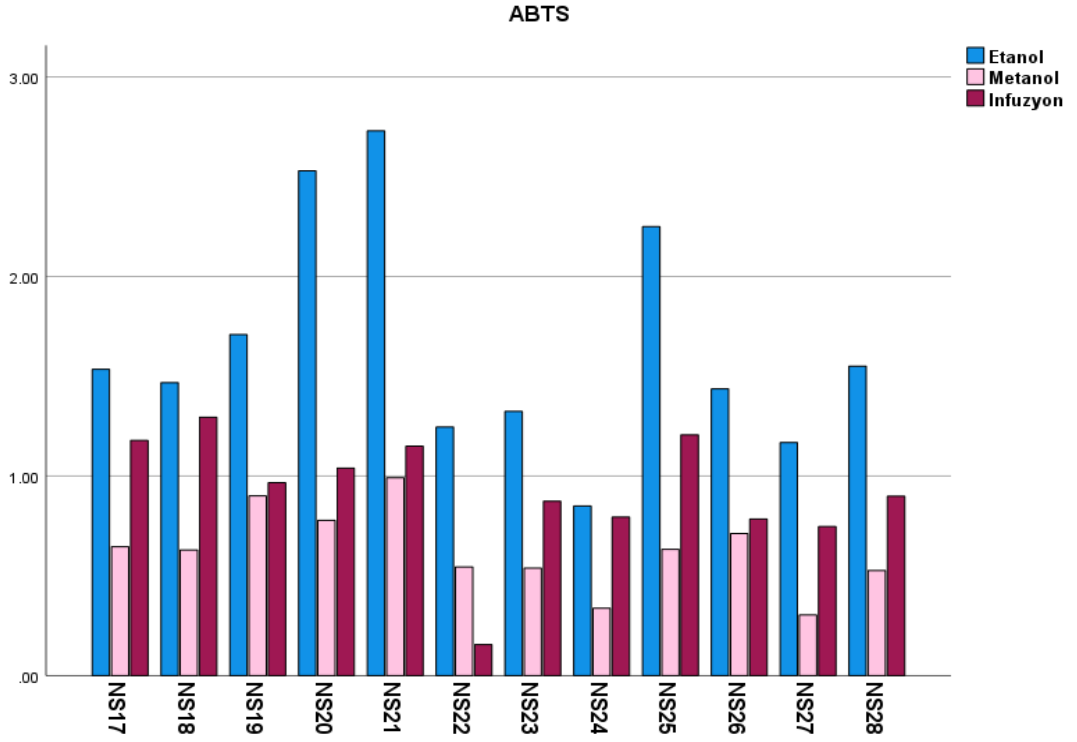
Leonurus türlerinde toplam fenol miktarlarının belirlenmesi, bu cinse ait türlerin fitokimyasal yapılarının aydınlatılması açısından önem taşımaktadır. Tez çalışması kapsamında, toplam fenol miktarı bakımından türler arasında bir değerlendirme yapılarak, yüksek fenolik maddeye sahip türler belirlenmiştir. Ayrıca aynı türün farklı lokalitelerden toplanan örneklerinin kıyaslanması yanı sıra, farklı çözücülerin etkileri de karşılaştırılmış ve fenolik bileşenlerin miktarı açısından farklılıklar gözlenmiştir. Bu sonuçlar, fenolik maddelerin varlığı ve miktarının genetik ve çevre faktörlerinin yanı sıra, toplama zamanı ve şekli, kurutma tekniği ve sıcaklığı, ekstraksiyon yöntemi ve analiz metodu gibi birçok faktöre bağlı olarak önemli farklılıklar gösterebileceğini doğrulamaktadır.



Şekil 5.102. *Leonurus* ekstrelerinin DPPH^{*} radikalini süpürme kapasiteleri

Antioksidan etki çalışmasında, ekstrelerin DPPH^{*} radikalini süpürücü etkileri değerlendirildiğinde, genel olarak türlerin infüzyon örnekleri ve etanol ekstrelerinde yakın değerler gözlenirken, fenolik bileşikler açısından etanollü ekstrele ve infüzyon örneklerine kıyasla daha zayıf olduğu gözlenen metanol ekstrelerinin etkilerinin de daha düşük olduğu gözlenmiştir (Şekil 5.102). İnfüzyon örneklerinde görülen antioksidan etki, türlerin halk arasında çay olarak kullanımını destekler niteliktedir. Elde edilen bulgular incelendiğinde, test edilen *L. cardiaca* örneklerinden NS 21E kodlu ekstrede (IC_{50} 0.117 mg/mL) en yüksek etki gözlenmiş olup, diğer türlere göre daha aktif olarak bulunmuştur. Bunu sırasıyla IC_{50} 0.133 mg/mL, IC_{50} 0.155 mg/mL, IC_{50} 0.166 mg/mL, IC_{50} 0.167 mg/mL, IC_{50} 0.171 mg/mL, IC_{50} 0.182 mg/mL, IC_{50} 0.189 mg/mL ve IC_{50} 0.197 mg/mL değerleri ile *L. glaucescens* türünün NS 20E kodlu ekstresi, *L. glaucescens* türünün NS 26INF kodlu ekstresi, *L. quinquelobatus* türünün NS18E kodlu ekstresi, *L. glaucescens* türünün NS 19INF kodlu ekstresi, *L. quinquelobatus* türünün NS18INF kodlu ekstresi, *L. persicus* türünün NS 25E kodlu ekstresi, *L. glaucescens* türünün NS 19E kodlu ekstresi ve *L. glaucescens* türünün NS 20INF kodlu ekstresi izlemiştir.

Antioksidan etki sonuçlarına göre, ekstrelerin hesaplanabilir düzeyde etki gösterdikleri ancak bu etkinin, gallik asitten (0.003 mg/mL) oldukça düşük olduğu da görülmektedir (Şekil 5.102).



Şekil 5.103. *Leonurus* ekstrelerinin Troloks'a eşdeğer antioksidan kapasiteleri

L. cardiaca ekstrelerinin ABTS^{•+} radikalini süpürücü etkileri değerlendirildiğinde, en yüksek TEAK değeri, NS21 kodlu etanol ekstresinde 2.73 mM olarak hesaplanmıştır. *L. glaucescens* türünden hazırlanan ekstrelerden en yüksek TEAK değeri ise, NS20 kodlu etanol ekstresinde 2.53 mM olarak hesaplanmıştır. *L. quinquelobatus* türünden hazırlanan ekstrelerde NS17 ve NS18 kodlu etanol ekstrelerinin TEAK değerlerinin birbirine yakın olduğu, metanol ekstrelerinin ise infüzyon ve etanol ekstrelerinden daha zayıf etkili olduğu belirlenmiştir. *L. persicus* türünden hazırlanan ekstrelerde antioksidan kapasitesi bakımından ekstrelerin sıralaması şu şekildedir: NS25E> NS25INF> NS25M.

Deney sonuçlarına göre tüm türler arasında en yüksek TEAK değeri, NS21E kodlu *L. cardiaca* türünde (2.73 mM) belirlenmiştir (Şekil 5.103). Bu örnekten sonraki en yüksek TEAK değerleri NS20E kodlu *L. glaucescens* (2.53 mM) ve NS25E kodlu *L. persicus* (2.25 mM) türlerinde tespit edilmiştir. *Leonurus* cinsine ait tüm türlerin ekstrelerinin bu test içerisinde kayda değer etkiye sahip olduğu görülmüştür. Ekstreler arasında özellikle etanollü ekstrelerin ve bunu takiben infüzyonların, metanole göre daha etkili oldukları gözlemlenmiştir (Şekil 5.103). Tüm türlerin etanol ekstrelerinin total antioksidan kapasiteleri şu şekilde sıralanmıştır: NS21> NS20> NS25> NS19> NS17>

NS28> NS18> NS26> NS23> NS22> NS27> NS24. Türlerin infüzyon ekstralarının total antioksidan kapasiteleri şu şekilde sıralanmıştır: NS18> NS25> NS17> NS21> NS20> NS19> NS28> NS23> NS24> NS26> NS27> NS22. *Leonurus* türlerinin metanol ekstralarının total antioksidan kapasiteleri şu şekilde sıralanmıştır: NS19> NS21> NS20> NS26> NS17> NS25> NS18> NS22> NS23> NS28> NS24> NS27 (Şekil 5.103).

Tez kapsamında elde edilen bulgular ve değerlendirmeler ışığında, DPPH[•] ve ABTS^{•+} sonuçları göz önüne alınarak, özellikle NS21E, NS20E, NS25E, NS18E, NS19E, NS26INF, NS19INF, NS18INF VE NS20INF ve kodlu ekstraların antioksidan kapasitelerinin diğer örneklerden yüksek olduğu belirlenmiştir. Bu sonuçlar *Leonurus* türlerinin etanol ekstralarının EMA'da belirtilen kullanımlarını desteklemektedir. Ayrıca, infüzyon örneklerinin gösterdiği antioksidan etkisi de, bitkilerin halk arasında çay olarak kullanımını destekler niteliktedir.

Fenolik asitler ve flavonoidler polar çözücülerde çözünürler ve polar sistemlerde güçlü aktivite gösterirler. Demir (III)'ü indirgeme reaksiyonu ve DPPH[•] radikal süpürücü etki testleri polar ortamlarda yapılmaktadır. Bu nedenle de bu bileşiklerce zengin ekstralar bu deney sistemlerinde etkili olarak bulunmuşlardır.

Bulgulara göre, farklı türler veya farklı lokasyonlardan toplanan aynı türler arasında antioksidan etki bakımından görülen bazı farklılıkların aktif fenolik bileşiklerin farklı içeriğinden kaynaklanacağı düşünülmüştür.

Ayrıca bu çalışmada elde edilen veriler, çalışmada kullanılan taksonların birbirleri ile karşılaştırılması bakımından değerli olduğu gibi, çay olarak tüketilmeleri durumunda alınan fenolik madde miktarı hakkında da bilgiler vermektedir. Yüksek miktarlarda fenolik madde içeren *Leonurus* türlerinden doğal antioksidan kaynağı olarak faydalanılabileceği sonucuna da varılmıştır. Çünkü toplam fenolik madde miktarı ile antioksidan etki arasında yüksek oranda yakın bir ilişki vardır [113].

Farmakolojik çalışmalar, *L. cardiaca*'nın antimikrobiyal [154]; [139] antioksidan [104]; [117] antiinflamatuvar [64]; [126], sedatif [204] ve hatta antikanser etkilere sahip olduğunu göstermiştir [148]. Ek olarak istenmeyen etkiler olarak, antitrombotik ve antiplatelet etkileri nedeniyle kanama riskini artırma potansiyeli ve benzodiazepinlerle ilişkili olduğunda komaya neden olabilecek sinerjik sedatif etkiye sebep olabileceği de bildirilmiştir [353]. Bunlara ek olarak, literatürde *Leonurus* türlerinin antimikrobiyal aktivitelerini değerlendirmek için yapılmış sınırlı sayıda çalışma bulunmaktadır.

Tez konusunu oluşturan *Leonurus* türlerinden hazırlanan ekstrelerle mikrodilüsyon yöntemi kullanılarak gerçekleştirilen antibakteriyal aktivite deneylerinde, ekstrelerin antibakteriyal etkisi *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus*, *Salmonella enterica* subsp. *enterica*, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus epidermidis* ve *Pseudomonas aeruginosa* olmak üzere 6 farklı bakteri türü üzerinde değerlendirilmiş, etanol ve metanol ekstrelerinin, farklı bakteri suşlarına karşı, infüzyon örneklerinden daha düşük dozda etkili oldukları gözlenmiştir. Tüm türlere ait örneklerden hazırlanan ekstrelerin, *P. aeruginosa*’a karşı zayıf etkili olmasının yanı sıra, ekstrelerin *E. coli* ve *Salmonella enterica* subsp. *enterica* türlerine karşı MİK değerlerinin 2 mg/mL olduğu belirlenmiştir. Ayrıca NS17 kodlu (*L. quinquelobatus*) metanol ekstresi diğer ekstrelere göre, tüm bakteri türleri üzerinde daha etkili olup, MİK değerleri 1-2 mg/mL olarak bulunmuş iken, *P. aeruginosa*’a karşı 4mg/mL olduğu gözlenmiştir. Standart antibakteriyal maddelerle karşılaştırıldığında ekstrelerin, kullanılan patojen bakterilere karşı zayıf inhibitör etkileri olduğu belirlenmiştir.

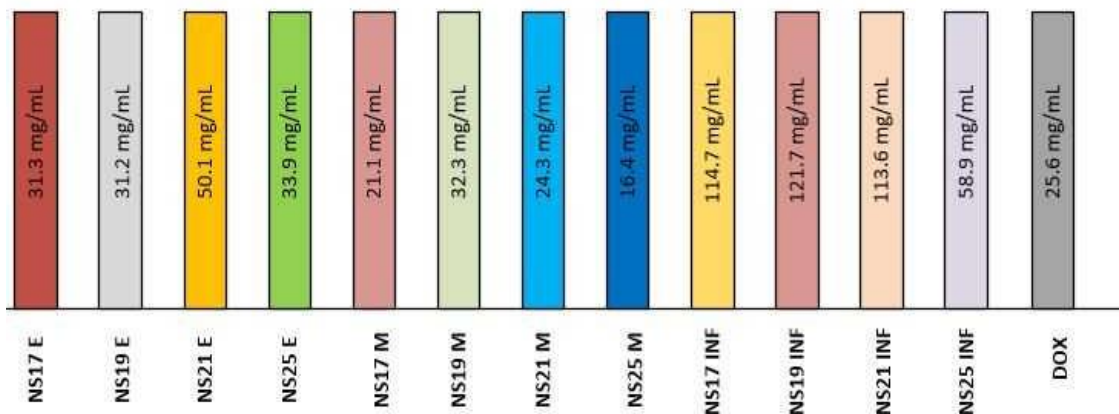
Mikrodilüsyon yöntemi kullanılarak gerçekleştirilen antikandidal aktivite deneylerinde ise, *Candida albicans*’ın iki farklı suşu ile birlikte toplam 6 farklı *Candida* türü kullanılmıştır. Bunlar; *Candida albicans*, *C. utilis*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* ve *C. krusei*’dir. Ekstrelerin 0.1 ile 1 mg/mL arasında değişen konsantrasyonlarda antikandidal etki gösterdikleri belirlenmiş, etanol ve metanol ekstrelerinin, *Candida* türlerine karşı, infüzyon örneklerinden daha düşük dozda etkili oldukları gözlenmiştir. Standart antikandidal maddelerle karşılaştırıldığında ekstrelerin zayıf etkili olduğu saptanırken, *C. utilis* ve *C. krusei* türlerinin NS25M (*L. persicus*) kodlu metanol ekstresine karşı diğer ekstrelerden daha duyarlı olduğu gözlenmiştir. Ayrıca NS25E (*L. persicus*) kodlu etanol ekstresinin de diğer ekstrelere kıyasla, *C. parapsilosis* ve *C. krusei* türleri üzerinde daha aktif olduğu (MİK: 0.125 mg/mL) gözlenmiştir. Ek olarak, *C. albicans*, *C. utilis*, *C. tropicalis* ve *C. krusei* suşlarına karşı daha etkili olan ekstrenin *L. persicus* türünün metanol ekstresi (NS25M) olduğu belirlenmiştir. Elde edilen bulgular, *Candida* türlerinin ekstrelere duyarlılığının bakteri türlerinden daha fazla olduğunu göstermiştir. Ancak veriler, ekstrelerin antimikrobiyal etkili özelliklere sahip bileşikler açısından zayıf olduğunu düşündürmektedir.

Kanser tedavisinde kullanılan kemoterapi gibi mevcut yöntemlerin hedeflenmemiş dokular üzerindeki toksik etkileri nedeniyle sınırlamaları vardır. Günümüzde kanser gelişimini tedavi etmek veya önlemek için birçok bitki türü zaten kullanılmaktadır.

Son yıllarda yapılan çalışmalarda, gelişmekte olan ülkelerde halk arasında kullanılan bitkilere odaklanılmakta ve antikanser özellikler gösteren bitki türleri tanımlanmaktadır. Bitkiye özgü olan, bitkinin hayatta kalması ve canlılığının devamı için gerekli olan bileşikler, büyümeyi inhibe etme ve kanserli hücrelerin apoptozunu başlatma yetenekleri nedeniyle araştırılmaktadır. Normal hücreler üzerindeki muhtemel toksik olmayan etkileri veya düşük toksisiteleri ve kanser hücreleri üzerindeki sitotoksik etkileri sebebiyle bitki kökenli olan ilaçlar klinik denemeler için talep görmektedirler. Literatürde bugüne kadar yapılan çalışmalar değerlendirildiğinde, tıbbi bitkilerden olan *Leonurus* üyelerinin de, gelecekte farklı kanser türleri için bir terapötik strateji sağlayabileceği ve araştırılması gereken bir grup olduğu düşünülmektedir.

Tez kapsamında sitotoksik aktivite tayini için, A549, MCF7 ve C6 hücre hatları üzerinde MTT yöntemi uygulanarak, *Leonurus* türlerinden hazırlanan ekstrelerin sitotoksik etkileri değerlendirilmiş ve doksorubisin referans ilaç olarak kullanılmıştır. Hücre canlılığının belirlenmesi için kullanılan MTT yönteminde, hücrelerin MTT indirgeme özelliği hücre canlılığının ölçütü olarak alınır ve analiz sonucunda elde edilen boya yoğunluğu canlı hücre sayısı ile korelasyon gösterir [295].

Sitotoksik etkiler değerlendirildiğinde, A549 akciğer kanser hücrelerine karşı ekstrelerin kıyaslanabilir etki (>1000 mg/mL) göstermediği gözlenmiştir. Yalnızca *L. persicus* türünün metanol ekstresi, hazırlanan diğer ekstrelerle kıyasla daha düşük konsantrasyonda etkili iken (IC_{50} : 601.8 mg/mL), ekstrelerin genel olarak 1000 mg/mL'nin üzerindeki konsantrasyonlarda etkili olabileceği belirlenmiştir.



Şekil 5.104. *Leonurus* ekstrelerinin C6 hücre dizilerine karşı IC_{50} değerleri (mg/mL)

Leonurus türlerinden hazırlanan ekstrelerin C6 kanser hücre dizisine karşı sitotoksik etkisi MTT yöntemi ile test edilmiş, IC₅₀ değerleri (mg/mL) hesaplanmıştır (Şekil 5.104). Etanol ve metanol ekstreleri C6 kanser hücre hattına karşı doksorubisin ile kıyaslanabilir ölçüde iyi sitotoksik etki göstermiştir. İnfüzyon numunelerine karşı hücre hattının duyarlılığının düşük olduğu belirlenmiştir. Ekstrelerin C6 hücre dizisine karşı IC₅₀ değerleri ile doksorubisinin IC₅₀ değeri karşılaştırıldığında NS25M, NS17M ve NS21M kodlu ekstrelerin IC₅₀ değerlerinin doksorubisine oranla daha düşük olduğu belirlenmiştir (Şekil 5.104). Bu ekstrelerin IC₅₀ değerleri NS25M için 16.4 mg/mL, NS17M için 21.1 mg/mL, NS21M için 24.3 mg/mL olarak kaydedilirken, referans ilacın IC₅₀ değeri doksorubisin için 25.6 mg/mL olarak belirlenmiştir. Ayrıca doksorubisine en yakın etkiye IC₅₀ değerleri sırasıyla 31.2 mg/mL, 31.3 mg/mL, 32.3 mg/mL ve 33.9 mg/mL olarak NS19E (*L. glaucescens*), NS17E (*L. quinquelobatus*), NS19M ve NS25E (*L. persicus*) kodlu ekstrelerde ulaşılmıştır (Şekil 5.104).

MCF7 hücre dizisinin de *Leonurus* türlerinden hazırlanan ekstrelelere karşı duyarlı olduğu ve ekstrelerin hücreleri inhibe ettikleri belirlenmiştir. Referans ilaç olan doksorubisinin, MCF7 kanser hücrelerine karşı sitotoksik etkisi IC₅₀ değeri 5.70 mg/mL olarak hesaplanmıştır. En yüksek sitotoksik etki, IC₅₀ değerleri sırasıyla 18.1 mg/mL ve 21.2 mg/mL olmak üzere *L. quinquelobatus* metanol (NS17M) ve *L. glaucescens* metanol (NS19M) ekstrelerinde belirlenmiştir. *L. cardiaca* metanol (NS21M), *L. quinquelobatus* etanol (NS17E) ve *L. glaucescens* etanol (NS19E) ekstrelerinin IC₅₀ değerlerinin birbirlerine yakın olduğu ve sitotoksik etkilerinin infüzyon örneklerinden daha yüksek olduğu tespit edilmiştir.

Klinik çalışma öncesi bu gözlemler, türlerin diğer farmakolojik amaçlarla kullanımını da desteklemektedir. Özellikle NS25M kodlu *L. persicus* ekstresinin C6 kanser hücrelerine karşı sitotoksik etkisi, tedavide kullanılan doksorubisin ile kıyaslanabilir düzeyde olup, etkiden sorumlu maddenin, YPSK/KS-KS analizine göre *L. persicus*'ta daha fazla bulunduğu belirlenen genkvanin olabileceğini düşündürmüştür. Ayrıca, A549 hücre dizisinde elde edilen negatif sonucun büyük olasılıkla, farklı kanser hücre hatlarının tez konusunu oluşturan *Leonurus* türleri ekstrelerindeki fenolik içeriğe duyarlılığındaki heterojeniteden kaynaklanıyor olabileceği şeklinde değerlendirilmiştir.

Sonuçlar, fenolik bileşikler açısından zengin *L. sibiricus* kök ekstrelerinin, A549 hücrelerine değil, CCRF-CEM, K-562 hücrelerine karşı doza bağlı bir sitotoksositeye sahip olduğunu gösteren Sitarek ve diğerlerinin sonuçlarıyla ve yine major bileşiklerinin

klorojenik asit ve kafeik asit olduğu bildirilen *L. sibiricus* ekstrelerinin, glioma hücrelerinde mitokondriyal membran potansiyelini azalttığı tespit edilen bir diğer çalışma ile de tutarlıdır [15, 146].

Literatür, çeşitli polifenollerin büyüme, farklılaşma ve apoptoz gibi bir dizi hücre fonksiyonunu etkilediğini [354] ve potansiyel kanserojenlerin metabolik aktivasyonunu değiştiren ksenobiyotik metabolize eden enzimlerle birlikte kanser hücrelerini inhibe edebildiklerini bildirmektedir [355]. Fenoliklerin mitoz sırasında hücre bölünmesini bozarak antikanser aktivite gösterdiği, ayrıca hücre protein seviyesini, mitotik indeksi ve kanser hücresi çoğalması sırasında koloni oluşumunu azalttığı da bildirilmiştir [356].

5.13. YPSK/KS-KS analizine ilişkin bulguların değerlendirilmesi

Leonurus cinsine ait türlerin kimyasal bileşenlerini ve farmakolojik mekanizmasını ortaya çıkarmak için yapılan araştırmalar esas olarak *L. japonicus* (Doğu Asya), *L. cardiaca* (Avrupa), *L. persicus* (Türkiye, İran), *L. glaucescens* (Kuzeybatı Asya) ve *L. turkestanicus* (Orta ve Batı Asya) üzerinde odaklanmıştır. Literatürde, *Leonurus* cinsine ait türler için fenolik bileşiklerin bileşimi ve içeriği ile ilgili olarak sınırlı bilgi olmasına karşın, terpenoit serisinin bileşikleri (izoprenoitler, diterpenler) ve iridoitlerle ilgili çalışmalar ağırlıklıdır.

L. cardiaca'dan elde edilen ekstrelerin değerli enzim inhibe edici ajan kaynakları olarak kabul edilebileceği, saflaştırılmış *L. cardiaca* özlerinin, gıda takviyelerine dahil edildiğinde, karbonhidrat bakımından zengin bir diyetten sonra Diabetes mellitus hastalarında kan glukoz düzeyini yönetmek için potansiyel olarak yararlı olabileceği önceki çalışmalarda bildirilmiştir [113].

L. cardiaca toprak üstü kısımlarından hazırlanan polar ekstrelerin, kardiyak ve jinekolojik rahatsızlıklara karşı koruma sağlamada önemli bir rol oynayan bileşikler (alkaloit, iridoit, labdan diterpen ve feniletanoit glikozitler) içerdiği bildirilmiştir.

Polonya'dan toplanan *L. cardiaca*'nın toprak üstü kısımlarından hazırlanan ekstreler spektrofotometrik deneyler ve HPLC-DAD-MS analizleri ile kimyasal olarak karakterize edilmiş, fenolik asitler (klorojenik, kafeik, kafeoilmalik ve trans-ferulik asitler), flavonoidler (rutin ve kersetin), feniletanoit glikozitler (verbaskozit ve lavandulifoliosit), guanidin psödoalkaloitleri (leonurin), iridoitler (harpagit), diterpenler (forskolin) ve triterpenler (ursolik asit) belirlenmiş ve bu bileşenlerin biyoaktivitelerdeki ana varyasyonları etkilediği bildirilmiştir [113]. Bir başka çalışmada da hem

lavandulifoliosit hem de verbaskozitin varlığının, Leonuri cardiae herba için pozitif bir taksonomik belirteç olduğu belirtilmiştir [62].

Literatür verileri ile yapılan karşılaştırmada, çalışmamızda bulunan fenolik bileşenlerin ve konsantrasyonlarının uyumlu olduğu, ancak farklı ekstraksiyon prosedürlerinden ve bitkinin değişkenlerinden (bitki kökeni, toplanma zamanı, bitki olgunlaşması, habitat) kaynaklı olarak bazı farklılıklar gösterdiği değerlendirilmiştir. Ayrıca, *L. cardiae*'nin çeşitli biyolojik aktivitesinden terpenler (iridoitler, diterpenler ve ursolik asit), alkaloitler (leonurin), hidroksisinnamik asit türevleri ve fenilpropanoitler (lavandulifoliosit) grubuna ait bileşiklerin sorumlu olabileceği; ancak diğer bileşik gruplarının etkisinin de hariç tutulamayacağı düşünülmektedir.

Bitkiler aleminde yaygın bir şekilde bulunan hidroksisinnamik asit türevleri, antioksidan etkilerinden dolayı oksidatif stresle ilişkili başta kardiyovasküler sistem ve kanser gibi hastalıklar üzerine etkilerinden dolayı birçok çalışmanın konusunu oluşturmaktadır. Yapılan YPSK-KS/KS analizinde *Leonurus* türlerinin alkol ekstratlarında kafeik asit ve türevlerine rastlanmıştır. Hidroksisinnamik asit türevlerinin antioksidan etki göstermelerinde radikal süpürücü etkileri, hücre proliferasyonunu engelleyici etkilerinin rol oynadığı ve kanser hücrelerinin invazyon ve metastazını engellediği çeşitli çalışmalarla bildirilmiştir [357-359].

Fenolik antioksidanlar grubunun büyük bir bölümünü oluşturan flavonoid türevlerinin, çeşitli kanser hücre hatlarında antiproliferatif etkili oldukları ve bazı hayvan modelleri ile tümör gelişimlerini önledikleri bilinmektedir [360]. Birçok çalışmada, genkvaninin tümör hücresi proliferasyonunu inhibe ederek ve antioksidan potansiyelini artırarak tümör büyümesini baskıladığı gösterilmiştir [234-236]. Ayrıca farmakolojik çalışmalarda, genkvaninin antibakteriyel [237, 238], radikal süpürücü [240] ve kemopreventif [241] olmak üzere çeşitli etkilere sahip olduğu bildirilmiştir. Genkvanin en yüksek olarak *L. persicus*'un metanol ekstresinde bulunmuştur ve bu ekstre antikandidal ve sitotoksik aktivitede en etkili ekstre olmuştur. Bazı çalışmalarda genkvanin, *Leonurus* cinsinin kemotaksonomik bir belirteci olarak önerilmektedir [104, 171, 172].

Yapılan analizde *Leonurus* türlerinin alkol ekstratlarında genkvanin, verbaskozit, kafeik asit ve kersetin rutinozit belirlenmiştir. *L. cardiae*, *L. japonicus* ve *L. sibiricus* türlerinin mikroskopik ve fitokimyasal olarak karşılaştırıldıkları bir çalışmada; verbaskozitin varlığının bitki materyalinin tanımlanmasında ve üç tür arasındaki ayrım

önemli olduğu, ayrıca *L. cardiaca*'da daha kuvvetlice bulunduğu bildirilmiştir [30]. Türlerin alkollü ekstrelerinin kromotagramları değerlendirildiğinde, *L. cardiaca*'da verbaskozitin yüksek miktarda bulunduğu belirlenmiştir. Ayrıca verbaskozitin *L. glaucescens*'in alkol ekstresinde diğer türlerden daha az bulunduğu belirlenmiştir. Feniletanoit glikozidi olan verbaskozitin, tümörlerin kimyasal olarak önlenmesinde etkili olduğu [211, 212] anti-enflamatuar [213, 214] ve kardiyoprotektif etkilere sahip olduğu [219], bunun yanında birçok deneysel çalışmada antioksidan aktivite gösterdiği, doğrudan antioksidatif serbest radikal temizleyici etkilere sahip olduğu bildirilmiştir [218, 220-223]. Verbaskozit yönünden zengin bitkiler, halk arasında inflamasyon ve mikrobiyal enfeksiyonları tedavi etmek için kullanılmakta olup, antimikrobiyal etki gösterdiği birçok çalışmada [230-232] da bildirilmiştir.

L. quinquelobatus, *L. glaucescens* ve *L. cardiaca*'nın alkollü ekstrelerinde bulunan bir diğer feniletanoit glikozit olan lavandulifolioside, *L. persicus*'ta rastlanmamıştır. Lavandulifoliositin önemli bir negatif kronotropizm üreterek, atrioventriküler aralıklarında uzama ve kan basıncında bir düşüşe neden olabileceği bildirilmiştir [113].

Ekstrelerde 10 farklı flavon glikoziti (verbaskozit, kafeoil glukozit, luteolin/kamferol glukozit, luteolin/kamferol rutinozit, kersetin rutinozit, kersetin diglukozit, kersetin glukozit, kersetin asetilglukozit, apigenin rutinozit, apigenin glukozit) belirlenebilmiştir. Ek olarak ekstrelerin YPSK-KS/KS analizlerinde, protokateşik asit, prokateşik aldehit, protokateşik asit heksozit, loganik asit, glukarik asit, rosmarinik asit, kersetin heksozit, sakkarik asit tespit edilmiştir.

YPSK-KS/KS analizinde elde edilen veriler değerlendirildiğinde, *L. persicus* türünün metanol ekstresinde yüksek miktarda bulunan genkvaninin, antikandida ve antikanser etkinden sorumlu madde olabileceği düşünülmektedir. Ekstrelerin kimyasal bileşimindeki farklılıkların biyoaktivitelerini etkilediği sonucuna varılmıştır. *Leonurus* türlerinin toprak üstü kısımlarının *in vitro* biyolojik aktivitelerinin araştırılması ve etkiden sorumlu olabilecek bileşikler hakkında fikir sahibi olunması, gelecekte yapılacak araştırmalara kaynak teşkil edecektir. Türkiye'de yetişen *Leonurus* türlerinden hazırlanan ekstratların farklı kanser türlerine karşı potansiyel bir terapötik ajan olarak kullanılabilmesinin değerlendirilmesi için daha fazla *in vitro* ve *in vivo* çalışmaya ihtiyaç olduğu düşünülmektedir.

5.14. Moleküler Bulguların Değerlendirilmesi

Bitki türlerinin morfolojik karakterlere dayanılarak yapılan taksonomik sınıflandırması, bitkinin yaşına, fizyolojik durumuna ve çevresel faktörlere bağlı olarak değişiklik göstermekte ve bazı durumlarda yetersiz kalmaktadır. Özellikle farklı ekolojik şartlarda yetişen aynı türe ait farklı popülasyonlardaki morfolojik farklılıklar ve ekotipler taksonomik problemlere neden olabilmektedir. Moleküler çalışmalar, bu tür taksonomik problemlerin çözümünde önemli katkılar sağlamaktadır. Geliştirilen moleküler genetik markırlar bitkilerdeki genetik çeşitliliğinin ortaya konmasında, bitki türleri arasındaki taksonomik ve filogenetik ilişkilerin doğru bir şekilde belirlenmesinde başarıyla kullanılmaktadır.

DNA dizi analizi çalışmaları, son yıllarda bitki sınıflandırmasında yoğun olarak kullanılmaktadır. Angiospermilerin son sınıflandırma sistemi APG4 (Angiosperm Phylogeny Group) çoğunlukla moleküler tabanlı bir bitki taksonomisi sistemidir [361]. Özellikle ITS bölgesi son zamanlarda en çok çalışılan bölgelerden biri olmuştur. Bu çalışmaya konu olan *Leonurus* cinsinde yer alan türlerin ve popülasyonların morfolojik ve kimyasal özelliklere dayanılarak ayrılması bazen zor olmaktadır. Çünkü bu özellikler çevresel faktörlerden etkilenebilmektedir. Böyle bir durumda DNA seviyesindeki çalışmalar daha anlamlı olabilecektir.

Bu olgudan hareketle, Türkiye’de doğal olarak yetişen *Leonurus* türlerinin genetik akrabalığı sekans analizleri ile ilk kez bu çalışma ile araştırılmıştır. Tez konusunu oluşturan *Leonurus* türlerinin moleküler özellikleri ile ilgili olarak literatürde oldukça sınırlı sayıda çalışmaya rastlanması, bu kısma ait elde edilen verilerin önemini arttırmaktadır.

Bu çalışmada Türkiye’de yayılış gösteren *Leonurus* cinsine ait türlerde genetik yakınlığın belirlenmesinde moleküler teknikler kullanarak, taksonlar arasındaki ilişkiler belirlenmiştir. *Leonurus* cinsine ait taksonların ITS bölgelerinin DNA baz sıraları elde edilmiş ve DNA dizilerine dayalı olarak filogenetik benzerlik durumları ilk kez ortaya konmuştur.

Filogenetik analiz, bazen uzmanlık ve yıllar gerektiren karmaşık bir süreç olarak kabul edilse de aslında, hızlı ve etkili bir şekilde uygulanabilen bir süreçtir. Filogenetik ağaç, taksonlar (veya diziler) ve varsayımsal ortak ataları arasındaki ilişkilerin bir tahminidir. DNA veya protein dizileri gibi moleküler verilerden yapılmış olan moleküler

filogenetik ağacın amacı, bu dizilerle temsil edilen türler arasındaki ilişkileri tahmin etmektir.

Bu çalışmada, tüm türlere ait sekanslara homolog sekansları tanımlamak için, türlerin sekansları bir sorgu olarak kullanılıp, Gen Bankası'na daha önceden girişi yapılan verilerle karşılaştırmalar yapılmıştır. Elde edilen dizilerin gen bankasındaki en yakın temsilcileri Tablo 5.25-29'da verilmiştir. *Leonurus* cinsinin DNA dizileri ile Gen Bankası sekans verileri karşılaştırılarak, Neighbor Joining metodu ile oluşturulan filogenetik ağaç incelendiğinde; türlerin en yakın oldukları cinsler görülmektedir (Şekil 5.107-111).

Ek olarak sekanslanan diziler Mega X programında hizalanarak, dizilerle filogenetik ağaç oluşturulmuş ve sonuçlar değerlendirilmiştir.

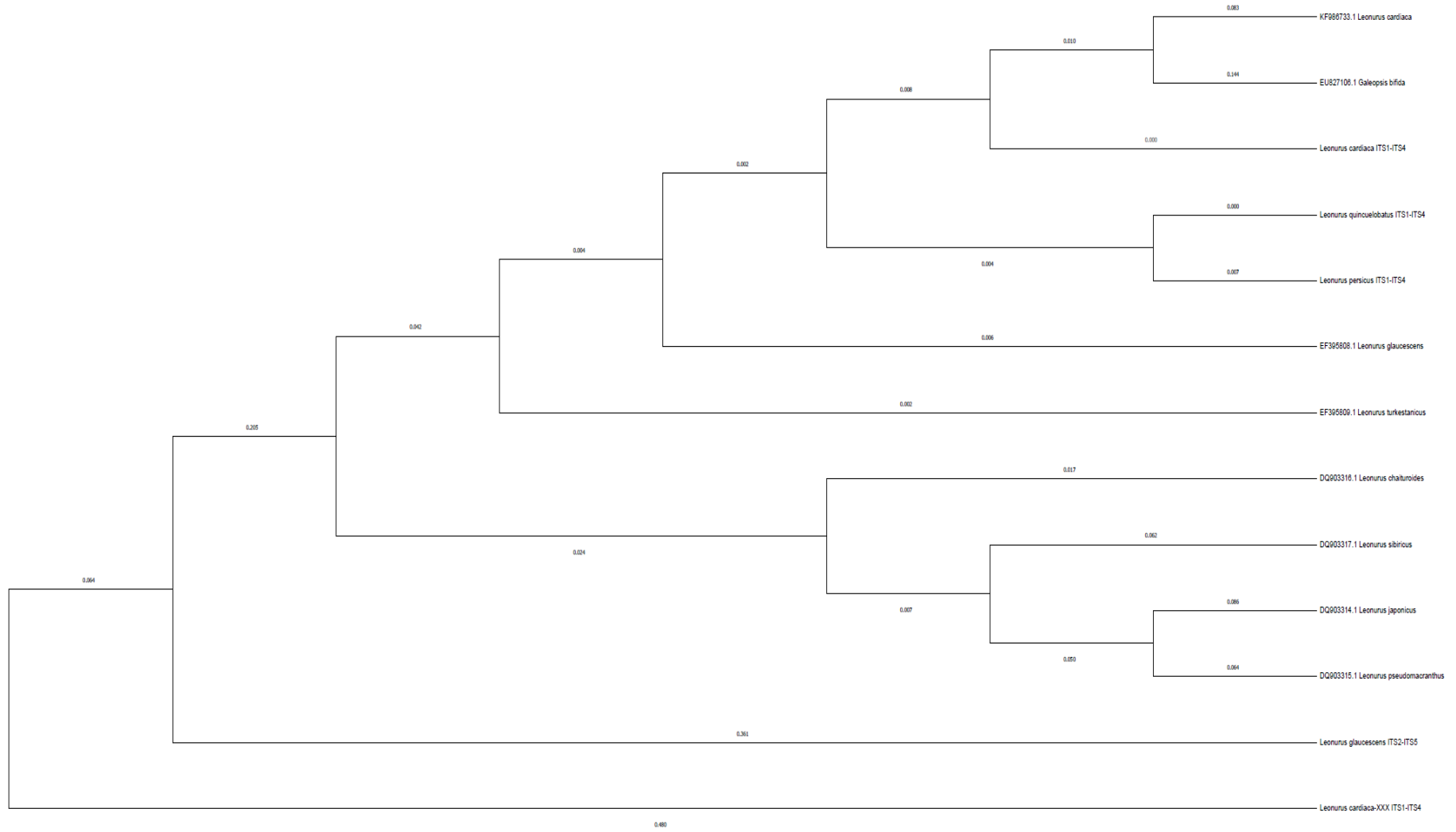
Leonurus cinsi üyeleri ile ilgili olarak Mega X programında yapılan filogenetik analizlerde değerlendirme yapılırken, Gen Bankası'nda yer alan dünyadaki diğer *Leonurus* türlerine ait ITS baz dizileri (sekans) alınmış ve oluşturulan ağaçta dış grup olarak öncelikle Lamicaeae familyasına taksonomik açıdan en yakın familya olarak bilinen Verbenaceae familyasından *Verbena officinalis* L. türü seçilmiştir (Şekil 5.105). Filogenetik ağaçta *V. officinalis* taksonlardan bariz şekilde ayrılmıştır. Analiz sonuçları değerlendirildiğinde, *L. cardiaca* türü için daha önce girilmiş Gen Bankası sekans sonuçları ile verilerin uyumlu olduğu gözlenmektedir. Arazi çalışmalarında diğer *L. cardiaca* popülasyonlarından morfolojik olarak farklı görülen Kocaeli popülasyonunun genetik olarak da farklılaştığı filogenetik ağaçta görülmektedir. Bunun yanında ülkemizde yetişen türlerin Dünya'daki türlerden belirgin bir şekilde ayrı gruplarda yer almaları coğrafik bir farklılaşmanın da göstergesidir.

Diğer bir değerlendirmede, Türkiye Florası'nda *Leonurus* cinsine yakın cins olan *Galeopsis*'in bir üyesi olarak *Galeopsis bifida* Boenn. seçilmiştir (Şekil 5.106). Dış grup olarak *G. bifida* seçilerek oluşturulan filogenetik ağaçta daha önce girilen Gen Bankası sekans verilerine göre; *G. bifida* ile *L. cardiaca*'nın yakın olduğu, tarafımızdan toplanan *L. cardiaca*'nın da onlara benzer olduğu gözlenmektedir. *L. quinquelobatus* ve *L. persicus* türlerinin yakın olduğu, bunların *L. cardiaca*'nın içinde bulunduğu gruba yakın olduğu görülmektedir. *L. glaucescens*'in, bu gruplara uzak olarak yer almasının, ITS2-ITS5 primerleri ile çalışılmasından olduğu düşünülmektedir.

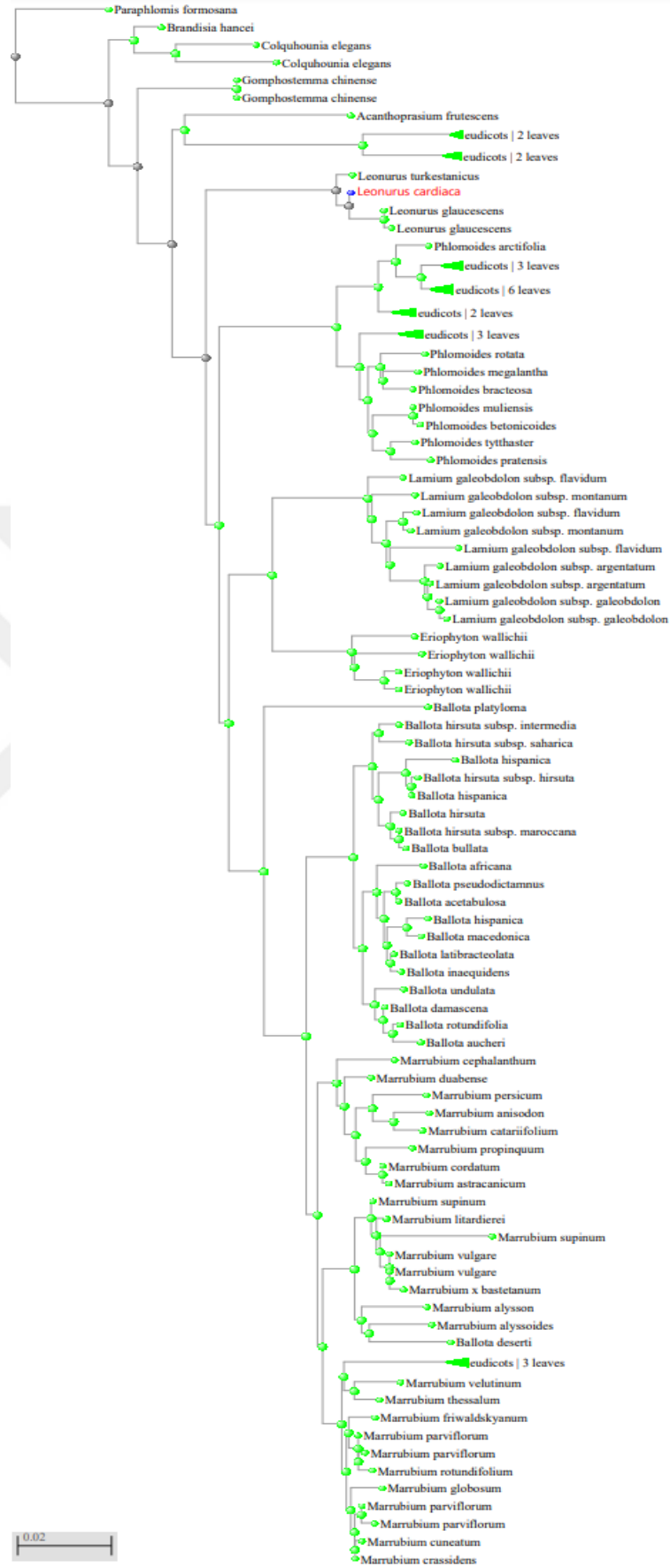
Polonya'da, *L. cardiaca* ve *L. quinquelobatus* türlerinin genetik polimorfizmlerini ve aralarındaki ilişkileri belirlemek için, nüklear, mitokondriyal ve kloroplast genomları RAPD ve PCR-RFLP belirteçleri kullanılarak analiz edilmiştir. 39 RAPD primeri, 128'i

polimorfik olan ve iki form arasında neredeyse eşit olarak dağıtılmış toplam 234 nükleer DNA fragmanı üretilmiştir. Karşılaştırılan RAPD profil çiftlerinin %87'sinin birbirinden farklı olduğu bulunmuştur [33]. Elde edilen sonuçlar, bu formların *L. cardiaca* ve *L. quinquelobatus* olmak üzere ayrı türler olarak tanınmasını haklı çıkarmaktadır. Çalışma sonuçları, verilerimizle uyumludur.





Şekil 5.106. Taksonların ITS baz dizilimlerine göre oluşturulan filogenetik ağaç (dış grup *Galeopsis bifida*)



Şekil 5.107. *L. cardiaca*'nın (NS21) ITS baz dizilimlerine göre (ITS1-ITS4) oluşturulan filogenetik ağaç



Şekil 5.111. *L. cardiaca*'nın (NS24) ITS baz dizilimlerine göre (ITS1-ITS4) oluşturulan filogenetik ağaç

Gen Bankası'ndaki dizilerle, tarafımızdan toplanan türlerin elde edilen dizilerinin (ITS1) karşılaştırılması ile yakın cinsleri belirlemeye yönelik olarak oluşturulan filogenetik ağaçlar değerlendirildiğinde, *L. cardiaca*'nın (NS21), *L. turkestanicus* ve *L. glaucescens* ile aynı grupta yer aldığı ve benzer olduğu gözlenmektedir (Şekil 5.107).

L. quinquelobatus'un *L. turkestanicus* ve *L. glaucescens* ile aynı grupta yer aldığı ve benzer olduğu gözlenirken, Türkiye'de yayılış göstermeyen diğer *Leonurus* türlerinin ayrı bir grup oluşturduğu belirlenmiştir (Şekil 5.108).

L. glaucescens'in *L. turkestanicus* ve *L. cardiaca* ve daha önce veri girişi yapılan *L. glaucescens* ile aynı grupta yer aldığı ve benzer olduğu gözlenirken, Türkiye'de yayılış göstermeyen *L. japonicus* ve *L. pseudomacranthus* Kitagawa, Bot. Mag.'un ayrı bir grup oluşturduğu gözlenmektedir (Şekil 5.109).

L. persicus'un DNA dizileri karşılaştırıldığında, *L. turkestanicus* ve *L. glaucescens* ile aynı grupta yer aldığı ve benzer olduğu gözlenirken, Türkiye'de yayılış göstermeyen *L. japonicus* ve *L. chaituroides* C.Y. Wu & H.W. Li'nin ayrı bir grup oluşturduğu belirlenmiştir (Şekil 5.110).

Bir diğer lokaliteden toplanan *L. cardiaca*'nın (NS24) ise *L. glaucescens* ve *L. turkestanicus* ile aynı grupta yer aldığı ve benzer olduğu gözlenirken, Türkiye'de yayılış göstermeyen *Leonurus* türlerinin ayrı bir grup, *L. chaituroides*'in ayrı bir grup oluşturduğu gözlenmiştir (Şekil 5.111).

Bu tez çalışması ile, Türkiye'de yetişen *Leonurus* türlerine ait DNA dizilerinin belirlenmesi, Gen Bankası verileri ile yapılan karşılaştırmalar ile türler arasındaki benzerliğin değerlendirilmesi ve yakın olabilecek cinslerin ve benzerlik oranlarının belirlenmesi gibi bilgilerin literatüre ilk kez sunulmasının önemli bir katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

6. SONUÇLAR ve ÖNERİLER

Eski ve geleneksel tıbbi kullanımı olduğu bilinen ve birçok farmakopede kayıtlı olan *Leonurus* cinsi ile ilgili kaynak taramalarında ülkemizde yayılış gösteren türlerle ilgili detaylı bir çalışmaya rastlanmamıştır.

Bu doktora tez çalışmasında, Türkiye’de yayılış gösteren *Leonurus* türlerinin, morfolojik, anatomik karakterleri ve polen yüzey ornamentasyonlarına ait özellikler ilk kez tanımlanmıştır. Morfolojik sonuçlar Türkiye Florası sonuçları ile uyumlu olup, florada belirtilmeyen karakterlere ait ölçümlerle deskripsiyon genişletilmiştir. Deskripsiyonda ayırt edici karakterler belirlenmiş ve iki farklı teknikle istatistiksel olarak değerlendirmeler yapıp, çizilen dendogramda türlerin morfolojik olarak farklılıkları ve benzerlikleri ortaya konmuştur. Polen özellikleri SEM kullanılarak belirlenmiştir ve polenler radyal simetrlili, isopolar, trikolpat ve eliptik olup, polen şekli prolat, ornamentasyon ise retikulattır. Çalışmanın bu kısmında *Leonurus* türleri arasındaki makro, mikro morfolojik, anatomik, palinolojik benzerlik ve farklılıklar ortaya konmuş olup, cins üzerinde yapılacak olan taksonomik değerlendirmelere katkı sağlamaya ve daha sonraki araştırmalara kaynak oluşturulmaya çalışılmıştır.

Ülkemizde yayılış gösteren 4 tür, 12 farklı lokaliteden toplanmış ve toprak üstü kısımlarından hazırlanan ekstreler, antioksidan aktivite, toplam fenol miktarı, antimikrobiyal aktivite ve sitotoksik etki açısından değerlendirilmiştir. *Leonurus* türlerinin toplam fenolik madde miktarları gallik asit eşdeğeri cinsinden belirlenmiş, türlere ait toplam fenolik madde miktarları 13.6-170 mg GAE/g aralığında değişmiştir. En yüksek değerin (170 mg GAE/g) tespit edildiği Bursa’dan toplanan NS21 kodlu *L. cardiaca* taksonunda, DPPH[•] ve ABTS^{•+} yöntemleri ile yapılan değerlendirmelerde de, antioksidan etkinin en yüksek olduğu görülmüştür. Elde edilen sonuçlar, pek çok çalışmada da belirtildiği gibi, toplam fenol miktarı ile antioksidan aktivite arasında bir korelasyon olduğunu doğrulamıştır. Avrupa Farmakopesi’ne göre yapılan İTK analizinde iridoitlerin varlığı ve yakın lokalitelerden toplanan türlerin kimyasal içeriğinin benzer olabileceği belirlenmiştir. Ayrıca Avrupa Farmakopesi’ne göre, [35] *Leonuri cardiaceae* herba minimum %0.2 flavonoit içermelidir. Farmakopede önerilen metoda göre yapılan deney sonucunda, farklı lokalitelerden toplanan *L. cardiaca* örneklerinden 3 tanesinde (NS21, NS22, NS27) flavonoit miktarı sırasıyla %0.24, %0.33 ve %0.21 olarak gözlenirken, Avrupa Farmakopesi’nde yer almayan diğer türler de flavonoit miktarları

tespit edilmiştir. Elde edilen veriler bu anlamda değerli olup, Avrupa Farmakopesi'nde yer almayan diğer türlerle ilgili olarak ilk kez ortaya konmuştur.

Tez kapsamında elde edilen antioksidan etki bulgularının değerlendirilmesi ışığında, DPPH[•] ve ABTS^{•+} sonuçları göz önüne alınarak, özellikle NS21E, NS25E, NS18E, NS19E, NS18INF, NS20INF, NS21INF VE NS25INF kodlu ekstrelerin gösterdiği antioksidan etkinin diğer örneklerden yüksek olduğu belirlenmiştir. Bu sonuçlar *Leonurus* türlerinin etanol ekstrelerinin EMA'da rapor edilen kullanımlarını desteklemektedir. Ayrıca, genel olarak türlerin etanol ekstreleri ile yakın değerler gösteren ve metanol ekstrelerinden daha fazla miktarda toplam fenol miktarı tespit edilen infüzyon örneklerinde görülen etki de, türlerin halk arasında çay olarak kullanımını destekler niteliktedir.

Sonuç olarak, türlerin kimyasal bileşimindeki farklılıkların biyoaktivitelerini etkilediği, *Leonurus* türlerinden hazırlanan ekstrelerin, önemli antioksidan özelliklere sahip fitokimyasallar içerdiği söylenebilir. Sonuçlar bu bitkisel hammaddelerden üretilen preparatların oksidatif stresin neden olduğu hastalıkların tedavisinde etkili önleyici araçlar ve değerli ek ilaçlar olarak kullanılabileceğini düşündürmektedir.

Toprak üstü kısımlardan hazırlanan ekstrelerin antimikrobiyal etkileri 12 patojen mikroorganizmaya karşı denenmiş ve standart antibakteriyel maddelerle karşılaştırıldığında tüm ekstrelerin zayıf etkili oldukları saptanmıştır. NS17 kodlu (*L. quinquelobatus*) metanol ekstresi diğer ekstrelere göre, tüm bakteri türleri üzerinde daha etkili olup, MİK değerleri 1-2 mg/mL olarak bulunmuş iken, *P. aeruginosa*'a karşı 4mg/mL olduğu gözlenmiştir. Ayrıca, ekstrelerin 0.1 ile 1 mg/mL arasında değişen konsantrasyonlarda antikandida etki gösterdikleri belirlenmiş, etanol ve metanol ekstrelerinin, *Candida* türlerine karşı, infüzyon örneklerinden daha etkili oldukları gözlenmiştir. Standart antikandida maddelerle karşılaştırıldığında tüm ekstrelerin zayıf etkili olduğu saptanırken, *C. utilis* ve *C. krusei* türlerinin NS25M (*L. persicus*) kodlu metanol ekstresine karşı diğer ekstrelerden daha duyarlı olduğu gözlenmiştir. Ayrıca NS25E (*L. persicus*) kodlu etanol ekstresinin de diğer ekstrelere kıyasla, *C. parapsilosis* ve *C. krusei* türleri üzerinde daha aktif olduğu (MİK: 0.125mg/mL) gözlenmiştir. Bu sonuçlar ekstrelerin antimikrobiyal etkili özelliklere sahip bileşikler açısından zayıf olduğunu düşündürmektedir.

Türlerden farklı çözücülerle hazırlanan ekstrelerin sitotoksik etkilerinin değerlendirilmesi için A549, MCF7 ve C6 hücre hatlarında MTT testi uygulanmıştır. Elde

edilen ekstrelerin antikanser etkinliklerinin kıyaslanabilmesi amacı ile günümüzde kanser tedavisinde rutin olarak kullanılan geniş antitümör spektrumuna sahip, kinin içeren bir antitümör antibiyotik olan doksorubisin kullanılmıştır. Toprak üstü kısımlardan hazırlanan ekstreler doksorubisin ile kıyaslandığında, A549 hücre hattı üzerinde zayıf etkili olduğu, ancak MCF7 ve özellikle C6 hücre hattı üzerinde oldukça etkili oldukları MTT testi ile ortaya konmuştur. *L. persicus* türünün metanol ekstresinin antikandidal ve antikanser etki bakımından en etkili ekstre olduğu belirlenmiştir. Bulgular değerlendirildiğinde, ekstrelerin kimyasal bileşimindeki farklılıkların sitotoksitelerini etkilediği sonucuna varılmıştır. *Leonurus* cinsine ait türlerde bu tür etkilerin belirlenmesi dikkat çekicidir ve bu cinse ait türlerin detaylı olarak incelenmesi açısından önem taşımaktadır.

Elde edilen biyolojik etkilerin değerlendirilmesi açısından, her bir ekstrenin kimyasal bileşimleri YPSK-KS/KS ile analiz edilmiş, ana bileşenler (genkvanin, verbaskozit) belirlenmiştir. Genkvanin *Leonurus* cinsinin kemotaksonomik bir belirteci olarak önerilmektedir [104, 171, 172].

Leonurus türlerinin alkol ekstrelerinde genkvanin, verbaskozit, kafeik asit ve kersetin rutinozite rastlanmıştır. Ayrıca ekstrelerde 10 farklı flavon glikoziti (verbaskozit, kafeoil glukozit, luteolin/kamferol glukozit, luteolin/kamferol rutinozit, kersetin rutinozit, kersetin diglukozit, kersetin glukozit, kersetin asetilglukozit, apigenin rutinozit, apigenin glukozit) belirlenebilmiştir. Ek olarak ekstrelerin YPSK-KS/KS analizlerinde, protokateşik asit, prokateşik aldehit, protokateşik asit heksozit, loganik asit, glukarik asit, rozmarinik asit, kersetin heksozit, sakkarik asit tespit edilmiştir.

YPSK/KS-KS analizinde elde edilen veriler değerlendirildiğinde, *L. persicus* türünün metanol ekstresinde yüksek miktarda bulunan genkvaninin, antikandidal ve antikanser etkinden sorumlu madde olabileceği düşünülmektedir. *L. cardiaca*'da verbaskozitin fazla miktarda bulunması da, önceki çalışma sonuçları ile uyumludur.

Ek olarak, tez konusunu oluşturan türlerin, DNA dizi analizleri için nüklear ribozomal DNA (5.8 S) ITS primerleri kullanılmıştır. Bu gen bölgeleri sekanslanarak, Gen Bankası verileri ile yapılan karşılaştırmalar ile türler arasındaki ilişkiler incelenmiştir. Elde edilen sonuçlara göre ITS primerleri ile türler düzeyinde başarılı bir ayırım yapılmıştır. *Leonurus* cinsine yakın olabilecek cinsler ve benzerlik oranları da belirlenmiş ve bu bilgiler literatüre ilk kez sunulmuştur. Ayrıca Türkiye'de yetişen

Leonurus türlerine ait DNA dizilerinin Gen Bankası'na ilk kez girişı de tarafımızdan gerçekleştirilmiştir.

Tez kapsamında elde edilen sonuçların, *Leonurus* cinsine ait taksonomik ve sistematik açıdan önemli olduğu ve sonraki çalışmalara katkısı olabileceği düşünülmektedir.

Leonurus türlerinin belirgin biyoaktivitelere sahip olduğu belirlenmiştir. Buna karşın *Leonurus* türlerinin farmakolojik aktivitesi hakkındaki veri miktarı, etkilerini tam olarak belirlemek ve bitkinin geleneksel kullanımını haklı çıkarmak için hala yetersizdir. Kontrollü klinik çalışmalarda hammaddenin insan vücudu üzerindeki etkisinin araştırılması özellikle önemlidir.

Sonuç olarak *Leonurus* türlerinin, ilaç, ekstre ve buna dayalı gıda takviyeleri olarak, yararlı olabileceği düşünülse de türlerin özgünlüğünü ve kalitesini değerlendirmek, yan etkileri ve etkinlikleri gibi farklı yönlele yönelik olmak üzere, bitkinin ve bileşenlerinin farmakodinamiklerini ve güvenliklerini incelemek için çok sayıda çalışmaya ihtiyaç duyulmaktadır.

Bu çalışmanın devamı olarak nitelendirilebilecek ileriki çalışmalarda türlerin bileşimlerinin daha detaylı çalışmalarla aydınlatılması planlanmaktadır.

KAYNAKÇA

- [1] Güner, A., Aslan, S. (2012). *Türkiye bitkileri listesi:(Damarlı bitkiler)*. Nezahat Gökyiğit Botanik Bahçesi Yayınları.
- [2] Zohary, M. (1973). *Geobotanical foundations of the Middle East*. Fischer.
- [3] Mill, R.R. (1982). *Leonurus* L. P.H. Davis (Ed.), *Flora of Turkey and the East Aegean Island*. içinde (s. 384-394). Edinburg: Edinburg Univ. Press:
- [4] Thompson, J.D. (2005). *Plant evolution in the Mediterranean*. Oxford University Press on Demand.
- [5] Ertug, F. (2017). Anatolian ethnobotanical heritage of the family Lamiaceae. *Nat. Vol. Essent. Oils.*, (4), 2-6.
- [6] Abdala, S., Martín-Herrera, D., Benjumea, D., Gutiérrez, S.D. (2012). Diuretic activity of some *Smilax canariensis* fractions. *J. Ethnopharmacol.*, 140 (2), 277-281.
- [7] Uritu, C.M., Mihai, C.T., Stanciu, G.-D., Dodi, G., Alexa-Stratulat, T., Luca, A., Leon-Constantin, M.-M., Stefanescu, R., Bild, V., Melnic, S. (2018). Medicinal plants of the family Lamiaceae in pain therapy: A review. *Pain Res. Manag.*, (1), 1-44.
- [8] Craig, W.J. (1999). Health-promoting properties of common herbs. *Am. J. Clin. Nutr.*, 70 (3), 491-499.
- [9] Perez Gutierrez, R.M., Baez, E.G. (2009). Cardioactive agents from plants. *Mini Rev. Med. Chem.*, 9 (7), 878-899.
- [10] Rastogi, S., Pandey, M.M., Rawat, A. (2016). Traditional herbs: a remedy for cardiovascular disorders. *Phytomedicine*, 23 (11), 1082-1089.
- [11] Roth, G.A., Johnson, C., Abajobir, A., Abd-Allah, F., Abera, S.F., Abyu, G., Ahmed, M., Aksut, B., Alam, T., Alam, K. (2017). Global, regional, and national burden of cardiovascular diseases for 10 causes, 1990 to 2015. *J. Am. Coll. Cardiol.*, 70 (1), 1-25.
- [12] Afsar, T., Trembley, J.H., Salomon, C.E., Razak, S., Khan, M.R., Ahmed, K. (2016). Growth inhibition and apoptosis in cancer cells induced by polyphenolic compounds of *Acacia hydaspica*: Involvement of multiple signal transduction pathways. *Sci. Rep.*, 6 (1), 1-12.
- [13] Hosseini, A., Ghorbani, A. (2015). Cancer therapy with phytochemicals: evidence from clinical studies. *Avicenna J. Phytomed.*, 5 (2), 84-90.

- [14] Elmore, S. (2007). Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol. Pathol.*, 35 (4), 495-516.
- [15] Sitarek, P., Skała, E., Toma, M., Wielanek, M., Szemraj, J., Skorski, T., Białas, A.J., Sakowicz, T., Kowalczyk, T., Radek, M. (2017). Transformed root extract of *Leonurus sibiricus* induces apoptosis through intrinsic and extrinsic pathways in various grades of human glioma cells. *Pathol. Oncol. Res.*, 23 (3), 679-687.
- [16] Dong, Y., Liao, J., Yao, K., Jiang, W., Wang, J. (2017). Application of traditional Chinese medicine in treatment of atrial fibrillation. *Evid-Based Compl. Alt.*, 17, 1-11.
- [17] Shikov, A.N., Pozharitskaya, O.N., Makarov, V.G., Wagner, H., Verpoorte, R., Heinrich, M. (2014). Medicinal plants of the Russian Pharmacopoeia; their history and applications. *J. Ethnopharmacol.*, 154 (3), 481-536.
- [18] Keller, K. (2010). Assessment report on *Leonurus cardiaca* L., herba. *KELLER, K. Committee on Herbal Medicinal Products (HMPC)*.
- [19] Greuter, W. (1988). International code of botanical nomenclature, as adopted by the Fourteenth International Botanical Congress, Tokyo, July-August 1994. *Regnum Veg*, 118, 1-328.
- [20] Drew, B.T., Liu, S., Bonifacino, J.M., Sytsma, K.J. (2017). Amphitropical disjunctions in New World Menthinae: three pliocene dispersals to South America following late Miocene dispersal to North America from the Old World. *Am. J. Bot.*, 104 (11), 1695-1707.
- [21] Güner, A., Ekim, T. (2014). *Resimli Türkiye Florası*. İstanbul: Ali Nihat Gökyiğit Vakfı, Flora Araştırmaları Derneği ve Türkiye İş Bankası Kültür Yayını.
- [22] Li, B., Olmstead, R.G. (2017). Two new subfamilies in Lamiaceae. *Phytotaxa*, 313 (2), 222-226.
- [23] Celep, F., Dirmenci, T. (2017). Systematic and Biogeographic overview of Lamiaceae in Turkey. *Nat. Vol. Essent. Oils.*, 4 (4), 14-27.
- [24] Cronquist, A., Takhtadzhian, A.L. (1981). *An integrated system of classification of flowering plants*. ABD: Columbia University Press.
- [25] Harley, R., Atkins, S., Budantsev, A., Cantino, P., Conn, B., Grayer, R., Harley, M., De Kok, R., Krestovskaja, T., Morales, R. (2004): The families and genera of vascular plants. Vol. VII. Flowering plants. Dicotyledons–Lamiales (except Acanthaceae including Avicenniaceae). Springer-Verlag: Heidelberg, Germany.

- [26] Erdtman, G. (1945). Pollen morphology and plant taxonomy IV. *Labiatae, Verbenaceae and Avicenniaceae*. *Svenk. Bot. Tidskr.*, 39, 279-285.
- [27] Zvezdina, E., Dayronas, J., Bochkareva, I., Zilfikarov, I., Babaeva, E.Y., Ferubko, E., Guseynova, Z., Serebryanaya, F., Kaibova, S., Ibragimov, T. (2019). Members Of The Family Lamiaceae Lindl. As Sources Of Medicinal Plant Raw Materials To Obtain Neurotropic Drugs. *Pharmacy & Pharmacology*, 8, 4-28.
- [28] Krestovskaja, T. (1989). Generis *Leonurus* L.(Lamiaceae) systema et conspectus, 2. *Novosti Sist. Vyssh. Rast.*, 26, 142-149.
- [29] Krestovskaja, T. (1992). *Systematics and phytogeography of Leonurus L. Advances in Labiate science*. Richmond: Royal Botanic Gardens, Kew, 139-148.
- [30] Pitschmann, A., Waschulin, C., Sykora, C., Purevsuren, S., Glasl, S. (2017). Microscopic and phytochemical comparison of the three *Leonurus* species *L. cardiaca*, *L. japonicus*, and *L. sibiricus*. *Planta Med.*, 83 (14/15), 1233-1241.
- [31] Scheen, A.-C., Bendiksby, M., Ryding, O., Mathiesen, C., Albert, V.A., Lindqvist, C. (2010). Molecular phylogenetics, character evolution, and suprageneric classification of Lamioideae (Lamiaceae) 1. *Ann. Missouri. Bot. Gard.*, 97 (2), 191-217.
- [32] Holub, J. (1993). *Leonurus intermedius*, species nova: with additional notes on some other *Leonurus* taxa. *Preslia*, 65 (2), 97-115.
- [33] Marciniuk, P., Gawrońska, B., Marciniuk, J., Joachimiak, A.J. (2014). Taxonomic individuality of *Leonurus cardiaca* and *Leonurus quinquelobatus* in view of morphological and molecular studies. *Plant Syst. Evol.*, 300 (2), 255-261.
- [34] Altundag, E., Ozturk, M. (2011). Ethnomedicinal studies on the plant resources of east Anatolia, Turkey. *Procedia Soc. Behav.*, 19, 756-777.
- [35] Motherwort. *European Pharmacopoeia* 7th ed. (2011). Council of Europe, 1190-191.
- [36] Mścisz, A., Gorecki, P. (1997). Motherwort (*Leonurus cardiaca* L.)–herbal drug with sedative and cardiac activity. *Herba Pol.*, 23 (2), 172-178.
- [37] Culpeper, N. (2018). *The complete herbal*. BoD–Books on Demand.
- [38] *Russian Pharmacopoeia* (1968). Gosudarstwiennaja Farmakopea SSSR (X). Medgiz, Moskwa, 347-348.
- [39] *British Herbal Pharmacopoeia Compendium (BHP)*. (1992). BHMA Megaron Press. Bournemouth.

- [40] Pharmacopoeia, C.o.N. (2010). *Pharmacopoeia of P.R. China*. Press of Chemical Industry, Beijing.
- [41] Mockute, D., Bernotiene, G., Judzientiene, A. (2006). Germacrene D chemotype of essential oils of *Leonurus cardiaca* L. growing wild in Vilnius district (Lithuania). *J. Essent. Oil Res.*, 18 (5), 566-568.
- [42] Morteza-Semnani, K., Saeedi, M., Akbarzadeh, M. (2008). The essential oil composition of *Leonurus cardiaca* L. *J. Essent. Oil Res.*, 20 (2), 107-109.
- [43] Wojtyniak, K., Szymański, M., Matławska, I. (2013). *Leonurus cardiaca* L. (motherwort): a review of its phytochemistry and pharmacology. *Phytother. Res.*, 27 (8), 1115-1120.
- [44] <https://www.illinoiswildflowers.info/weeds/plants/motherwort.htm> Motherwort "*Leonurus cardiaca*". (Erişim tarihi: 02.04.2021).
- [45] Tubives. (2004). Turkish Plants Data Service. <http://www.tubives.com/> (Erişim tarihi: 24.05.2021)
- [46] Zagurskaya, Y.V., Vasil'ev, V., Bogatyrev, A., Bayandina, I., Kukina, T. (2015). Flavonoids and hydroxycinnamic acids from *Leonurus quinquelobatus*. *Chem. Nat. Compd.*, 51 (1), 156-157.
- [47] Ardenghi, N.M. (2015). Lectotypification of *Leonurus quinquelobatus* (Lamiaceae). *Taxon*, 64, 160-162.
- [48] Hanelt, P., Buttner, R., Mansfeld, R. (2001). *Mansfeld's encyclopedia of agricultural and horticultural crops: except ornamentals*. Verlag Berlin Heidelberg: Springer.
- [49] Verloove, F. (2014). *Leonurus cardiaca* subsp. *villosus*, a long forgot ten and probably neglected xenophyte in Belgium. *Manual of the Alien Plants of Belgium*, <http://alienplantsbelgium.be/content/leonurus-cardiaca-subsp-villosus>, (Erişim tarihi: 24.04.2021).
- [50] Ardenghi, N.M., Montanari, S. *Leonurus quinquelobatus* Gilib., esotica nuova per l'Italia. *Quad. Studi Nat. Romagna*, 37, 35-45.
- [51] Maevsky, P. (2006): *Flora of the middle of european part of Russia*. Moscow.
- [52] Luo, Y., Luo, S., Zhou, B. (2002). Chromatographic identification of a compound similar to ferulic acid in the decoction of Herb Leonuri. *Zhong Yao Cai.*, 25 (10), 713-714.

- [53] Beik, A., Joukar, S., Najafipour, H. (2020). A review on plants and herbal components with antiarrhythmic activities and their interaction with current cardiac drugs. *J. Tradit. Complement. Med.*, 10 (3), 275-287.
- [54] Sermukhamedova, O.V., Sakipova, Z.B., Ternynko, I.I., Gemedzhieva, N.G. (2017). Representatives of motherwort genus (*Leonurus* spp.): Aspects of pharmacognostic features and relevance of new species application. *Acta Pol. Pharm.*, 74 (1), 31-40.
- [55] Chevallier, A. (1996). *The encyclopedia of medicinal plants*. London: Dorling Kindersley.
- [56] Maznev, N. (2004). *The encyclopedia of medicinal plants* (Rus.). Moscow: Martin Press.
- [57] Sheryakov, A. (2007): *The State Pharmacopoeia of the Republic of Belarus*. Minsk: Minsk State Vocational College of Printing.
- [58] Zhang, R.-H., Liu, Z.-K., Yang, D.-S., Zhang, X.-J., Sun, H.-D., Xiao, W.-L. (2018). Phytochemistry and pharmacology of the genus *Leonurus*: The herb to benefit the mothers and more. *Phytochemistry*, 147, 167-183.
- [59] Weiss, R.F., Meuss, A. (2001). *Weiss's herbal medicine*. Thieme.
- [60] Bartram, T. (2013). *Bartram's encyclopedia of herbal medicine*. Hachette UK.
- [61] Rauwald, H.W., Savtschenko, A., Merten, A., Rusch, C., Appel, K., Kuchta, K. (2015). GABAA receptor binding assays of standardized *Leonurus cardiaca* and *Leonurus japonicus* extracts as well as their isolated constituents. *Planta Med.*, 81 (12/13), 1103-1110.
- [62] Kuchta, K., Ortwein, J., Çalış, İ., Volk, R.B., Rauwald, H.W. (2016). Identification of cardioactive *Leonurus* and *Leonotis* drugs by quantitative HPLC determination and HPTLC detection of phenolic marker constituents. *Nat. Prod. Commun.*, 11 (8), 1129-1133.
- [63] Soorni, A., Nazeri, V., Fatahi, R., Khadivi-Khub, A. (2014). Multivariate analysis of motherwort germplasm in Iran using morphological variables and essential oil content. *Plant Syst. Evol.*, 300 (5), 925-935.
- [64] Ali, M.S., Ibrahim, S.A., Jalil, S., Choudhary, M.I. (2007). Ursolic acid: a potent inhibitor of superoxides produced in the cellular system. *Phytother. Res.*, 21 (6), 558-561.

- [65] Popescu, M.L., Dinu, M., Toth, O. (2009). Contributions to the pharmacognostical and phytobiological study on *Leonurus cardiaca* L. (Lamiaceae). *Farm.*, 57 (4), 424.
- [66] Bernatoniene, J., Kopustinskiene, D.M., Jakstas, V., Majiene, D., Baniene, R., Kuršvietiene, L., Masteikova, R., Savickas, A., Toleikis, A., Trumbeckaite, S. (2014). The effect of *Leonurus cardiaca* herb extract and some of its flavonoids on mitochondrial oxidative phosphorylation in the heart. *Planta Med.*, 80 (07), 525-532.
- [67] Krishnaiah, D., Sarbatly, R., Nithyanandam, R. (2011). A review of the antioxidant potential of medicinal plant species. *Food Bioprod. Process.*, 89 (3), 217-233.
- [68] Fierascu, R.C., Fierascu, I., Ortan, A., Fierascu, I.C., Anuta, V., Velescu, B.S., Pituru, S.M., Dinu-Pirvu, C.E. (2019). *Leonurus cardiaca* L. as a Source of Bioactive Compounds: An Update of the European Medicines Agency Assessment Report (2010). *Biomed. Res. Int.*, 2, 1-13.
- [69] Wichtl, M. (2002). Teedrogen und phytopharmaka. *Verlag*, 4, 84-87.
- [70] Blumenthal, M. (1999). The complete German commission E monographs. *Therapeutic guide to herbal medicines*, American Botanical Council, Austin, Texas.
- [71] Weiss, R.F., Fintelmann, V. (2000): *Herbal Medicine: Second edition, revised and expanded*. Thieme Medical Publishers.
- [72] Bradley, P. (1992). *British herbal compendium. Vol. 1. A handbook of scientific information on widely used plant drugs*. British Herbal Medicine Association.
- [73] Shang, X., Pan, H., Wang, X., He, H., Li, M. (2014). *Leonurus japonicus* Houtt.: Ethnopharmacology, Phytochemistry and Pharmacology of an Important Traditional Chinese Medicine. *J. Ethnopharmacol.*, 152 (1), 14-32.
- [74] Deng, Z. (2010). *Leonurus japonicus*: women's good friend forever. *H. Life*, 4, 20-23.
- [75] Sitarek, P., Rijo, P., Garcia, C., Skala, E., Kalemba, D., Białas, A.J., Szemraj, J., Pytel, D., Toma, M., Wysokińska, H. (2017). Antibacterial, anti-inflammatory, antioxidant, and antiproliferative properties of essential oils from hairy and normal roots of *Leonurus sibiricus* L. and their chemical composition. *Oxid. Med. Cell. Longev.*, 2017, 1-12.

- [76] Oliveira, A.S., Cercato, L.M., de Santana Souza, M.T., de Oliveira Melo, A.J., dos Santos Lima, B., Duarte, M.C., de Souza Araujo, A.A., e Silva, A.M.d.O., Camargo, E.A. (2017). The ethanol extract of *Leonurus sibiricus* L. induces antioxidant, antinociceptive and topical anti-inflammatory effects. *J. Ethnopharmacol.*, 206, 144-151.
- [77] Загурская, Ю. (2014). Систематика, морфология и лекарственные свойства растения *Leonurus quinquelobatus* Gilib. *Успехи современного естествознания*, (in Russian) (12-2), 56-59.
- [78] Khalmatov, K. (1964). *Dikorastushchiye Lekarstvenniye Rasteniya Uzbekistana (Wild-growing medicinal plants of Uzbekistan)*. Meditsina, Tashkent (in Russian).
- [79] Eisenman, S.W., Zaurov, D.E., Struwe, L. (2012). *Medicinal plants of central Asia: Uzbekistan and Kyrgyzstan*. Springer Science & Business Media.
- [80] Mamadalieva, N., Mamedov, N., Craker, L., Tiezzi, A. (2012): Ethnobotanical uses and cytotoxic activities of native plants from the Lamiaceae family in Uzbekistan. *Acta Hort.*, 1030, 61-70.
- [81] Mamadalieva, N.Z., Bobakulov, K.M., Vinciguerra, V., Tiezzi, A., Abdullaev, N.D., Nahar, L., Azimova, S.S., Sarker, S.D. (2016). GC-MS and q-NMR based chemotaxonomic evaluation of two *Leonurus* species. *Phytochem. Anal.*, 27 (5), 284-289.
- [82] Wang, K.-H., Lin, R.-D., Hsu, F.-L., Huang, Y.-H., Chang, H.-C., Huang, C.-Y., Lee, M.-H. (2006). Cosmetic applications of selected traditional Chinese herbal medicines. *J. Ethnopharmacol.*, 106 (3), 353-359.
- [83] Zhogova, A., Perova, I., Samylina, I., Eller, K., Ramenskaya, G. (2014). Identification and quantitative determination of the main biologically active substances in motherwort herb by HPLC–mass spectrometry. *Pharm. Chem. J.*, 48 (7), 461-466.
- [84] Kirillov, V., Stikhareva, T., Serafimovich, M., Kabanova, S., Chebotko, N., Mukanov, B. (2018). The essential oil composition of *Leonurus glaucescens* Bunge growing wild in Northern Kazakhstan and the chemical relationship of its essential oil with other *Leonurus* species. *J. Essent. Oil-Bear. Plants*, 21 (1), 52-64.
- [85] Hedge, I. (1990). *Labiatae in Flora of Pakistan*. University of Karachi, Karachi, 192, 310-316.

- [86] Christy, C.M., Damrel, D.Z., Henry, A.M., Nare, A.E.T., Puente-Martinez, R., Walters, G.M. (2003). Lamiaceae Mint Family Part One. *Agastache* Gronov., *Hyptis* Jacq., *Lamium* L., *Leonurus* L., *Marrubium* L., *Monarda* L., *Monardella* Benth., *Nepeta* L., *Salazaria* Torr., *Stachys* L., *Teucrium* L., and *Trichostema* L. *J. Arizona. Nevada. Acad. Sci.*, 35 (2), 151-169.
- [87] Ryding, O. (1998). Phylogeny of the *Leucas* group (Lamiaceae). *Syst. Bot.*, 23(2), 235-247.
- [88] Barber, J.C., Francisco-Ortega, J., Santos-Guerra, A., Turner, K.G., Jansen, R.K. (2002). Origin of Macaronesian *Sideritis* L.(Lamioideae: Lamiaceae) inferred from nuclear and chloroplast sequence datasets. *Mol. Phylogenetics. Evol.*, 23 (3), 293-306.
- [89] Scheen, A.C., Lindqvist, C., Fossdal, C.G., Albert, V.A. (2008). Molecular phylogenetics of tribe Synandreae, a North American lineage of lamioid mints (Lamiaceae). *Cladistics*, 24 (3), 299-314.
- [90] Scheen, A.C., Albert, V.A. (2009). Molecular phylogenetics of the *Leucas* group (Lamioideae; Lamiaceae). *Syst. Bot.*, 34 (1), 173-181.
- [91] Yang, Z.Y., Pan, S.L., Huo, K.K., Wu, B.Y., Chao, Z. (2011). Molecular Analysis of *Leonurus* Species in China Based on ITS and mat K Sequences. *Am. J. Chinese Med.*, 39 (02), 411-422.
- [92] Hohmann, B., Reher, G., Stahl-Biskup, E. (2001). *Mikroskopische Drogenmonographien der deutschsprachigen Arzneibücher: mit 7 Tabellen.* Wiss. Verlag-Ges.
- [93] Kaminski, R., Speck, T., Speck, O. (2017). Adaptive spatiotemporal changes in morphology, anatomy, and mechanics during the ontogeny of subshrubs with square-shaped stems. *Am. J. Bot.*, 104 (8), 1157-1167.
- [94] Epling, C.C. (1925). Studies on South American Labiatae. I. Synopses of the Genera *Teucrium*, *Rosmarinus*, *Marrubium*, *Prunella*, *Lamium*, *Leonurus*, and *Leonotis*. *Ann. Missouri. Bot. Gard.*, 12 (1), 107-132.
- [95] do Rocio Duarte, M., Lopes, J.F. (2005). Morfoanatomia foliar e caulinar de *Leonurus sibiricus* L., Lamiaceae. *Acta Farm. Bonaer.*, 24 (1), 68-74.
- [96] Ganguly, J.K. (1946). Glandular trichomes on the ovules of *Leonurus sibiricus* linn. *Curr. Sci.*, 15 (5), 137-138.

- [97] Badamtsetseg, B. (2016). Fruit morphology of some species of the Lamiaceae in the flora of Mongolia. *Turczaninowia*, 19 (1), 34-41.
- [98] Erdtman, G. (1969). *Handbook of palynology: morphology, taxonomy, ecology. An introduction to the study of pollen grains and spores.* Hafner Publish.
- [99] Xiujia, C.Z.Z. (2000). Pollen Morphology of 9 Species of *Leonurus*. *Plant Sci. J.*, 18, 181-183.
- [100] Matkowski, A., Tasarz, P., Szypuła, E. (2008). Antioxidant activity of herb extracts from five medicinal plants from Lamiaceae, subfamily Lamioideae. *J. Med. Plants Res.*, 2 (11), 321-330.
- [101] Rice-Evans, C.A., Miller, N.J., Paganga, G. (1996). Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radic. Biol.*, 20 (7), 933-956.
- [102] Matkowski, A., Piotrowska, M. (2006). Antioxidant and free radical scavenging activities of some medicinal plants from the Lamiaceae. *Fitoterapia*, 77 (5), 346-353.
- [103] Masteiková, R., Muselík, J., Bernatoniene, J., Majiene, D., Savickas, A., Malinauskas, F., Bernatoniene, R., Peciura, R., Chalupová, Z., Dvorácková, K. (2008). Antioxidant activity of tinctures prepared from hawthorn fruits and motherwort herb. *Ceska Slov Farm [ZDB] Ces. a Slov. Far.*, 57 (1), 35-38.
- [104] Bernatoniene, J., Kucinskaite, A., Masteikova, R., Kalveniene, Z., Kasparaviciene, G., Savickas, A. (2009). The comparison of anti-oxidative kinetics *in vitro* of the fluid extract from maidenhair tree, motherwort and hawthorn. *Acta Pol. Pharm.*, 66 (4), 415-421.
- [105] Jafari, S., Salaritabar, A., Moradi, A., Khanavi, M., Samadi, M. (2010). Antioxidant activity and total phenolic content of extracts and fractions of cultivated *Leonurus cardiaca* L. *Planta Med.*, 76 (12), 376-381.
- [106] Sadowska, B., Micota, B., Różalski, M., Redzyna, M., Różalski, M. (2017). The immunomodulatory potential of *Leonurus cardiaca* extract in relation to endothelial cells and platelets. *Innate Immun.*, 23 (3), 285-295.
- [107] Ebrahimzadeh, M., Nabavi, S., Nabavi, S., Eslami, B., Asgarirad, H. (2010). *In vitro* antioxidant and free radical scavenging activity of *Leonurus cardiaca* subsp. *persicus*, *Grammosciadium platycarpum* and *Onosma demawendicum*. *Afr. J. Biotechnol.*, 9 (51), 8865-8871.

- [108] Ebrahimzadeh, M., Nabavi, S., Nabavi, S., Pourmorad, F. (2010). Nitric oxide radical scavenging potential of some Elburz medicinal plants. *Afr. J. Biotechnol.*, 9 (32), 5212-5217.
- [109] Armatu, A., Colceru-Mihul, S., Bubueanu, C., Draghici, E., Pirvu, L. (2010). Evaluation of antioxidant and free scavenging potential of some Lamiaceae species growing in Romania. *Rom. Biotechnol. Lett.*, 15 (3), 5274-5280.
- [110] Yi, W., Wetzstein, H.Y. (2011). Effects of drying and extraction conditions on the biochemical activity of selected herbs. *Hort. Science.*, 46 (1), 70-73.
- [111] Tahmouzi, S., Ghodsi, M. (2014). Optimum extraction of polysaccharides from motherwort leaf and its antioxidant and antimicrobial activities. *Carbohydr. Polym.*, 112, 396-403.
- [112] Wong, F.-C., Yong, A.-L., Ting, E.P.-S., Khoo, S.-C., Ong, H.-C., Chai, T.-T. (2014). Antioxidant, metal chelating, anti-glucosidase activities and phytochemical analysis of selected tropical medicinal plants. *Iran. J. Pharm. Res.*, 13 (4), 1409-1415.
- [113] Angeloni, S., Spinozzi, E., Maggi, F., Sagratini, G., Caprioli, G., Borsetta, G., Ak, G., Sinan, K.I., Zengin, G., Arpini, S. (2021). Phytochemical Profile and Biological Activities of Crude and Purified *Leonurus cardiaca* Extracts. *Plants*, 10 (2), 195-205.
- [114] Ziyatdinova, G., Snegureva, Y., Budnikov, H. (2017). Novel approach for the voltammetric evaluation of antioxidant activity using DPPH-modified electrode. *Electrochim. Acta*, 247, 97-106.
- [115] Ziyatdinova, G., Kozlova, E., Morozova, E., Budnikov, H. (2018). Chronocoulometric method for the evaluation of antioxidant capacity of medicinal plant tinctures. *Anal. Methods*, 10 (41), 4995-5003.
- [116] Mao, L.-J., Xie, X.-Y., Gao, Y., Lai, P.-X., Ma, Q.-L. (2019). Chemical composition, antibacterial and antioxidant activities of essential oil from *Leonurus pseudomacranthus* Kitag. *Rec. Nat. Prod.*, 13, 91-95.
- [117] Jafari, S., Moradi, A., Salaritabar, A., Hadjiakhoondi, A., Khanavi, M. (2010). *Leonurus cardiaca* L. in compare with antioxidant activity. *Res. J. Biol. Sci.*, 5 (7), 484-487.

- [118] Sun, J., Huang, S.H., Zhu, Y.C., Whiteman, M., Wang, M.J., Tan, B.K.-H., Zhu, Y.Z. (2005). Anti-oxidative stress effects of *Herba leonuri* on ischemic rat hearts. *Life Sci.*, 76 (26), 3043-3056.
- [119] Shikov, A.N., Pozharitskaya, O.N., Makarov, V.G., Demchenko, D.V., Shikh, E.V. (2011). Effect of *Leonurus cardiaca* oil extract in patients with arterial hypertension accompanied by anxiety and sleep disorders. *Phytother. Res.*, 25 (4), 540-543.
- [120] Mercer, L.D., Kelly, B.L., Horne, M.K., Beart, P.M. (2005). Dietary polyphenols protect dopamine neurons from oxidative insults and apoptosis: investigations in primary rat mesencephalic cultures. *Biochem. Pharmacol.*, 69 (2), 339-345.
- [121] Trumbeckaite, S., Bernatoniene, J., Majiene, D., Jakštas, V., Savickas, A., Toleikis, A. (2006). The effect of flavonoids on rat heart mitochondrial function. *Biomed. Pharmacother.*, 60 (5), 245-248.
- [122] Ritter, M., Melichar, K., Strahler, S., Kuchta, K., Schulte, J., Sartiani, L., Cerbai, E., Mugelli, A., Mohr, F.-W., Rauwald, H.W. (2010). Cardiac and electrophysiological effects of primary and refined extracts from *Leonurus cardiaca* L.(Ph. Eur.). *Planta Med.*, 76 (06), 572-582.
- [123] Flemmig, J., Noetzel, I., Arnhold, J., Rauwald, H.-W. (2015). *Leonurus cardiaca* L. herb extracts and their constituents promote lactoperoxidase activity. *J. Funct. Foods*, 17, 328-339.
- [124] Micota, B., Sadowska, B., Podsędek, A., Redzyna, M., Różalska, B. (2014). *Leonurus cardiaca* L. herb-a derived extract and an ursolic acid as the factors affecting the adhesion capacity of *Staphylococcus aureus* in the context of infective endocarditis. *Acta Biochim. Pol.*, 61(2), 385-388.
- [125] Todorov, D., Hinkov, A., Shishkova, K., Shishkov, S. (2014). Antiviral potential of Bulgarian medicinal plants. *Phytochem. Rev.*, 13 (2), 525-538.
- [126] Song, X., Wang, T., Zhang, Z., Jiang, H., Wang, W., Cao, Y., Zhang, N. (2015). Leonurine exerts anti-inflammatory effect by regulating inflammatory signaling pathways and cytokines in LPS-induced mouse mastitis. *Inflammation*, 38 (1), 79-88.
- [127] Liu, Y., Duan, C., Chen, H., Wang, C., Liu, X., Qiu, M., Tang, H., Zhang, F., Zhou, X., Yang, J. (2018). Inhibition of COX-2/mPGES-1 and 5-LOX in

- macrophages by leonurine ameliorates monosodium urate crystal-induced inflammation. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 351, 1-11.
- [128] Samoilova, Z., Muzyka, N., Lepekhina, E., Oktyabrsky, O., Smirnova, G. (2014). Medicinal plant extracts can variously modify biofilm formation in *Escherichia coli*. *A. Van. Leeuw. J. Microb.*, 105 (4), 709-722.
- [129] Denham, A., Green, J., Hawkey, S. (2011). What's in the bottle? Prescriptions formulated by medical herbalists in a clinical trial of treatment during the menopause. *J. Herb. Med.*, 1 (3-4), 95-101.
- [130] Romm, A. (2017). *Botanical medicine for Women's health E-book*. Elsevier Health Sciences.
- [131] Romm, A., Clare, B., Stansbury, J., Ryan, L., Trickey, R., Lee, L., Heywood, A. (2010). Menstrual wellness and menstrual problems. A. Romm, (Ed.), *Botanical Medicine for Women's Health* içinde (s. 97-185). Churchill Livingstone.
- [132] Lans, C., Taylor-Swanson, L., Westfall, R. (2018). Herbal fertility treatments used in North America from colonial times to 1900, and their potential for improving the success rate of assisted reproductive technology. *Reprod. Biomed. Soc.*, 5, 60-81.
- [133] Ji, S., Fattahi, A., Raffel, N., Hoffmann, I., Beckmann, M.W., Dittrich, R., Schrauder, M. (2017). Antioxidant effect of aqueous extract of four plants with therapeutic potential on gynecological diseases; Semen persicae, *Leonurus cardiaca*, *Hedyotis diffusa*, and *Curcuma zedoaria*. *Eur. J. Med. Res.*, 22 (1), 1-8.
- [134] Romm, A. (2010). The Postpartum. A. Romm, (Ed.), *Botanical Medicine for Women's Health* içinde (s. 416-432). Churchill Livingstone.
- [135] Rauwald, H., Kuchta, K., Savtschenko, A., Brückner, A., Rusch, C., Appel, K. (2013). GABAA receptor binding assays of standardized *Leonurus cardiaca* and *L. japonicus* extracts as well as their isolated constituents. *Planta Med.*, 79 (13), 1103-1110.
- [136] Xu, D., Chen, M., Ren, X., Ren, X., Wu, Y. (2014). Leonurine ameliorates LPS-induced acute kidney injury via suppressing ROS-mediated NF- κ B signaling pathway. *Fitoterapia*, 97, 148-155.
- [137] Cheng, H., Bo, Y., Shen, W., Tan, J., Jia, Z., Xu, C., Li, F. (2015). Leonurine ameliorates kidney fibrosis via suppressing TGF- β and NF- κ B signaling pathway in UUO mice. *Int. Immunopharmacol.*, 25 (2), 406-415.

- [138] Liu, X., Pan, L., Chen, P., Zhu, Y. (2010). Leonurine improves ischemia-induced myocardial injury through antioxidative activity. *Phytomedicine*, 17 (10), 753-759.
- [139] Sattar, A.A., Bankova, V., Kujumgiev, A., Galabov, A., Ignatova, A., Todorova, C., Popov, S. (1995). Chemical composition and biological activity of leaf exudates from some Lamiaceae plants. *Pharmazie*, 50 (1), 62-65.
- [140] Tasdemir, D., Brun, R., Perozzo, R., Dönmez, A. (2005). Evaluation of antiprotozoal and plasmodial enoyl-ACP reductase inhibition potential of turkish medicinal plants. *Phytother. Res.*, 19 (2), 162-166.
- [141] Micota, B., Sadowska, B., Podsędek, A., Paszkiewicz, M., Sosnowska, D., Różalska, B. (2016). Is it true that plant-derived polyphenols are always beneficial for the human? *In vitro* study on *Leonurus cardiaca* extract properties in the context of the pathogenesis of *Staphylococcus aureus* infections. *J. Med. Microbiol.*, 65 (10), 1171-1181.
- [142] Fokina, G., Frolova, T., Roïkhel, V., Pogodina, V. (1991). Experimental phytotherapy of tick-borne encephalitis. *Vopr. Virusol.*, 36 (1), 18-21.
- [143] Tasdemir, D., Scapozza, L., Zerbe, O., Linden, A., Çalis, I., Sticher, O. (1999). Iridoid glycosides of *Leonurus persicus*. *J. Nat. Prod.*, 62 (6), 811-816.
- [144] Xin, H., Liu, X.H., Zhu, Y.Z. (2009). Herba leonurine attenuates doxorubicin-induced apoptosis in H9c2 cardiac muscle cells. *Eur.*, 612, 75-79.
- [145] Bagchi, D., Sen, C.K., Ray, S.D., Das, D.K., Bagchi, M., Preuss, H.G., Vinson, J.A. (2003). Molecular mechanisms of cardioprotection by a novel grape seed proanthocyanidin extract. *Mutat. Res.-Fund. Mol. M.*, 523, 87-97.
- [146] Sitarek, P., Synowiec, E., Kowalczyk, T., Śliwiński, T., Skała, E. (2018). An *in vitro* estimation of the cytotoxicity and genotoxicity of root extract from *Leonurus sibiricus* L. overexpressing AtPAP1 against different cancer cell lines. *Molecules*, 23 (8), 2049, 1-14.
- [147] Mao, F., Zhang, L., Cai, M.-H., Guo, H., Yuan, H.-H. (2015). Leonurine hydrochloride induces apoptosis of H292 lung cancer cell by a mitochondria-dependent pathway. *Pharm. Biol.*, 53 (11), 1684-1690.
- [148] Tao, J., Zhang, P., Liu, G., Yan, H., Bu, X., Ma, Z., Wang, N., Wang, G., Jia, W. (2009). Cytotoxicity of Chinese motherwort (YiMuCao) aqueous ethanol extract

- is non-apoptotic and estrogen receptor independent on human breast cancer cells. *J. Ethnopharmacol.*, 122 (2), 234-239.
- [149] Kim, H., Lee, J. (2018). Antioxidant and cell growth inhibitory effects by *Leonurus sibiricus* L. extract in human breast cancer MCF-7 Cells. *Korean. Soc. Community. Living. Sci.*, 4 (29), 485-493.
- [150] Chinwala, M.G., Gao, M., Dai, J., Shao, J. (2003). *In vitro* anticancer activities of *Leonurus heterophyllus* sweet (Chinese motherwort herb). *J. Altern. Complement. Med.*, 9 (4), 511-518.
- [151] Sitarek, P., Kowalczyk, T., Picot, L., Michalska-Hejduk, D., Bijak, M., Białas, A.J., Wielanek, M., Śliwiński, T., Skała, E. (2018). Growth of *Leonurus sibiricus* L. roots with over-expression of AtPAP1 transcriptional factor in closed bioreactor, production of bioactive phenolic compounds and evaluation of their biological activity. *Ind. Crops. Prod.*, 122, 732-739.
- [152] Sayed, M.A., Alam, M.A., Islam, M.S., Ali, M.T., Ullah, M.E., Shibly, A.Z., Ali, M.A., Hasan-Olive, M.M. (2016). *Leonurus sibiricus* L.(honeyweed): A review of its phytochemistry and pharmacology. *Asian. Pac. J. Trop. Biomed.*, 6 (12), 1076-1080.
- [153] Weinges, K., Kloss, P., Henkels, W.D. (1973). Naturstoffe aus Arzneipflanzen, XVIII) Isolierung und Konstitutionsaufklärung eines neuen C15-Iridoidglucosids aus *Leonurus cardiaca* L. *Liebigs. Ann. Chem.*, 1973 (4), 566-572.
- [154] Wichtl, M. (2004). *Herbal drugs and phytopharmaceuticals: a handbook for practice on a scientific basis*. Medpharm GmbH Scientific Publishers.
- [155] Brieskorn, C.H., Hofmann, R. (1979). Labiatenbitterstoffe: ein clerodanderivat aus *Leonurus cardiaca* l. *Tetrahedron. Lett.*, 20 (27), 2511-2512.
- [156] Malakov, P., Papanov, G., Jakupovic, J., Grenz, M., Bohlmann, F. (1985). The structure of leocardin, two epimers of a diterpenoid from *Leonurus cardiaca*. *Phytochemistry*, 24 (10), 2341-2343.
- [157] Agnihotri, V.K., Elsohly, H.N., Smillie, T.J., Khan, I.A., Walker, L.A. (2008). New labdane diterpenes from *Leonurus cardiaca*. *Planta Med.*, 74 (10), 1288-1290.
- [158] Knöss, W., Zapp, J. (1998). Accumulation of furanic labdane diterpenes in *Marrubium vulgare* and *Leonurus cardiaca*. *Planta Med.*, 64 (04), 357-361.

- [159] Papanov, G.Y., Malakov, P.Y., Rodriguez, B., María, C. (1998). A prefuranic labdane diterpene from *Leonurus cardiaca*. *Phytochemistry*, 47 (6), 1149-1151.
- [160] Janicsák, G., Veres, K., Kakasy, A.Z., Máthé, I. (2006). Study of the oleanolic and ursolic acid contents of some species of the Lamiaceae. *Biochem. Syst. Ecol.*, 34 (5), 392-396.
- [161] Romanowski, H. (1960). Isolation and analysis of alkaloids from (*Leonurus cardiaca* L.) by chromatographic meyhod. *Acta. Pol. Pharm.*, 17 (1), 13-22.
- [162] Gulubov, A., Chervenкова, V. (1970). Structure of alkaloids from *Leonurus cardiaca*. *Materialia Fizika Khimicheskaya Biologica*, 8 (1), 129-132.
- [163] Reuter, G., Diehl, H. (1970). Medicinal plants of species *Leonurus* and their active substances. *Pharmazie*, 25 (10), 586-589.
- [164] Kong, Y., Yeung, H., Cheung, Y., Phil, M., Hwang, J., Chan, Y., Law, Y., Ng, K., Yeung, C. (1976). Isolation of the uterotonic principle from *Leonurus artemisia*, the Chinese motherwort. *Am. J. Chinese. Med.*, 4 (04), 373-382.
- [165] Li, X., Wang, B., Li, Y., Wang, L., Zhao, X., Zhou, X., Guo, Y., Jiang, G., Yao, C. (2013). The Th1/Th2/Th17/Treg paradigm induced by stachydrine hydrochloride reduces uterine bleeding in RU486-induced abortion mice. *J. Ethnopharmacol.*, 145 (1), 241-253.
- [166] Hua Liu, X., Long Pan, L., Hai Gong, Q., Zhun Zhu, Y. (2010). Antiapoptotic effect of novel compound from Herba leonuri-leonurine (SCM-198): a mechanism through inhibition of mitochondria dysfunction in H9c2 cells. *Curr. Pharm. Biotechnol.*, 11 (8), 895-905.
- [167] Khan, S., Shehzad, O., Jin, H.-G., Woo, E.-R., Kang, S.S., Baek, S.W., Kim, J., Kim, Y.S. (2012). Anti-inflammatory mechanism of 15, 16-epoxy-3 α -hydroxylabda-8, 13 (16), 14-trien-7-one via inhibition of LPS-induced multicellular signaling pathways. *J. Nat. Prod.*, 75 (1), 67-71.
- [168] Hung, T.M., Luan, T.C., Vinh, B.T., Cuong, T.D., Min, B.S. (2011). Labdane-type diterpenoids from *Leonurus heterophyllus* and their cholinesterase inhibitory activity. *Phytother. Res.*, 25 (4), 611-614.
- [169] Kuchta, K., Volk, R., Rauwald, H. (2013). Stachydrine in *Leonurus cardiaca*, *Leonurus japonicus*, *Leonotis leonurus*: detection and quantification by instrumental HPTLC and ¹H-qNMR analyses. *Pharmazie*, 68 (7), 534-540.

- [170] Pitschmann, A., Zehl, M., Heiss, E., Purevsuren, S., Urban, E., Dirsch, V.M., Glasl, S. (2016). Quantitation of phenylpropanoids and iridoids in insulin-sensitising extracts of *Leonurus sibiricus* L.(Lamiaceae). *Phytochem. Anal.*, 27 (1), 23-31.
- [171] Schultz, O., Alhyane, M. (1973). Components of *Leonurus cardiaca* L. *Sci. Pharm.*, 41, 149-155.
- [172] Kartnig, T., Gruber, A., Menzinger, S. (1985). Flavonoid-O-glycosides from the herbs of *Leonurus cardiaca*. *J. Nat. Prod.*, 48 (3), 494-494.
- [173] Miłkowska-Leyck, K., Filipek, B., Strzelecka, H. (2002). Pharmacological effects of lavandulifolioside from *Leonurus cardiaca*. *J. Ethnopharmacol.*, 80 (1), 85-90.
- [174] Tschesche, R., Diederich, A., Jha, H.C. (1980). Caffeic acid 4-rutinoside from *Leonurus cardiaca* [leaves and flowers]. *Phytochemistry*, 19 (12), 2783.
- [175] Koshovyi, O., Raal, A., Kireyev, I., Tryshchuk, N., Ilina, T., Romanenko, Y., Kovalenko, S.M., Bunyatyan, N. (2021). Phytochemical and Psychotropic Research of Motherwort (*Leonurus cardiaca* L.) Modified Dry Extracts. *Plants*, 10 (2), 230.
- [176] Blumenthal, M., Goldberg, A., Brinckmann, J. (2000). *Herbal medicine. Expanded commission E monographs*. Integrative Medicine Communications.
- [177] Sokolov, P. (1991). *Plant Recourses of USSR: Flowering Plants, Its Chemical Composition, Application. Families Hippuridaceae-Lobeliaceae*. Nauka: St. Petersburg, Russia.
- [178] Calis, I., Ersoz, T., Tasdemir, D., Ru"edi, P. (1992). Two phenylpropanoid glycosides from *Leonurus glaucescens*. *Phytochemistry*, 31 (1), 357-359.
- [179] Jimenez, C., Riguera, R. (1994). Phenylethanoid glycosides in plants: structure and biological activity. *Nat. Prod. Rep.*, 11 (6), 591-606.
- [180] Vvedensky, A. (1961). *Flora of Uzbekistan*. Vol. 5. Academy of Sciences of the Uzbek SSR, Tashkent (in Russian).
- [181] Adams, M., Schneider, S.-V., Kluge, M., Kessler, M., Hamburger, M. (2012). Epilepsy in the Renaissance: a survey of remedies from 16th and 17th century German herbals. *J. Ethnopharmacol.*, 143 (1), 1-13.
- [182] Rezaee-Asl, M., Sabour, M., Nikoui, V., Ostadhadi, S., Bakhtiarian, A. (2014). The study of analgesic effects of *Leonurus cardiaca* L. in mice by formalin, tail flick and hot plate tests. *Int. Sch. Res. Notices.*, 2014 (1), 1-5.

- [183] Brand, K., Zampirolo, J., Schlemper, V., Cechinel-Vilho, V., Knöss, W. (1999). Antinociceptive effect of furanic labdane diterpenes. *Arch. Pharm.*, 331 (Suppl 2), 6.
- [184] He, Y.-L., Shi, J.-Y., Peng, C., Hu, L.-J., Liu, J., Zhou, Q.-M., Guo, L., Xiong, L. (2018). Angiogenic effect of motherwort (*Leonurus japonicus*) alkaloids and toxicity of motherwort essential oil on zebrafish embryos. *Fitoterapia*, 128, 36-42.
- [185] Liu, W., Ma, S., Pan, W., Tan, W. (2016). Combination of motherwort injection and oxytocin for the prevention of postpartum hemorrhage after cesarean section. *J. Matern. Fetal. Neonatal. Med.*, 29 (15), 2489-2492.
- [186] Schmidt, S., Jakab, M., Jav, S., Streif, D., Pitschmann, A., Zehl, M., Purevsuren, S., Glasl, S., Ritter, M. (2013). Extracts from *Leonurus sibiricus* L. increase insulin secretion and proliferation of rat INS-1E insulinoma cells. *J. Ethnopharmacol.*, 150 (1), 85-94.
- [187] Kittl, M., Beyreis, M., Tumurkhuu, M., Fürst, J., Helm, K., Pitschmann, A., Gaisberger, M., Glasl, S., Ritter, M., Jakab, M. (2016). Quercetin stimulates insulin secretion and reduces the viability of rat INS-1 beta-cells. *Cell. Physiol. Biochem.*, 39 (1), 278-293.
- [188] Huang, H., Xin, H., Liu, X., Xu, Y., Wen, D., Zhang, Y., Zhu, Y.Z. (2012). Novel anti-diabetic effect of SCM-198 via inhibiting the hepatic NF-κB pathway in db/db mice. *Biosci. Rep.*, 32 (2), 185-195.
- [189] Rácz, G., Rácz-Kotilla, E. (1989). Sedative and antihypertensive activity of *Leonurus quinquelobatus*. *Planta. Med.*, 55 (01), 97-97.
- [190] Qi, J., Hong, Z.Y., Xin, H., Zhu, Y.Z. (2010). Neuroprotective effects of leonurine on ischemia/reperfusion-induced mitochondrial dysfunctions in rat cerebral cortex. *Biol. Pharm. Bull.*, 33 (12), 1958-1964.
- [191] Wong, C.X., Brown, A., Lau, D.H., Chugh, S.S., Albert, C.M., Kalman, J.M., Sanders, P. (2019). Epidemiology of sudden cardiac death: global and regional perspectives. *Heart. Lung. Circ.*, 28 (1), 6-14.
- [192] Pappano, A., Wier, W. (2013). Excitation: The cardiac action potential, *Cardiovascular Physiology içinde* (s. 11-30). Elsevier.
- [193] Tse, G. (2016). Mechanisms of cardiac arrhythmias. *J. Arrhythm.*, 32 (2), 75-81.

- [194] Savtschenko, A., Dhein, S., Rauwald, H. (2013). The antiarrhythmic effects of lavandulifolioside and ferulic acid from *Leonurus cardiaca* extracts on cardiac electrophysiology. *Z. Phytother.*, 34, 25.
- [195] Association, B.H.M. (1983). *British Herbal Pharmacopoeia*. British Herbal Medicine Association.
- [196] Zhu, Y., Huang, S., Tan, B., Sun, J., Whiteman, M., Zhu, Y.-C. (2004). Antioxidants in Chinese herbal medicines: a biochemical perspective. *Nat. Prod. Rep.*, 21 (4), 478-489.
- [197] Rossyjskij, D.M (1949). New cardiac drugs–preparations from the Motherwort. *Klin. Med.*, 27, 83.
- [198] Wartofsky, L., Van Nostrand, D. (2016). *Thyroid cancer: a comprehensive guide to clinical management*. Springer.
- [199] Rafieian-Kopaei, M. (2018). Thyroid diseases: Pathophysiology and new hopes in treatment with medicinal plants and natural antioxidants. *Int. J. Green Pharm.*, 12 (03), 473-482.
- [200] Zaprometov, M. (1993). *Phenolic Compounds: Occurrence, Metabolism, and Functions in Plants*. Nauka, Moscow.
- [201] Poliakov, N. (1962). Research on the biological activity of valerian and *Leonurus* tinctures in rabbits. *Farmakol. Toksikol.*, 25, 423-427.
- [202] Widy-Tyszkiewicz, E., Schminda, R. (1997). A randomized double blind study of sedative effects of phytotherapeutic containing valerian, hops, balm and motherwort versus placebo. *Herba Pol.*, 43 (2), 154-159.
- [203] Ovanesov, K. (2005). The effect of tofisopam and tinctura leonuri on the color-discrimination function in young humans. *Eksp. Klin. Farmakol.*, 68 (3), 56-59.
- [204] Ovanesov, K., Ovanesova, I., Arushanian, E. (2006). Effects of melatonin and motherwort tincture on the emotional state and visual functions in anxious subjects. *Eksp. Klin. Farmakol.*, 69 (6), 17-19.
- [205] Mazooji, A., Salimpour, F., Danaei, M., Darzikolaei, S.A., Shirmohammadi, K. (2012). The quantitative comparison of essential oil composition of an Iranian endemic plant [*Leonurus cardiaca* L. subsp. *persicus* (Boiss.) Rech. F.] vs. previous studied population. *Ann. Biol. Res.*, 3 (2), 1117-1124.

- [206] Xiong, L., Peng, C., Zhou, Q.-M., Wan, F., Xie, X.-F., Guo, L., Li, X.-H., He, C.-J., Dai, O. (2013). Chemical composition and antibacterial activity of essential oils from different parts of *Leonurus japonicus* Houtt. *Molecules*, 18 (1), 963-973.
- [207] Agostini, F., Santos, A.C.A.d., Rossato, M., Pansera, M.R., Santos, P.L.d., Serafini, L.A., Molon, R., Moyna, P. (2009). Essential oil yield and composition of Lamiaceae species growing in Southern Brazil. *Braz. Arch. Biol.*, 52 (2), 473-478.
- [208] Scarpati, M. (1963). Isolamento dal *Verbascum sinuatum* di due nuovi glucosidi: il verbascoside e l'isoverbascoside. *Ann. Chem.*, 53, 356-367.
- [209] Korkina, L. (2007). Phenylpropanoids as naturally occurring antioxidants: from plant defense to human health. *Cell. Mol. Biol.*, 53 (1), 15-25.
- [210] Perron, N.R., Brumaghim, J.L. (2009). A review of the antioxidant mechanisms of polyphenol compounds related to iron binding. *Cell. Biochem. Biophys.*, 53 (2), 75-100.
- [211] Rudolf, E., Andelova, H., Cervinka, M. (2007). Polyphenolic compounds in Chemoprevention of colon cancer-Targets and signaling pathways. *Curr. Med. Chem. Anticancer Agents*, 7 (5), 559-575.
- [212] Singh, D.K., Lippman, S.M. (1998). Cancer chemoprevention. Part 2: Hormones, nonclassic antioxidant natural agents, NSAIDs, and other agents. *Oncology (Williston Park, NY)*, 12 (12), 1787-1800.
- [213] Li, Y., Yu, H., Jin, Y., Li, M., Qu, C. (2018). Verbascoside alleviates atopic dermatitis-like symptoms in mice via its potent anti-inflammatory effect. *Int. Arch. Allergy. Imm.*, 175 (4), 220-230.
- [214] de Moura Sperotto, N.D., Steffens, L., Veríssimo, R.M., Henn, J.G., Péres, V.F., Vianna, P., Chies, J.A.B., Roehe, A., Saffi, J., Moura, D.J. (2018). Wound healing and anti-inflammatory activities induced by a *Plantago australis* hydroethanolic extract standardized in verbascoside. *J. Ethnopharmacol.*, 225, 178-188.
- [215] Tognolini, M., Barocelli, E., Ballabeni, V., Bruni, R., Bianchi, A., Chiavarini, M., Impicciatore, M. (2006). Comparative screening of plant essential oils: phenylpropanoid moiety as basic core for antiplatelet activity. *Life Sci.*, 78 (13), 1419-1432.
- [216] Hsu, S. (2005). Green tea and the skin. *J. Am. Acad. Dermatol.*, 52 (6), 1049-1059.

- [217] Lee, J.Y., Woo, E.-R., Kang, K.W. (2005). Inhibition of lipopolysaccharide-inducible nitric oxide synthase expression by acteoside through blocking of AP-1 activation. *J. Ethnopharmacol.*, 97 (3), 561-566.
- [218] Vertuani, S., Beghelli, E., Scalambra, E., Malisardi, G., Copetti, S., Toso, R.D., Baldisserotto, A., Manfredini, S. (2011). Activity and stability studies of verbascoside, a novel antioxidant, in dermo-cosmetic and pharmaceutical topical formulations. *Molecules*, 16 (8), 7068-7080.
- [219] Kris-Etherton, P.M., Hecker, K.D., Bonanome, A., Coval, S.M., Binkoski, A.E., Hilpert, K.F., Griel, A.E., Etherton, T.D. (2002). Bioactive compounds in foods: their role in the prevention of cardiovascular disease and cancer. *Am. J. Med.*, 113 (9), 71-88.
- [220] Sgarbossa, A., Dal Bosco, M., Pressi, G., Cuzzocrea, S., Dal Toso, R., Menegazzi, M. (2012). Phenylpropanoid glycosides from plant cell cultures induce heme oxygenase 1 gene expression in a human keratinocyte cell line by affecting the balance of NRF2 and BACH1 transcription factors. *Chem. Biol. Interact.*, 199 (2), 87-95.
- [221] Caturla, N., Funes, L., Pérez-Fons, L., Micol, V. (2011). A randomized, double-blinded, placebo-controlled study of the effect of a combination of lemon verbena extract and fish oil omega-3 fatty acid on joint management. *J. Altern. Complement. Med.*, 17 (11), 1051-1063.
- [222] Funes, L., Carrera-Quintanar, L., Cerdán-Calero, M., Ferrer, M.D., Drobnic, F., Pons, A., Roche, E., Micol, V. (2011). Effect of lemon verbena supplementation on muscular damage markers, proinflammatory cytokines release and neutrophils' oxidative stress in chronic exercise. *Eur. J. Appl. Physiol.*, 111 (4), 695-705.
- [223] Alipieva, K., Korkina, L., Orhan, I.E., Georgiev, M.I. (2014). Verbascoside-A review of its occurrence,(bio) synthesis and pharmacological significance. *Biotechnol. Adv.*, 32 (6), 1065-1076.
- [224] Aleo, E., Ricci, R., Passi, S., Cataudella, S. (2005). A novel cyt CH~2O~2-chemiluminescence assay for measuring the reducing/antioxidant capacity of a wide range of hydrophilic and lipophilic antioxidants and biological samples. *Prog. Nutr.*, 7 (3), 154.
- [225] Burgos, C., Muñoz-Mingarro, D., Navarro, I., Martín-Cordero, C., Acero, N. (2020). Neuroprotective Potential of Verbascoside Isolated from *Acanthus mollis*

- L. Leaves through Its Enzymatic Inhibition and Free Radical Scavenging Ability. *Antioxidants*, 9 (12), 1-16.
- [226] Sheng, G.Q., Zhang, J.R., Pu, X.P., Ma, J., Li, C.L. (2002). Protective effect of verbascoside on 1-methyl-4-phenylpyridinium ion-induced neurotoxicity in PC12 cells. *Eur.*, 451 (2), 119-124.
- [227] Mazzon, E., Esposito, E., Di Paola, R., Riccardi, L., Caminiti, R., Dal Toso, R., Pressi, G., Cuzzocrea, S. (2009). Effects of verbascoside biotechnologically produced by *Syringa vulgaris* plant cell cultures in a rodent model of colitis. *Naunyn Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.*, 380 (1), 79-94.
- [228] Deng, M., Xiaodong, J., Fan, D., Pengfei, T., Zhang, J., Shen, Y. (2003). Verbascoside rescues the SHSY5Y neuronal cells from MPP⁺-induced apoptosis. *Chinese Pharmacol. Bull.*, 24, 1297-1302.
- [229] Esposito, E., Mazzon, E., Paterniti, I., Dal Toso, R., Pressi, G., Caminiti, R., Cuzzocrea, S. (2010). PPAR- α contributes to the anti-inflammatory activity of verbascoside in a model of inflammatory bowel disease in mice. *PPAR Res.*, 2010, 1-10.
- [230] Funari, C.S., Gullo, F.P., Napolitano, A., Carneiro, R.L., Mendes-Giannini, M.J.S., Fusco-Almeida, A.M., Piacente, S., Pizza, C., Silva, D.H.S. (2012). Chemical and antifungal investigations of six *Lippia* species (Verbenaceae) from Brazil. *Food. Chem.*, 135 (3), 2086-2094.
- [231] Azimi, H., Fallah-Tafti, M., Khakshur, A.A., Abdollahi, M. (2012). A review of phytotherapy of acne vulgaris: Perspective of new pharmacological treatments. *Fitoterapia*, 83 (8), 1306-1317.
- [232] do Carmo Maquiaveli, C., Rochetti, A.L., Fukumasu, H., Vieira, P.C., da Silva, E.R. (2017). Antileishmanial activity of verbascoside: Selective arginase inhibition of intracellular amastigotes of *Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis* with resistance induced by LPS plus IFN- γ . *Biochem. Pharmacol.*, 127, 28-33.
- [233] Bao, Y., Sun, Y.W., Ji, J., Gan, L., Zhang, C.F., Wang, C.Z., Yuan, C.S. (2019). Genkwanin ameliorates adjuvant-induced arthritis in rats through inhibiting JAK/STAT and NF- κ B signaling pathways. *Phytomedicine*, 63, 153036.
- [234] Kim, M.A., Kang, K., Lee, H.J., Kim, M., Kim, C.Y., Nho, C.W. (2014). Apigenin isolated from *Daphne genkwa* Siebold et Zucc. inhibits 3T3-L1 preadipocyte

- differentiation through a modulation of mitotic clonal expansion. *Life Sci.*, 101 (1-2), 64-72.
- [235] Lee, E.-R., Kim, J.-H., Kang, Y.-J., Cho, S.-G. (2007). The anti-apoptotic and anti-oxidant effect of eriodictyol on UV-induced apoptosis in keratinocytes. *Biol. Pharm. Bull.*, 30 (1), 32-37.
- [236] Liu, J., Chen, L., Cai, S., Wang, Q. (2012). Semisynthesis of apigenin and acacetin-7-O- β -D-glycosides from naringin and their cytotoxic activities. *Carbohydr. Res.*, 357, 41-46.
- [237] Cottigli, F., Loy, G., Garau, D., Floris, C., Caus, M., Pompei, R., Bonsignore, L. (2001). Antimicrobial evaluation of coumarins and flavonoids from the stems of *Daphne gnidium* L. *Phytomedicine*, 8 (4), 302-305.
- [238] Martini, N., Katerere, D., Eloff, J. (2004). Biological activity of five antibacterial flavonoids from *Combretum erythrophyllum* (Combretaceae). *J. Ethnopharmacol.*, 93 (2-3), 207-212.
- [239] Kraft, C., Jenett-Siems, K., Siems, K., Jakupovic, J., Mavi, S., Bienzle, U., Eich, E. (2003). *In vitro* antiplasmodial evaluation of medicinal plants from Zimbabwe. *Phytother. Res.*, 17 (2), 123-128.
- [240] Kim, A.R., Zou, Y.N., Park, T.H., Shim, K.H., Kim, M.S., Kim, N.D., Kim, J.D., Bae, S.J., Choi, J.S., Chung, H.Y. (2004). Active components from *Artemisia iwayomogi* displaying ONOO⁻ scavenging activity. *Phytother. Res.*, 18 (1), 1-7.
- [241] Suh, N., Luyengi, L., Fong, H., Kinghorn, A., Pezzuto, J. (1995). Discovery of natural product chemopreventive agents utilizing HL-60 cell differentiation as a model. *Anticancer Res.*, 15 (2), 233-239.
- [242] Gao, Y., Liu, F., Fang, L., Cai, R., Zong, C., Qi, Y. (2014). Genkwanin inhibits proinflammatory mediators mainly through the regulation of miR-101/MKP-1/MAPK pathway in LPS-activated macrophages. *Plos One*, 9 (5), 1-10.
- [243] Bouzaïene, N.N., Chaabane, F., Sassi, A., Chekir-Ghedira, L., Ghedira, K. (2016). Effect of apigenin-7-glucoside, genkwanin and naringenin on tyrosinase activity and melanin synthesis in B16F10 melanoma cells. *Life Sci.*, 144, 80-85.
- [244] Hakobyan, A., Arabyan, E., Kotsinyan, A., Karalyan, Z., Sahakyan, H., Arakelov, V., Nazaryan, K., Ferreira, F., Zakaryan, H. (2019). Inhibition of African swine fever virus infection by genkwanin. *Antiviral Res.*, 167, 78-82.

- [245] Wang, X., Song, Z.-J., He, X., Zhang, R.-Q., Zhang, C.-F., Li, F., Wang, C.-Z., Yuan, C.-S. (2015). Antitumor and immunomodulatory activity of genkwanin on colorectal cancer in the APCMin⁺ mice. *Int. Immunopharmacol.*, 29 (2), 701-707.
- [246] Gönenç, A., Atak, Y., Orman, M.N., Simsek, B. (2002). Lipid peroxidation and antioxidant systems in hemodialyzed patients. *Dial. Transplant.*, 31 (2), 88-96.
- [247] Society, A.C. (2011). *Oxidative stress: diagnostics, prevention, and therapy*. ACS Publications.
- [248] Sen, S., Chakraborty, R. (2011). The role of antioxidants in human health. S. Andreescu and M. Hepel (Eds.), *Oxidative stress: diagnostics, prevention, and therapy içinde* (1-37). ACS Publications.
- [249] Gupta, V.K., Sharma, S.K. (2006). Plants as natural antioxidants. *Nat. Prod. Radiance.*, 5 (4), 326-334.
- [250] Rathore, G.S., Suthar, M., Pareek, A., Gupta, R. (2011). Nutritional antioxidants: A battle for better health. *J. Nat. Pharm.*, 2, 2-14.
- [251] Percival, M. (1998). Antioxidants. *Clinical nutrition insights*. Advanced Nutrition Publications, Inc., NUT031, 1, 96, 1-4.
- [252] Ratnam, D.V., Ankola, D., Bhardwaj, V., Sahana, D.K., Kumar, M.R. (2006). Role of antioxidants in prophylaxis and therapy: A pharmaceutical perspective. *J. Control. Release.*, 113 (3), 189-207.
- [253] Wootton-Beard, P.C., Ryan, L. (2011). Improving public health?: The role of antioxidant-rich fruit and vegetable beverages. *Food Res. Int.*, 44 (10), 3135-3148.
- [254] Sies, H. (1991). *Oxidative Stress: Oxidants and Antioxidants*. Academic, Orlando, FL.
- [255] Halliwell, B., Gutteridge, J.M. (2015). *Free radicals in biology and medicine*. Oxford University Press, USA.
- [256] Devasagayam, T., Tilak, J., Bloor, K., Sane, K.S., Ghaskadbi, S.S., Lele, R. (2004). Free radicals and antioxidants in human health: current status and future prospects. *J. Assoc. Physicians. India.*, 52, 794-804.
- [257] Fang, Y.-Z., Yang, S., Wu, G. (2002). Free radicals, antioxidants, and nutrition. *Nutrition*, 18 (10), 872-879.
- [258] Kratchanova, M., Denev, P., Ciz, M., Lojek, A., Mihailov, A. (2010). Evaluation of antioxidant activity of medicinal plants containing polyphenol compounds. Comparison of two extraction systems. *Acta. Biochim. Pol.*, 57 (2), 229-234.

- [259] Krishnaiah, D., Sarbatly, R., Bono, A. (2007). Phytochemical antioxidants for health and medicine a move towards nature. *Biotechnol. Mol. Biol. Rev.*, 2 (4), 97-104.
- [260] Packer, L. (2001). *Handbook of antioxidants*. New York.: CRC Press.
- [261] Bandyopadhyay, M., Chakraborty, R., Raychaudhuri, U. (2007). A process for preparing a natural antioxidant enriched dairy product (Sandesh). *Food Sci. Technol.*, 40 (5), 842-851.
- [262] Taleb, A., Ahmad, K.A., Ihsan, A.U., Qu, J., Lin, N., Hezam, K., Koju, N., Hui, L., Qilong, D. (2018). Antioxidant effects and mechanism of silymarin in oxidative stress induced cardiovascular diseases. *Biomed. Pharmacother.*, 102, 689-698.
- [263] Ceaser, E.K., Ramachandran, A., Levonen, A.-L., Darley-Usmar, V.M. (2003). Oxidized low-density lipoprotein and 15-deoxy-12, 14-PGJ2 increase mitochondrial complex I activity in endothelial cells. *Am. J. Physiol-Heart C.*, 285 (6), 2298-2308.
- [264] Park, E.J., Pezzuto, J.M. (2002). Botanicals in cancer chemoprevention. *Cancer Metastasis Rev.*, 21 (3), 231-255.
- [265] Ardestani, A., Yazdanparast, R. (2007). Antioxidant and free radical scavenging potential of *Achillea santolina* extracts. *Food Chem.*, 104 (1), 21-29.
- [266] Shahat, A.A., Ibrahim, A.Y., Elsaid, M.S. (2014). Polyphenolic content and antioxidant activity of some wild Saudi Arabian asteraceae plants. *Asian Pac. J. Trop. Med.*, 7 (7), 545-551.
- [267] Bora, K.S., Sharma, A. (2011). Evaluation of antioxidant and free-radical scavenging potential of *Artemisia absinthium*. *Pharm. Biol.*, 49 (12), 1216-1223.
- [268] Citoglu, G.S., Coban, T., Sever, B., Iscan, M. (2004). Antioxidant properties of *Ballota* species growing in Turkey. *J. Ethnopharmacol.*, 92 (2-3), 275-280.
- [269] Bahar, E., Siddika, M.S., Nath, B., Yoon, H. (2016). Evaluation of in vitro antioxidant and in vivo antihyperlipidemic activities of methanol extract of aerial Part of *Crassocephalum crepidioides* (Asteraceae) Benth S Moore. *Trop. J. Pharm. Res.*, 15 (3), 481-488.
- [270] Jiang, J., Yuan, X., Wang, T., Chen, H., Zhao, H., Yan, X., Wang, Z., Sun, X., Zheng, Q. (2014). Antioxidative and cardioprotective effects of total flavonoids extracted from *Dracocephalum moldavica* L. against acute ischemia/reperfusion-

- induced myocardial injury in isolated rat heart. *Cardiovasc. Toxicol.*, 14 (1), 74-82.
- [271] Goldansaz, S.M., Mahboubi, A., Yazdi-nejad, A., Jahanbakhshi, M., Mojab, F. (2018). Investigation on total phenolic content, antibacterial, and antioxidant activity of ethanolic extract of *Helichrysum leucocephalum* Boiss. *Am. J. Essent. Oil. Nat. Prod.*, 6 (1), 20-24.
- [272] Mothana, R.A., Alsaïd, M.S., Al-Musayeib, N.M. (2011). Phytochemical analysis and *in vitro* antimicrobial and free-radical-scavenging activities of the essential oils from *Euryops arabicus* and *Laggera decurrens*. *Molecules*, 16 (6), 5149-5158.
- [273] Ezzoubi, Y., Bousta, D., Lachkar, M., Farah, A. (2014). Antioxidant and anti-inflammatory properties of ethanolic extract of *Lavandula stoechas* L. from Taounate region in Morocco. *Int. J. Phytopharm.*, 5 (1), 21-26.
- [274] Zhang, X.-L., Guo, Y.-S., Wang, C.-H., Li, G.-Q., Xu, J.-J., Chung, H.Y., Ye, W.-C., Li, Y.-L., Wang, G.-C. (2014). Phenolic compounds from *Origanum vulgare* and their antioxidant and antiviral activities. *Food Chem.*, 152, 300-306.
- [275] Santos-Gomes, P.C., Seabra, R.M., Andrade, P.B., Fernandes-Ferreira, M. (2002). Phenolic antioxidant compounds produced by *in vitro* shoots of sage (*Salvia officinalis* L.). *Plant Sci.*, 162 (6), 981-987.
- [276] Tundis, R., Menichini, F., Loizzo, M.R., Bonesi, M., Solimene, U., Menichini, F. (2012). Studies on the potential antioxidant properties of *Senecio stibianus* Lacaita (Asteraceae) and its inhibitory activity against carbohydrate-hydrolysing enzymes. *Nat. Prod. Res.*, 26 (5), 393-404.
- [277] Seyoum, A., Asres, K., El-Fiky, F.K. (2006). Structure–radical scavenging activity relationships of flavonoids. *Phytochemistry*, 67 (18), 2058-2070.
- [278] Huang, D., Ou, B., Prior, R.L. (2005). The chemistry behind antioxidant capacity assays. *J. Agric. Food Chem.*, 53 (6), 1841-1856.
- [279] Büyüktünel, E. (2013). Toplam fenolik içerik ve antioksidan kapasite tayininde kullanılan başlıca spektrofotometrik yöntemler. *Marmara Pharm J.*, 17, 93-103.
- [280] Ochwang'i, D.O., Kimwele, C.N., Oduma, J.A., Gathumbi, P.K., Mbaria, J.M., Kiama, S.G. (2014). Medicinal plants used in treatment and management of cancer in Kakamega County, Kenya. *J. Ethnopharmacol.*, 151 (3), 1040-1055.

- [281] Senol, H. (2019). *Cytotoxic Effect and Apoptosis Induction of Verbascoside in MCF-7 and MDA-MB-231*. Master thesis: Nicosia Near East University, Institute of Health Sciences.
- [282] Hanahan, D., Weinberg, R.A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 144 (5), 646-674.
- [283] Pucci, B., Kasten, M., Giordano, A. (2000). Cell cycle and apoptosis. *Neoplasia*, 2 (4), 291-299.
- [284] Greenwell, M., Rahman, P. (2015). Medicinal plants: their use in anticancer treatment. *Int. J. Pharm. Sci. Res.*, 6 (10), 4103.
- [285] Ye, Y.-T., Zhong, W., Sun, P., Wang, D., Wang, C., Hu, L.-M., Qian, J.-Q. (2017). Apoptosis induced by the methanol extract of *Salvia miltiorrhiza* Bunge in non-small cell lung cancer through PTEN-mediated inhibition of PI3K/Akt pathway. *J. Ethnopharmacol.*, 200, 107-116.
- [286] Kummalue, T., Pornchai, O., Jiratchariyakul, W., Chanchai, M., Pattanapanyasat, K., Sukapirom, K., Iemsri, S. (2007). Antiproliferative effect of *Erycibe elliptilimba* on human breast cancer cell lines. *J. Ethnopharmacol.*, 110 (3), 439-443.
- [287] Butler, M.S. (2004). The role of natural product chemistry in drug discovery. *J. Nat. Pharm.*, 67 (12), 2141-2153.
- [288] Cragg, G.M., Grothaus, P.G., Newman, D.J. (2009). Impact of natural products on developing new anti-cancer agents. *Chem. Rev.*, 109 (7), 3012-3043.
- [289] Fridlender, M., Kapulnik, Y., Koltai, H. (2015). Plant derived substances with anti-cancer activity: from folklore to practice. *Front. Plant Sci.*, 6, 1-9.
- [290] Seca, A.M., Pinto, D.C. (2018). Plant secondary metabolites as anticancer agents: successes in clinical trials and therapeutic application. *Int. J. Mol. Sci.*, 19 (1), 263.
- [291] Talib, W.H., Mahasneh, A.M. (2010). Antiproliferative activity of plant extracts used against cancer in traditional medicine. *Sci. Pharm.*, 78 (1), 33-46.
- [292] Riss, T.L., Moravec, R.A, Niles, A.L., Benink, H.A., Worzella, T.J., Minor, L. (2004). *Assay Guidance Manual*. Bethesda: Eli Lilly & Company.
- [293] Zucco, F., De Angelis, I., Stamatii, A. (1998). Cellular models for *in vitro* toxicity testing. M. Clynes (Ed.), *Animal cell culture techniques* içinde (s. 395-422). Berlin, Heidelberg: Springer.

- [294] Galluzzi, L., Aaronson, S., Abrams, J., Alnemri, E., Andrews, D., Baehrecke, E., Bazan, N., Blagosklonny, M., Blomgren, K., Borner, C. (2009). Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring cell death in higher eukaryotes. *Cell Death Differ.*, 16 (8), 1093-1107.
- [295] Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods*, 65 (1-2), 55-63.
- [296] Altman, F.P. (1976). Tetrazolium salts and formazans. *Prog. Histochem. Cytochem.*, 9 (3), 1-56.
- [297] Erkekoğlu, P., Baydar T. Güncel İn Vitro Sitotoksikite Testleri. (2021). *Hujpharm.*, 41 (1), 45-63.
- [298] Denizot, F., Lang, R. (1986). Rapid colorimetric assay for cell growth and survival: modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. *J. Immunol. Methods*, 89 (2), 271-277.
- [299] Paull, K.D., Shoemaker, R.H., Boyd, M.R., Parsons, J.L., Risbood, P.A., Barbera, W.A., Sharma, M.N., Baker, D.C., Hand, E., Scudiero, D.A. (1988). The synthesis of XTT: A new tetrazolium reagent that is bio-reducible to a water-soluble formazan. *J. Heterocycl. Chem.*, 25 (3), 911-914.
- [300] Çakmak, Z. (1999). Kümeleme analizinde geçerlilik problemi ve kümeleme sonuçlarının değerlendirilmesi. *Dpusbe.*, 3, 187-205.
- [301] Jobson, J.D. (2012). *Applied multivariate data analysis: volume II: Categorical and Multivariate Methods*. Springer Science & Business Media.
- [302] Kalaycı, Ş. (2006). *SPSS Uygulamalı Çok Değişkenli İstatistik Teknikleri*. Asil Yayın Dağıtım, Ankara.
- [303] Mummenhoff, K., Franzke, A., Koch, M. (1997). Molecular phylogenetics of Thlaspi (Brassicaceae) based on chloroplast DNA restriction site variation and sequences of the internal transcribed spacers of nuclear ribosomal DNA. *Can. J Bot.*, 75 (3), 469-482.
- [304] Gülşen, O., Mutlu, N. (2005). Bitki biliminde kullanılan genetik markırlar ve kullanım alanları. *Alatarım*, 4 (2), 27-37.
- [305] Baldwin, B.G., Sanderson, M.J., Porter, J.M., Wojciechowski, M.F., Campbell, C.S., Donoghue, M.J. (1995). The ITS region of nuclear ribosomal DNA: a

- valuable source of evidence on angiosperm phylogeny. *Ann. Missouri Bot. Gard.*, 247-277.
- [306] Temizkan, G., Arda, N. (1999). *Moleküler biyolojide kullanılan yöntemler*. Ankara: Nobel Akademik Yayıncılık.
- [307] Turner, P., McLennan, A., Bates, A., White, M. (2004). *Moleküler biyoloji önemli notlar*. (Çev. M, Konuk). Ankara: Nobel Akademik Yayıncılık.
- [308] Baldwin, B.G. (1992). Phylogenetic utility of the internal transcribed spacers of nuclear ribosomal DNA in plants: an example from the Compositae. *Mol. Phylogenetics Evol.*, 1 (1), 3-16.
- [309] White, T.J., Bruns, T., Lee, S., Taylor, J. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. M.A. Innis, D.H. Gelfand, J.J. Sninsky and T.J. White (Eds.), *PCR protocols: a guide to methods and applications* içinde (s. 315-322). Academic Press, San Diego.
- [310] Tez, C. (2011): *Türkiye’de yayılış gösteren Sideritis L.(Lamiaceae) cinsinin Empedoclia seksiyonuna ait taksonların ITS çekirdek ribozomal DNA dizilerine dayalı filogenetik analizi*. Yüksek Lisans Tezi. Balıkesir: Balıkesir Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü.
- [311] Korabecna, M. (2007). The variability in the fungal ribosomal DNA (ITS1, ITS2, and 5.8 S rRNA gene): its biological meaning and application in medical mycology. A. Mendez-Vilas (Ed.), *Communicating current research and educational topics and trends in applied microbiology* içinde (s. 783-787). Badajoz: Formatex.
- [312] Maxam, A.M., Gilbert, W. (1977). A new method for sequencing DNA. *Proc. Nati. Acad. S.*, 74 (2), 560-564.
- [313] Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A.R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Nati. Acad. S.*, 74 (12), 5463-5467.
- [314] Klug, W., Cummings, M.R., Spencer, C.A., Palladino, M.A., Killian, D.J. (2000). *Concepts of Genetics*. USA: Pearson Education.
- [315] Mount, D. (2004). *Bioinformatics. Sequence and genome analysis*. Cold Spring Harbor. NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- [316] Xiong, J. (2006). *Essential Bioinformatics*. Cambridge University Press.
- [317] Benson, D.A., Karsch-Mizrachi, I., Lipman, D.J., Ostell, J., Wheeler, D.L. (2007). GenBank. *Nucleic Acids. Res.*, 35, D21-D25.

- [318] Nilsson, R.H., Kristiansson, E., Ryberg, M., Larsson, K.H. (2005). Approaching the taxonomic affiliation of unidentified sequences in public databases—an example from the mycorrhizal fungi. *Bioinform.*, 6 (1), 1-7.
- [319] Walton, M. (1993). *Molecular markers: Which ones to use. seed world*, 131 (8), 22-29.
- [320] Johnson, M., Zaretskaya, I., Raytselis, Y., Merezhuk, Y., McGinnis, S., Madden, T.L. (2008). NCBI BLAST: a better web interface. *Nucleic Acids Res.*, 36, W5-W9.
- [321] Tamura, K., Dudley, J., Nei, M., Kumar, S. (2007). MEGA4: molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol Biol. Evol.*, 24 (8), 1596-1599.
- [322] Thompson, J.D., Gibson, T.J., Plewniak, F., Jeanmougin, F., Higgins, D.G. (1997). The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res.*, 25 (24), 4876-4882.
- [323] Halbritter, H., Ulrich, S., Grímsson, F., Weber, M., Zetter, R., Hesse, M., Buchner, R., Svojtka, M., Frosch-Radivo, A. (2018). *Illustrated pollen terminology*. Springer Nature.
- [324] Michael Hesse, H.H., Reinhard Zetter, Martina Weber, Ralf Buchner, Andrea Frosch-Radivo, Silvia Ulrich. (2009). *Pollen Terminology An illustrated handbook*. Austria: Springer Wien New York.
- [325] Faegri, K., Iversen, J. (1975). *Textbook of pollen analysis*. New York: Hafner Press.
- [326] Punt, W., Blackmove, S., Nilson, S., Thomas, A. (1994). *Glossary of pollen and spore terminology*. LPP foundation, Utrecht, LPP contribution series No. 1.
- [327] Kumarasamy, Y., Byres, M., Cox, P.J., Jaspars, M., Nahar, L., Sarker, S.D. (2007). Screening seeds of some Scottish plants for free radical scavenging activity. *Phytother. Res.*, 21 (7), 615-621.
- [328] Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic. Biol.*, 26 (9-10), 1231-1237.

- [329] Singleton, V.L., Orthofer, R., Lamuela-Raventós, R.M. (1999). [14] Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. *Meth. Enzymol.*, 299, 152-178.
- [330] Kosar, M., Göger, F., Can Baser, K.H. (2008). *In vitro* antioxidant properties and phenolic composition of *Salvia virgata* Jacq. from Turkey. *J. Agric. Food Chem.*, 56 (7), 2369-2374.
- [331] Berridge, M.V., Herst, P.M., Tan, A.S. (2005). Tetrazolium dyes as tools in cell biology: new insights into their cellular reduction. *Biotechnol. Annu. Rev.*, 11, 127-152.
- [332] Abu-Asab, M., Cantino, P. (1992). Pollen morphology in subfamily Lamioideae (Labiatae) and its phylogenetic implications. M. Harley and T. Reynolds (Eds.), *Advances in Labiate Science* içinde (s. 97-112). Royal Botanic Gardens, Kew.
- [333] Abu-Asab, M.S., Cantino, P.D. (1994). Systematic implications of pollen morphology in subfamilies Lamioideae and Pogostemonoideae (Labiatae). *Ann. Mo. Bot. Gard.*, 81, 653-686.
- [334] de la Luz Cádiz-Gurrea, M., Fernández-Arroyo, S., Joven, J., Segura-Carretero, A. (2013). Comprehensive characterization by UHPLC-ESI-Q-TOF-MS from an *Eryngium bourgatii* extract and their antioxidant and anti-inflammatory activities. *Food Res. Int.*, 50 (1), 197-204.
- [335] Clifford, M.N., Johnston, K.L., Knight, S., Kuhnert, N. (2003). Hierarchical scheme for LC-MS n identification of chlorogenic acids. *J. Agric. Food Chem.*, 51 (10), 2900-2911.
- [336] Barros, L., Dueñas, M., Dias, M.I., Sousa, M.J., Santos-Buelga, C., Ferreira, I.C. (2013). Phenolic profiles of cultivated, *in vitro* cultured and commercial samples of *Melissa officinalis* L. infusions. *Food Chem.*, 136 (1), 1-8.
- [337] Mitreski, I., Stanoeva, J.P., Stefova, M., Stefkov, G., Kulevanova, S. (2014). Polyphenols in representative *Teucrium* species in the Flora of R. Macedonia: LC/DAD/ESI-MSⁿ Profile and Content. *Nat. Prod. Commun.*, 9 (2), 175-180.
- [338] Petreska, J., Stefkov, G., Kulevanova, S., Alipieva, K., Bankova, V., Stefova, M. (2011). Phenolic compounds of mountain tea from the Balkans: LC/DAD/ESI/MSⁿ profile and content. *Nat. Prod. Commun.*, 6 (1), 21-30.
- [339] Francescato, L.N., Debenedetti, S.L., Schwanz, T.G., Bassani, V.L., Henriques, A.T. (2013). Identification of phenolic compounds in *Equisetum giganteum* by

- LC–ESI-MS/MS and a new approach to total flavonoid quantification. *Talanta*, 105, 192-203.
- [340] Mullen, W., Yokota, T., Lean, M.E., Crozier, A. (2003). Analysis of ellagitannins and conjugates of ellagic acid and quercetin in raspberry fruits by LC–MSⁿ. *Phytochemistry*, 64 (2), 617-624.
- [341] Tasdemir, D., Sticher, O. (1998). Labdane diterpenes from *Leonurus persicus*. *Phytochemistry*, 49 (1), 137-143.
- [342] Kontogianni, V.G., Tomic, G., Nikolic, I., Nerantzaki, A.A., Sayyad, N., Stosic-Grujicic, S., Stojanovic, I., Gerothanassis, I.P., Tzakos, A.G. (2013). Phytochemical profile of *Rosmarinus officinalis* and *Salvia officinalis* extracts and correlation to their antioxidant and anti-proliferative activity. *Food Chem.*, 136 (1), 120-129.
- [343] Torras-Claveria, L., Jauregui, O., Bastida, J., Codina, C., Viladomat, F. (2007). Antioxidant activity and phenolic composition of lavandin (*Lavandula x intermedia* Emeric ex Loiseleur) waste. *J. Agric. Food Chem.*, 55 (21), 8436-8443.
- [344] Sun, H., Liu, M., Lin, Z., Jiang, H., Niu, Y., Wang, H., Chen, S. (2015). Comprehensive identification of 125 multifarious constituents in Shuang–huang–lian powder injection by HPLC-DAD-ESI-IT-TOF-MS. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 115, 86-106.
- [345] Jiang, J., Li, Y., Feng, Z., Yang, Y., Zhang, P. (2015). Glucaric acids from *Leonurus japonicus*. *Fitoterapia*, 107, 85-89.
- [346] Iscan, G., Kose, Y.B., Demirci, F. (2019). *Bitkisel drogların makroskopik ve mikroskopik özellikleri*. Antalya Eczacı Odası Akademisi Yayınları.
- [347] Shekari, A., Mahdipour, M.H., Nazeri, V., Shokrpour, M. (2017). Floral structure, stigma receptivity and pollen viability in relation to protandry in Motherwort (*Leonurus cardiaca* L.). *Biological Forum*, 9 (2), 237-242.
- [348] Budantsev, A., Lobova, T. (1997). Fruit morphology, anatomy and taxonomy of tribe Nepeteae (Labiatae). *Edinb. J. Bot*, 54 (2), 183-216.
- [349] Metcalfe, C.R, Chalk, L. (1972). *Anatomy of the Dicotyledons*. Clarendon Press, Oxford.
- [350] Simpson, M. (2018). *Plant Systematics*. Academic Press.

- [351] Stefanova, M.A., Koleva, D.P. (2014). Leaf's structural response of *in vitro*-cultured *Leonurus cardiaca* plants to N6-benzyladenine and indole-3-butyric acid. *J. Pharm. Res.*, 8 (8), 1014-1021.
- [352] Zheng, W., Wang, S.Y. (2001). Antioxidant activity and phenolic compounds in selected herbs. *J. Agric. Food Chem.*, 49 (11), 5165-5170.
- [353] Tachjian, A., Maria, V., Jahangir, A. (2010). Use of herbal products and potential interactions in patients with cardiovascular diseases. *J. Am. Coll. Cardiol.*, 55 (6), 515-525.
- [354] Formica, J., Regelson, W. (1995). Review of the biology of quercetin and related bioflavonoids. *Food Chem. Toxicol.*, 33 (12), 1061-1080.
- [355] Chahar, M.K., Sharma, N., Dobhal, M.P., Joshi, Y.C. (2011). Flavonoids: A versatile source of anticancer drugs. *Pharmacogn. Rev.*, 5 (9), 1-12.
- [356] Plochmann, K., Korte, G., Koutsilieri, E., Richling, E., Riederer, P., Rethwilm, A., Schreier, P., Scheller, C. (2007). Structure–activity relationships of flavonoid-induced cytotoxicity on human leukemia cells. *Arch. Biochem. Biophys.*, 460 (1), 1-9.
- [357] Panwar, R., Sharma, A.K., Kaloti, M., Dutt, D., Pruthi, V. (2016). Characterization and anticancer potential of ferulic acid-loaded chitosan nanoparticles against ME-180 human cervical cancer cell lines. *Appl. Nanosci*, 6 (6), 803-813.
- [358] Rosa, L.d.S., Silva, N., Soares, N., Monteiro, M., Teodoro, A. (2016). Anticancer properties of phenolic acids in colon cancer—a review. *J. Nutr. Food Sci.*, 6 (2), 1-7.
- [359] Rosendahl, A.H., Perks, C.M., Zeng, L., Markkula, A., Simonsson, M., Rose, C., Ingvar, C., Holly, J.M., Jernström, H. (2015). Caffeine and caffeic acid inhibit growth and modify estrogen receptor and insulin-like growth factor I receptor levels in human breast cancer. *Clin. Cancer Res.*, 21 (8), 1877-1887.
- [360] Roleira, F.M., Tavares-da-Silva, E.J., Varela, C.L., Costa, S.C., Silva, T., Garrido, J., Borges, F. (2015). Plant derived and dietary phenolic antioxidants: Anticancer properties. *Food Chem.*, 183, 235-258.
- [361] Chase, M.W., Christenhusz, M., Fay, M., Byng, J., Judd, W.S., Soltis, D., Mabberley, D., Sennikov, A., Soltis, P.S., Stevens, P.F. (2016). An update of the

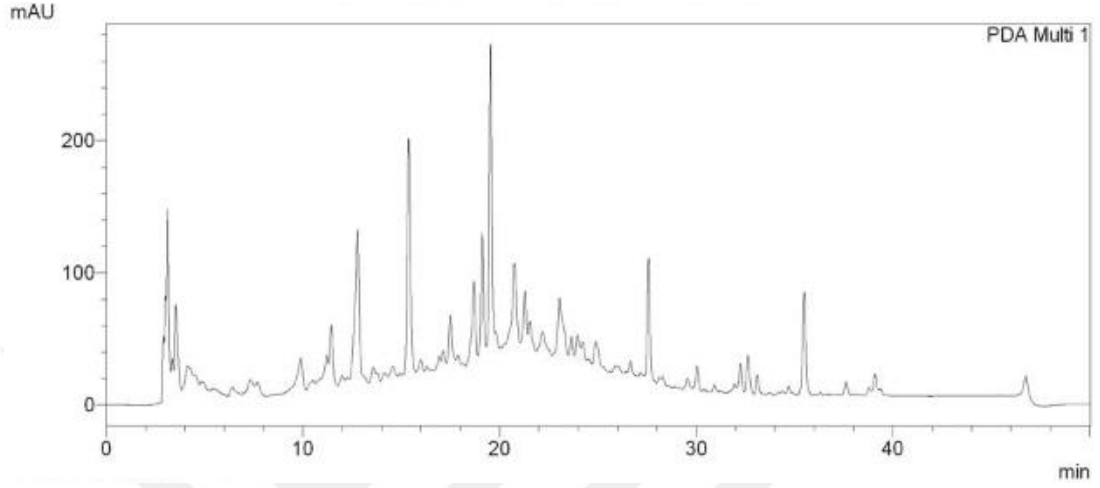
Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG IV. *Bot. J. Linn. Soc.*, 181 (1), 1-20.



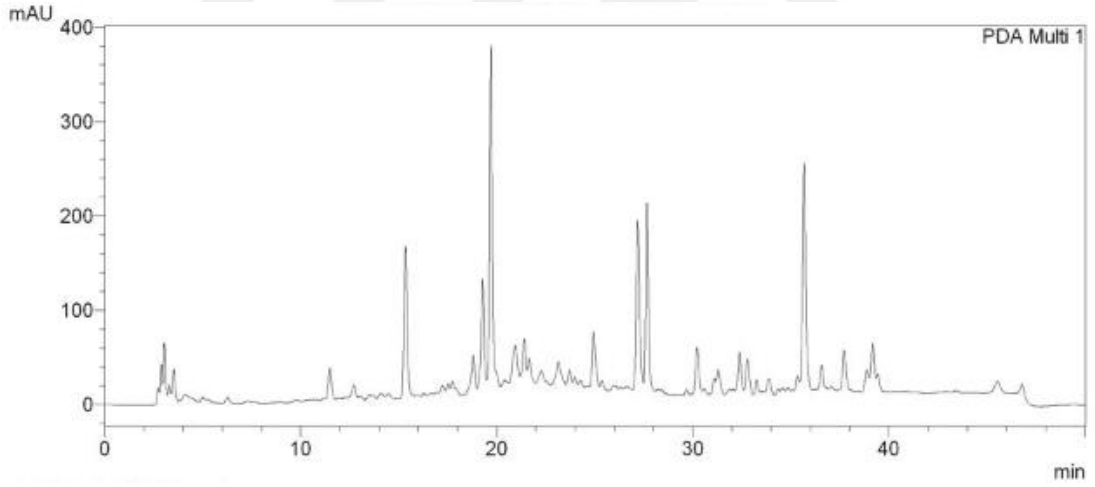
EKLER

Shimadzu 10AVP Sistemi İle Yapılan HPLC-DAD Kromatogramları

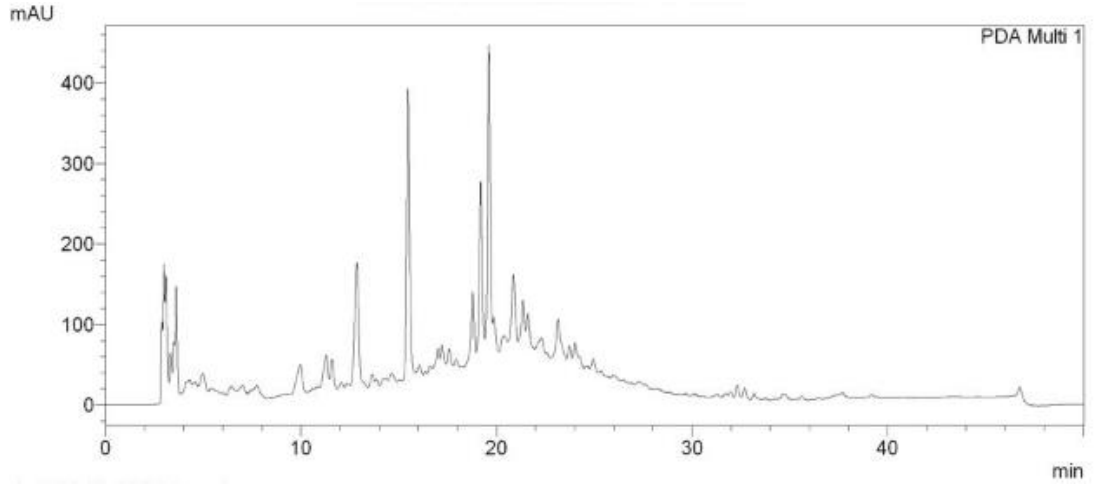
Ekstrelerin genel profilini gösteren kromatogramlara bu kısımda yer verilmiştir.



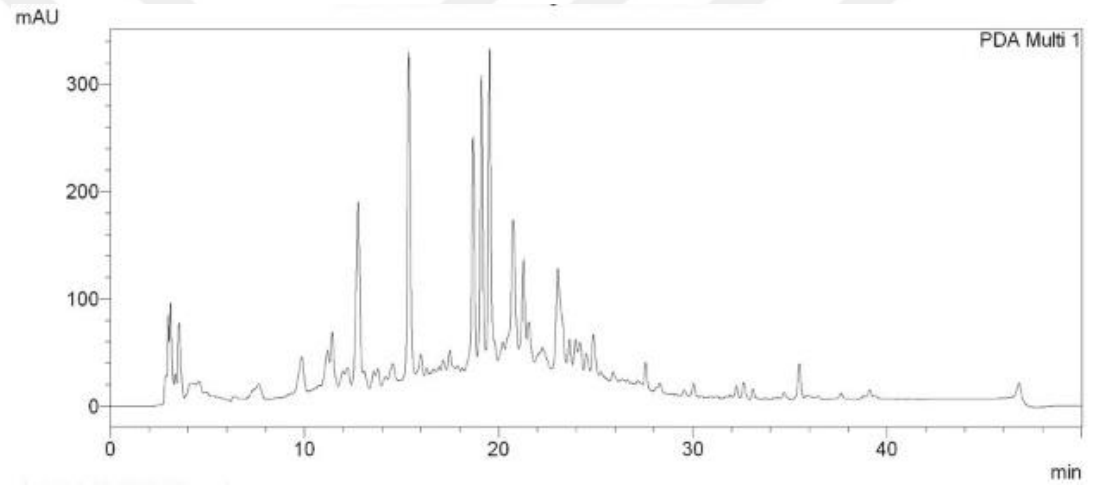
EK 1. NS17 (*L. quinquelobatus*) etanol ekstresinin PDA Kromatogramı (280 nm)



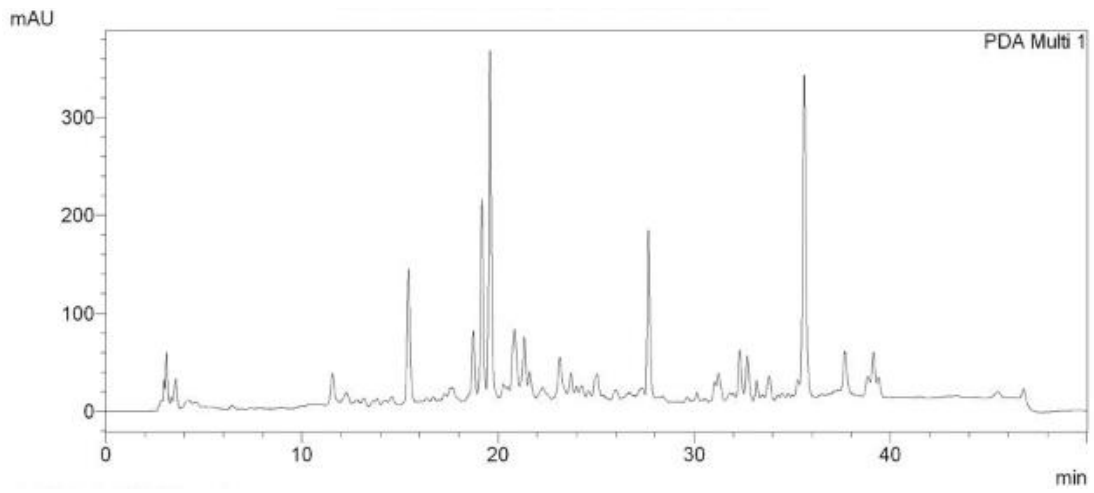
EK 2. NS17 (*L. quinquelobatus*) metanol ekstresinin PDA Kromatogramı (280 nm)



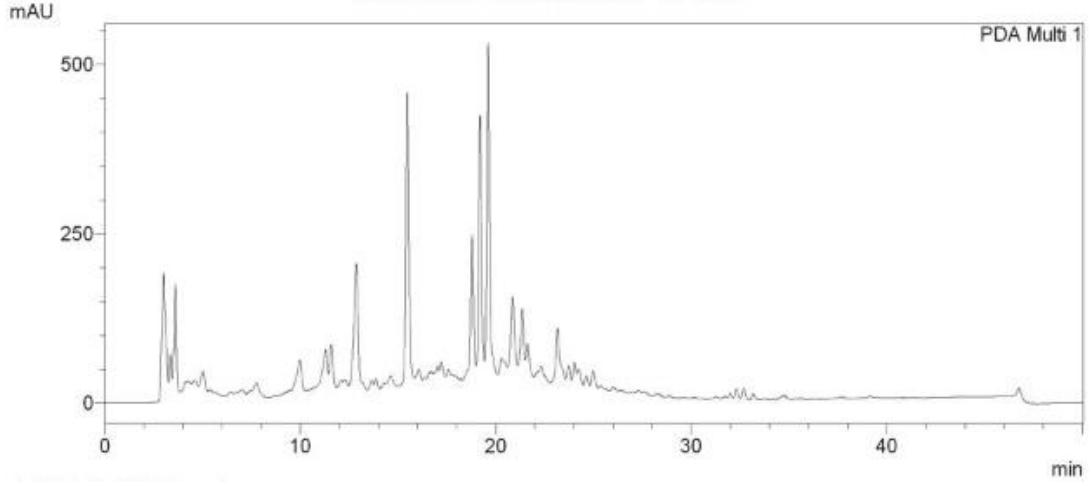
EK 3. *NS17 (L. quinquelobatus) infüzyon PDA Kromatogramı (280 nm)*



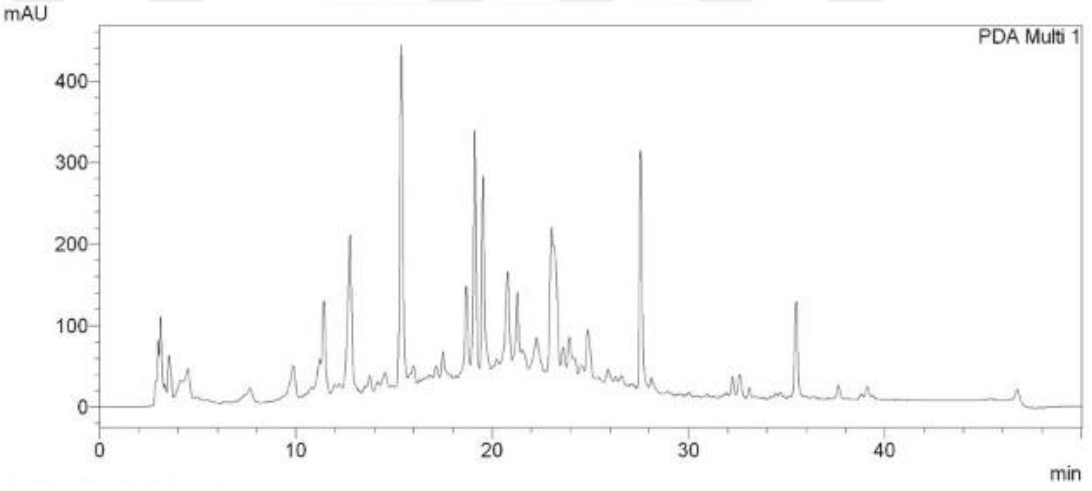
EK 4. *NS18 (L. quinquelobatus) etanol ekstresinin PDA Kromatogramı (280 nm)*



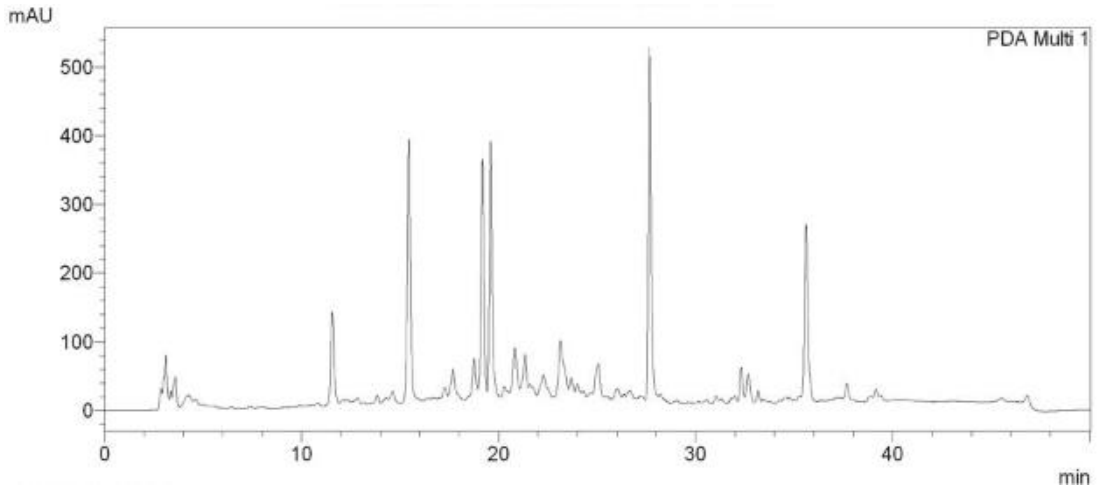
EK 5. *NS18 (L. quinquelobatus) metanol ekstresinin PDA Kromatogramı (280 nm)*



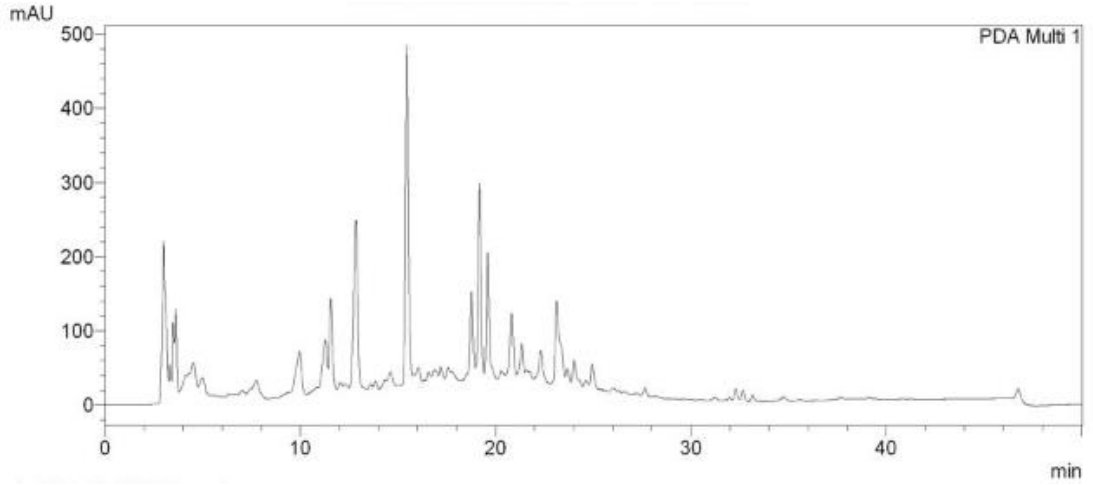
EK 6. NS18 (*L. quinquelobatus*) infüzyon PDA Kromatogramı (280 nm)



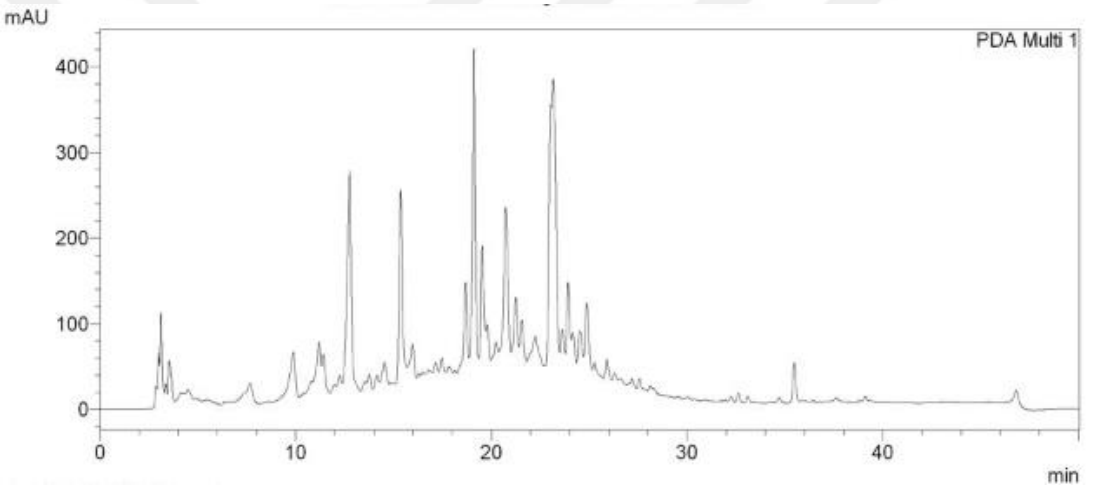
EK 7. NS19 (*L. glaucescens*) etanol ekstresinin PDA Kromatogramı (280 nm)



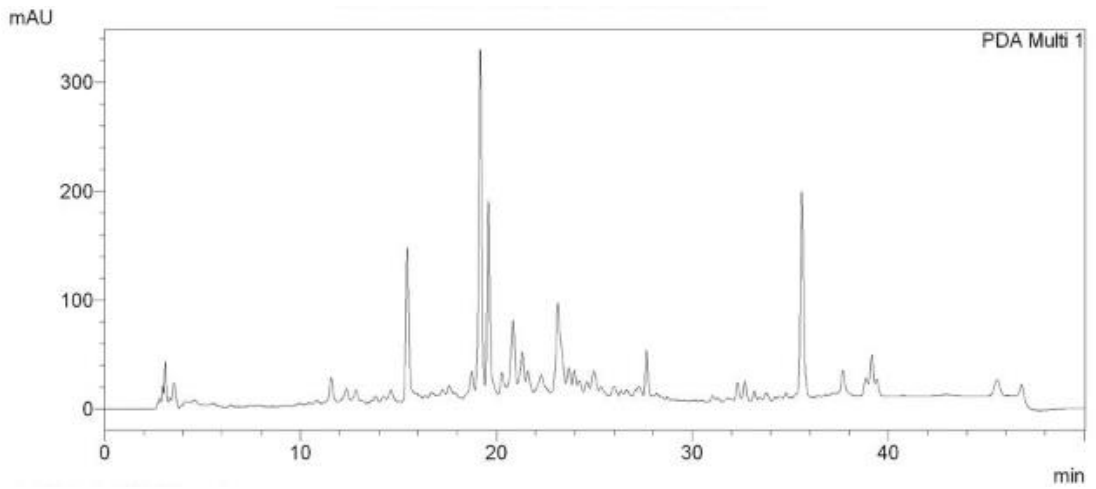
EK 8. NS19 (*L. glaucescens*) metanol ekstresinin PDA Kromatogramı (280 nm)



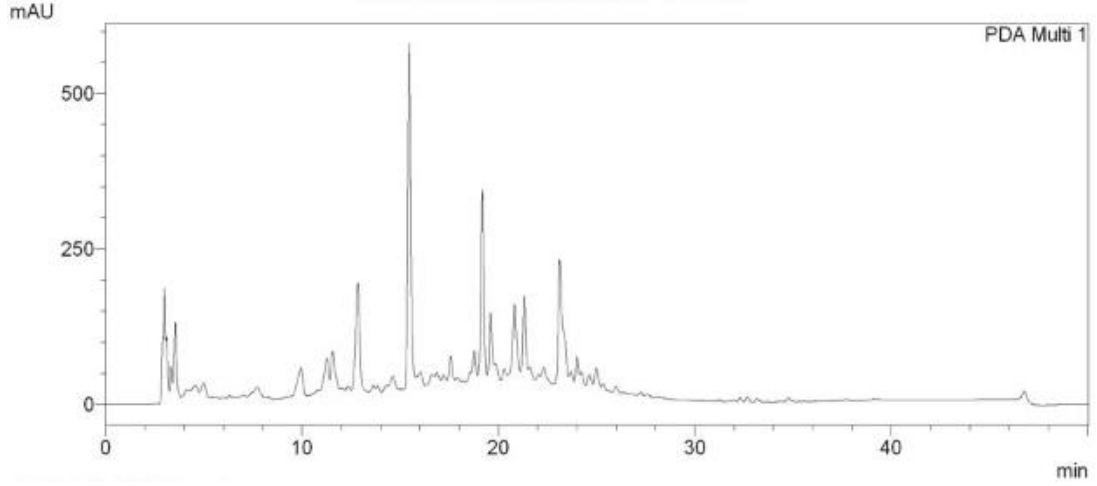
EK 9. NS19 (*L. glaucescens*) infüzyon 280 nm PDA Kromatogramı



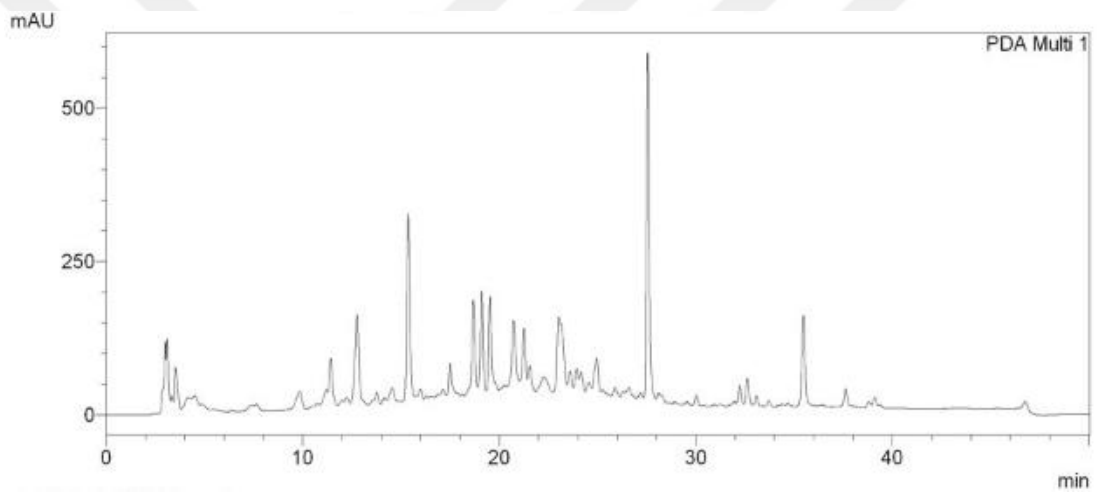
EK 10. NS20 (*L. glaucescens*) etanol ekstresinin PDA Kromatogramı (280 nm)



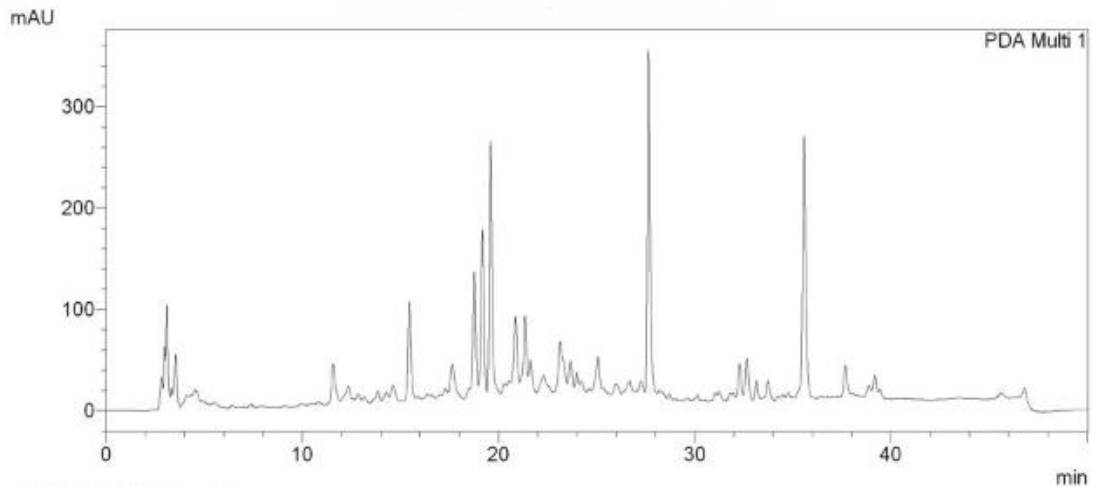
EK 11. NS20 (*L. glaucescens*) metanol ekstresinin PDA Kromatogramı (280 nm)



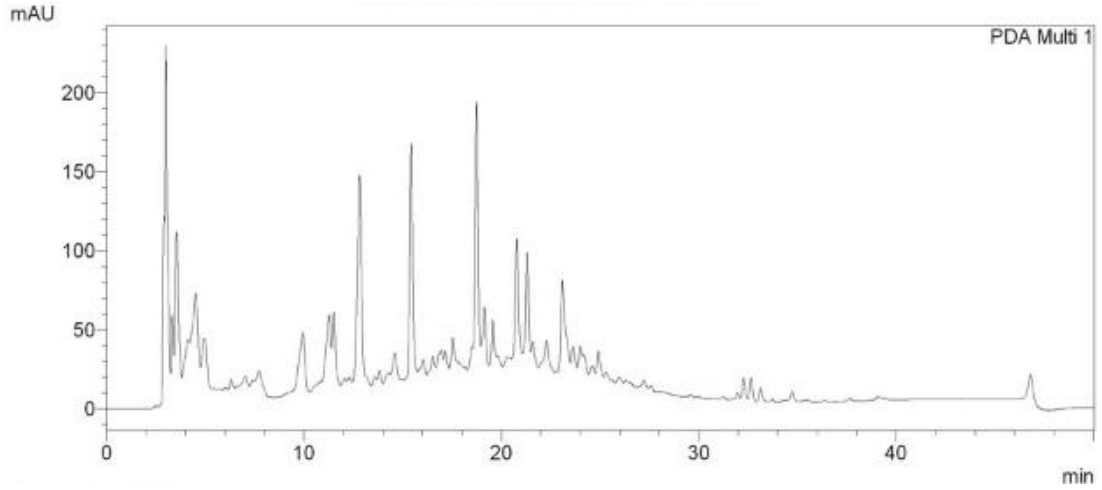
EK 12. *NS20 (L. glaucescens) infüzyon PDA Kromatogramı (280 nm)*



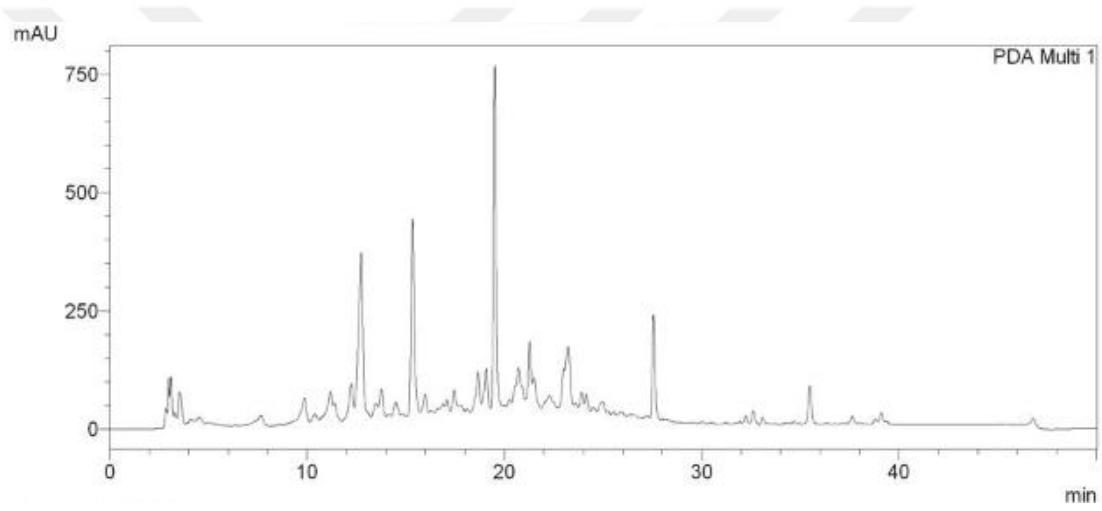
EK 13. *NS26 (L. glaucescens) etanol ekstresinin PDA Kromatogramı (280 nm)*



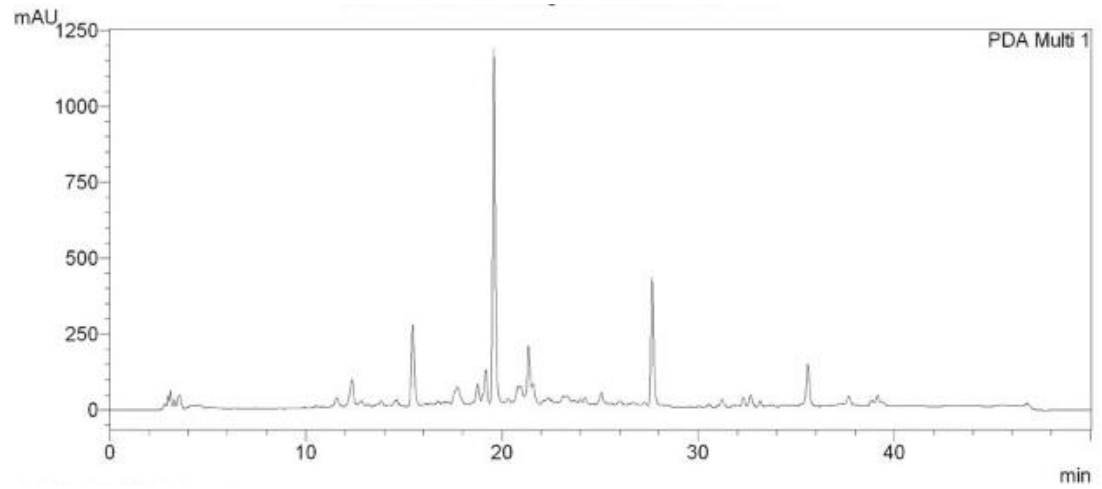
EK 14. *NS26 (L. glaucescens) metanol ekstresinin PDA Kromatogramı (280 nm)*



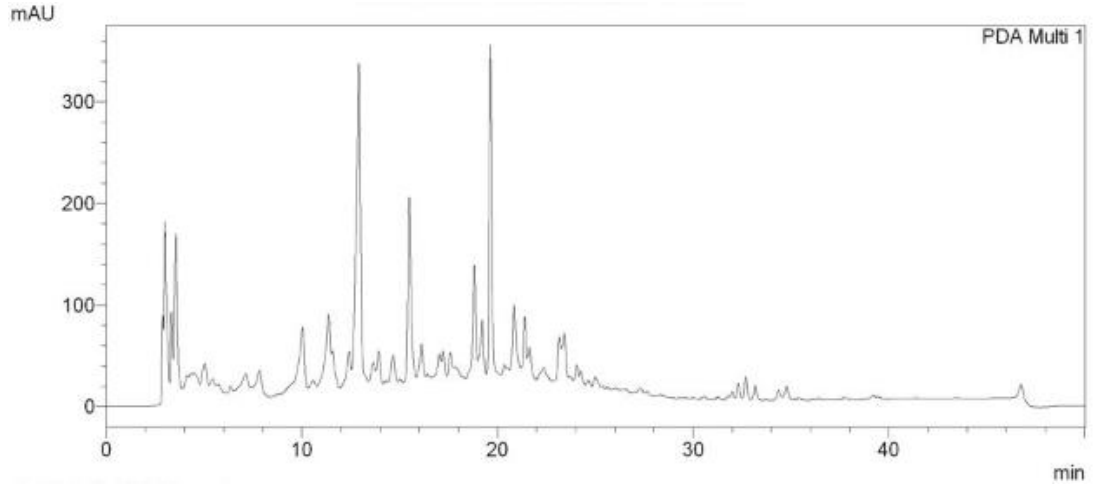
EK 15. NS26 (*L. glaucescens*) infüzyon PDA Kromatogramı (280 nm)



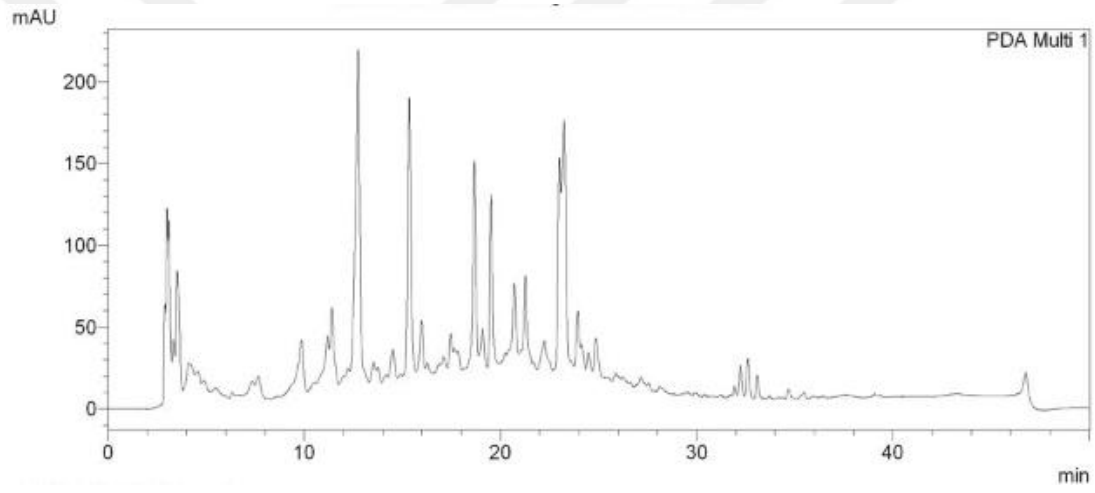
EK 16. NS21 (*L. cardiaca*) etanol ekstresinin PDA Kromatogramı (280 nm)



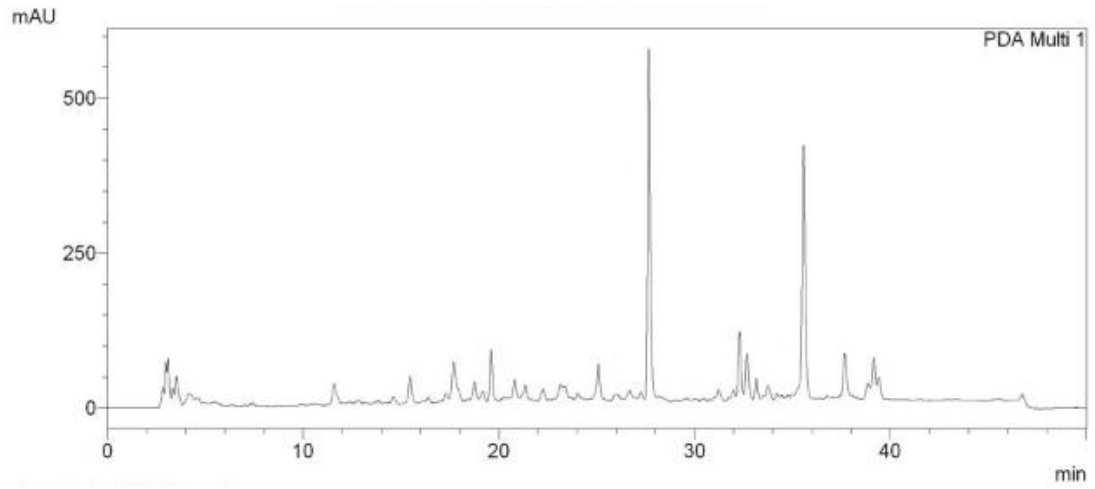
EK 17. NS21 (*L. cardiaca*) metanol ekstresinin PDA Kromatogramı (280 nm)



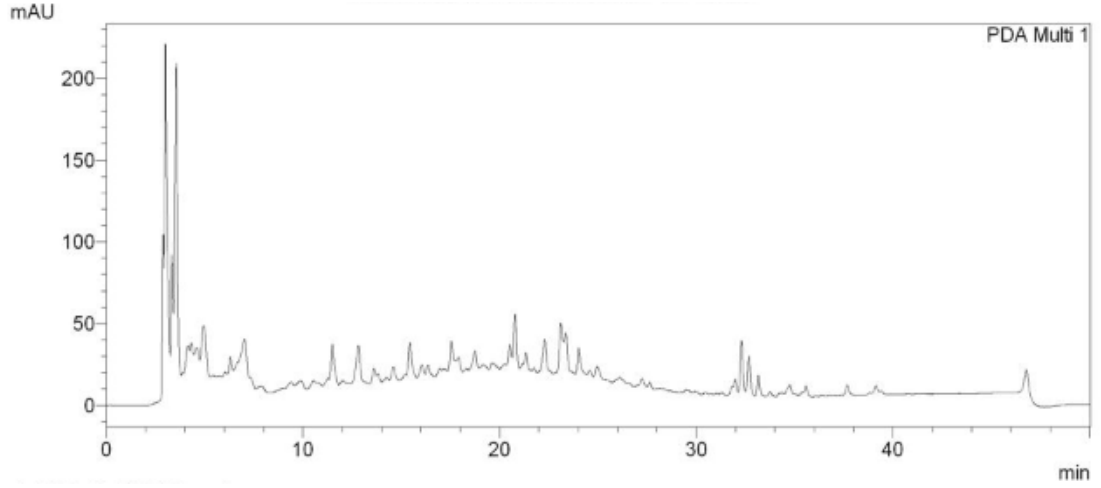
EK 18. NS21 (*L. cardiaca*) infüzyon PDA Kromatogramı (280 nm)



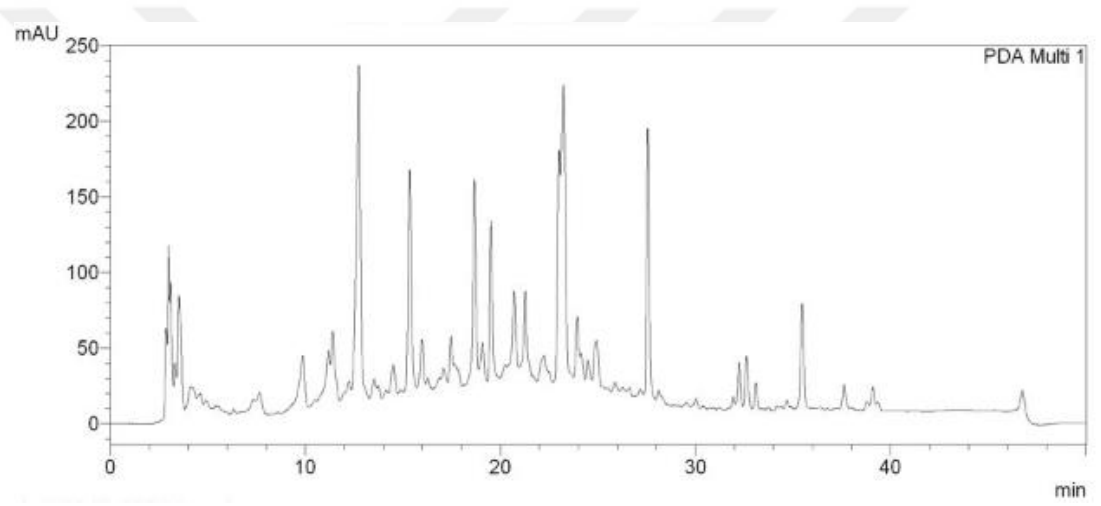
EK 19. NS22 (*L. cardiaca*) etanol ekstresinin PDA Kromatogramı (280 nm)



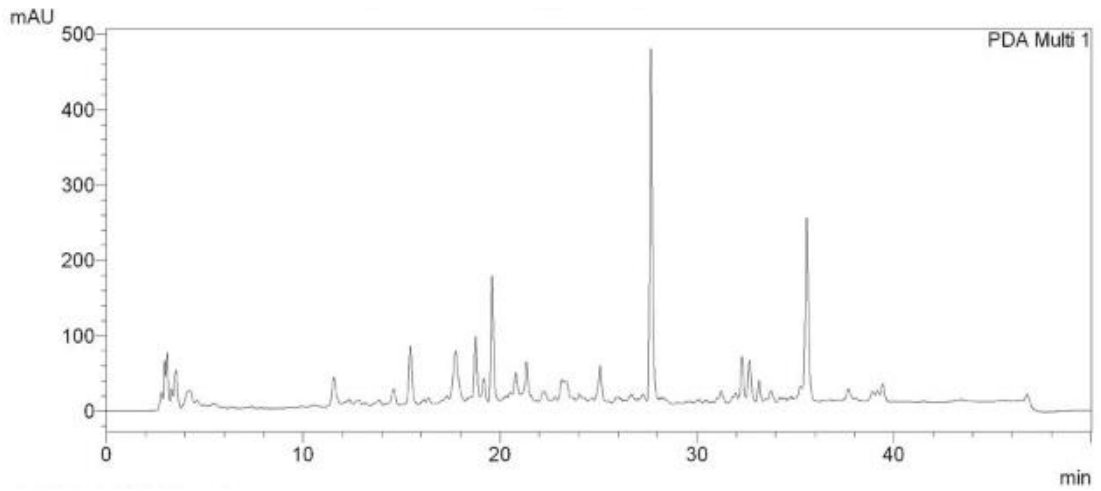
EK 20. NS22 (*L. cardiaca*) metanol ekstresinin PDA Kromatogramı (280 nm)



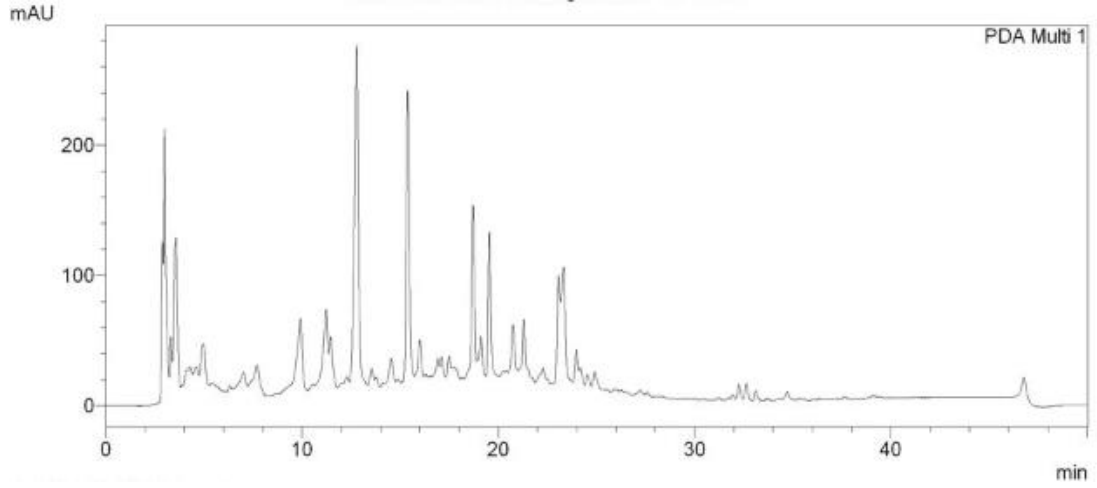
EK 21. NS22 (*L. cardiaca*) infüzyon PDA Kromatogramı (280 nm)



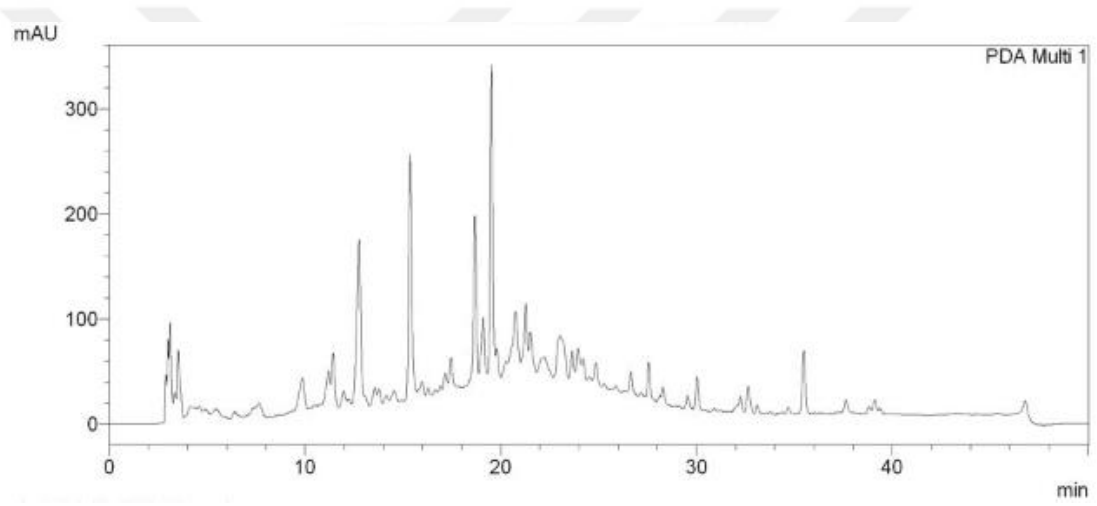
EK 22. NS23 (*L. cardiaca*) etanol ekstresinin PDA Kromatogramı (280 nm)



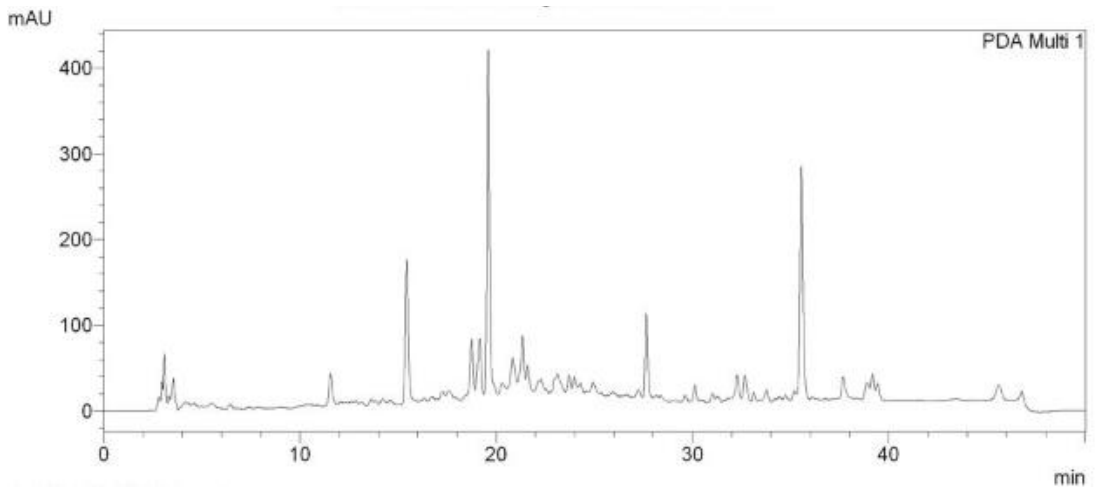
EK 23. NS23 (*L. cardiaca*) metanol ekstresinin PDA Kromatogramı (280 nm)



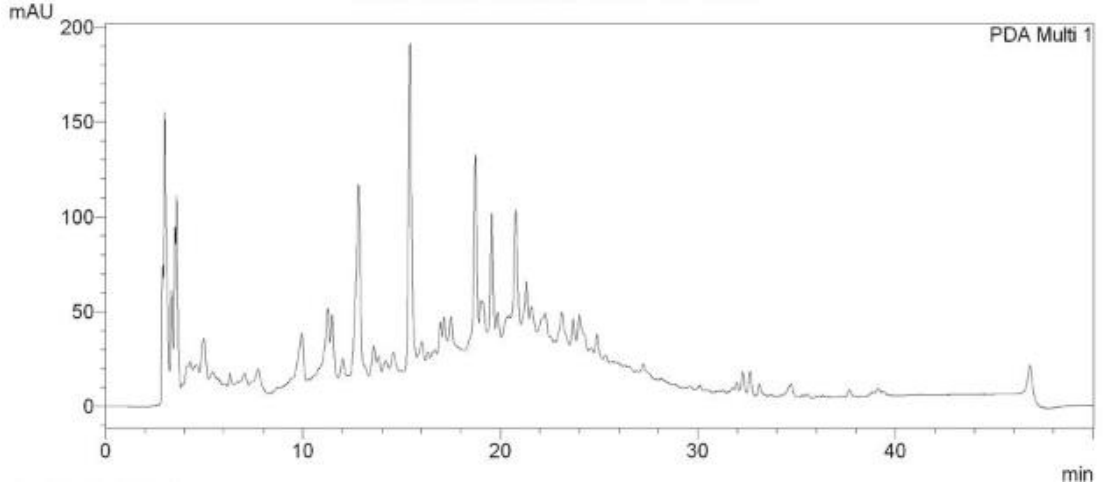
EK 24. NS23 (*L. cardiaca*) infüzyon PDA Kromatogramı (280 nm)



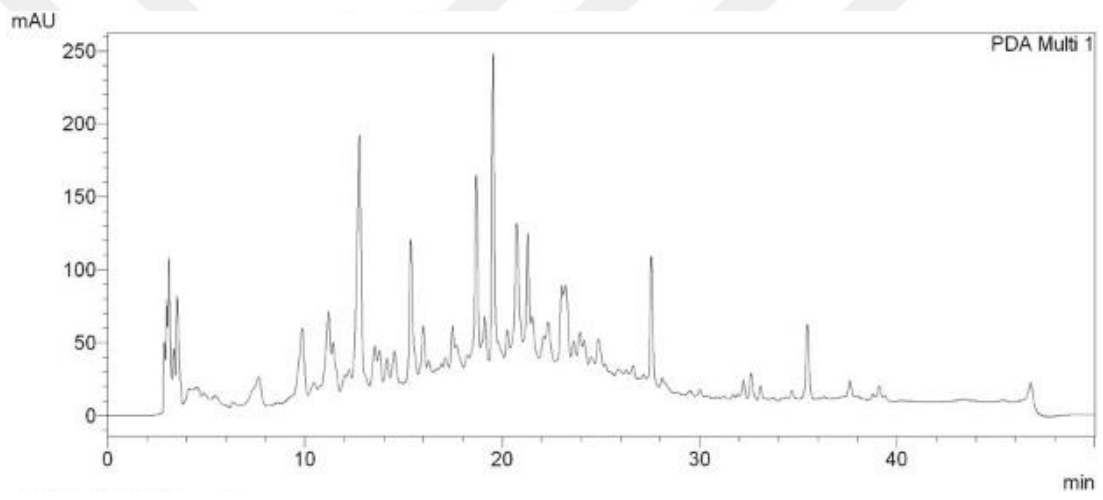
EK 25. NS24 (*L. cardiaca*) etanol ekstresinin PDA Kromatogramı (280 nm)



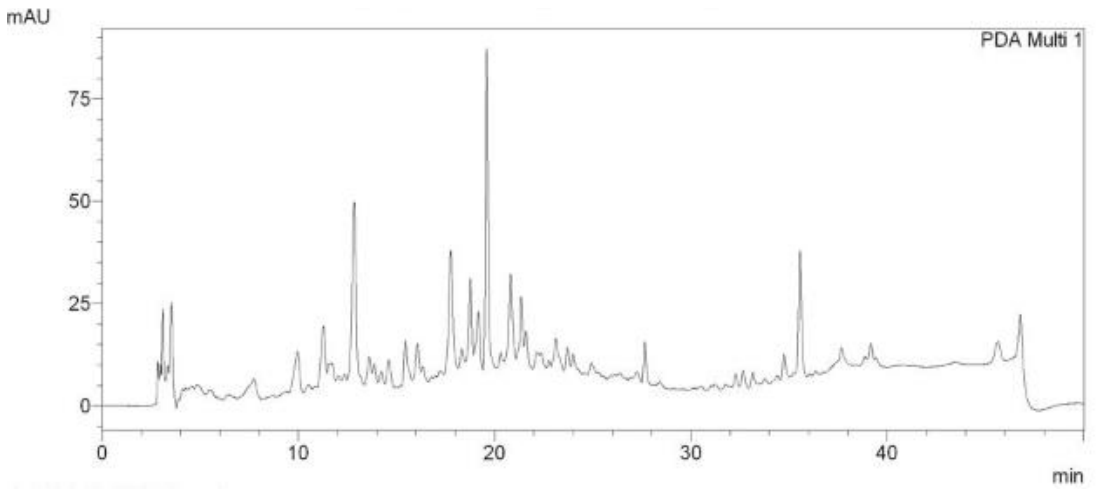
EK 26. NS24 (*L. cardiaca*) metanol ekstresinin PDA Kromatogramı (280 nm)



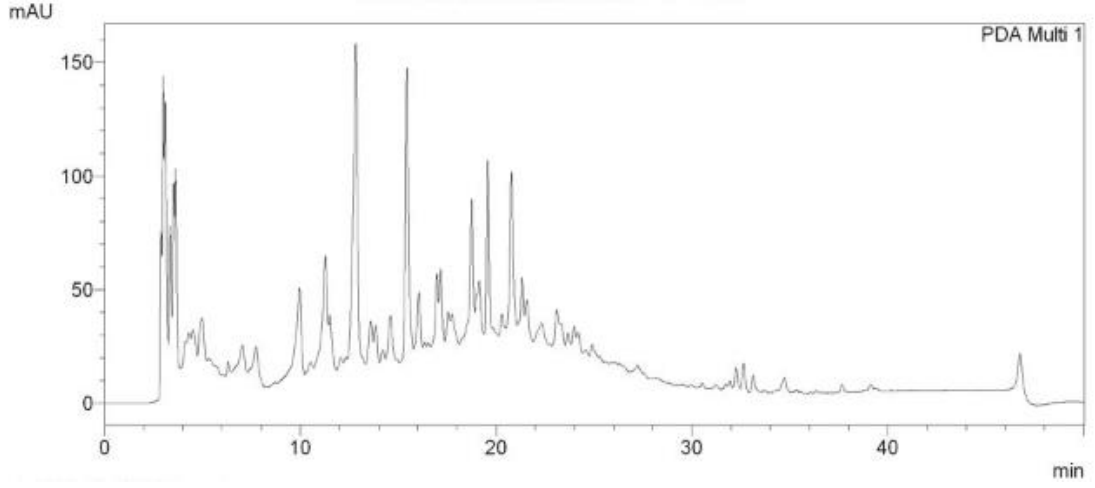
EK 27. NS24 (*L. cardiaca*) infüzyon PDA Kromatogramı (280 nm)



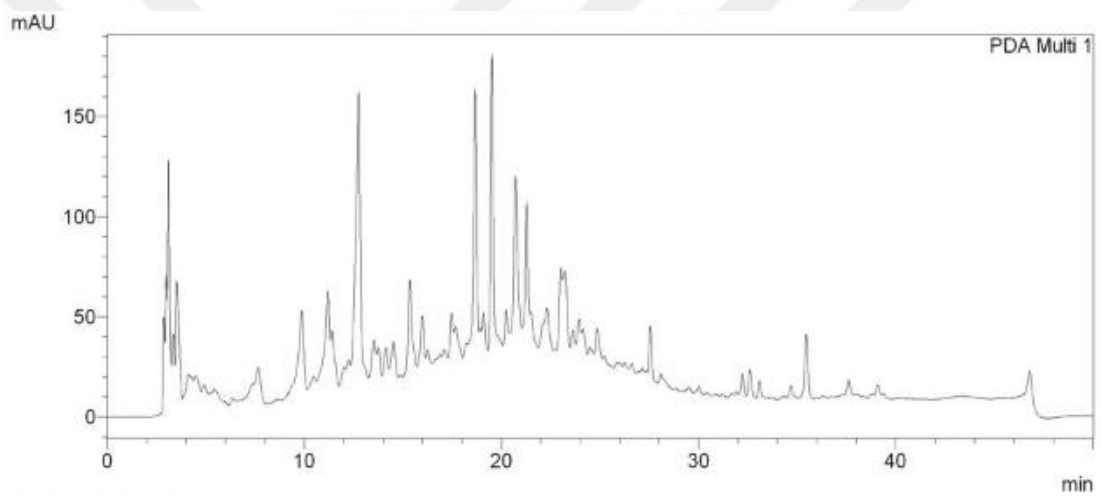
EK 28. NS27 (*L. cardiaca*) etanol ekstresinin PDA Kromatogramı (280 nm)



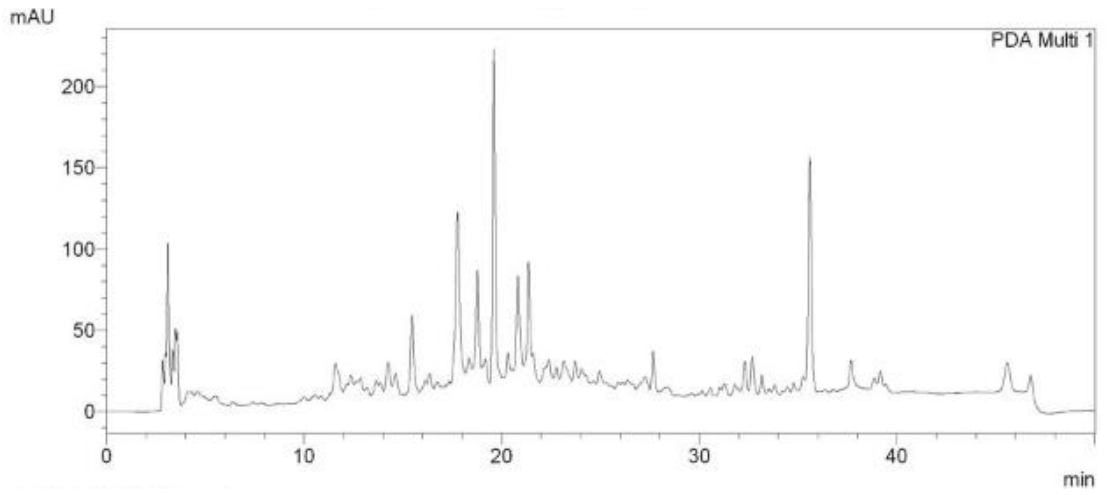
EK 29. NS27 (*L. cardiaca*) metanol ekstresinin PDA Kromatogramı (280 nm)



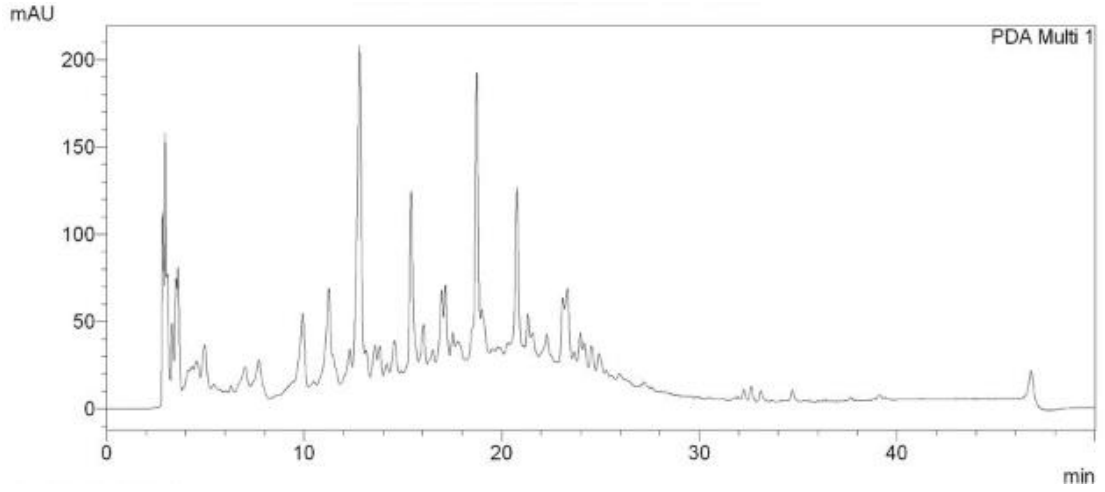
EK 30. NS27 (*L. cardiaca*) infüzyon PDA Kromatogramı (280 nm)



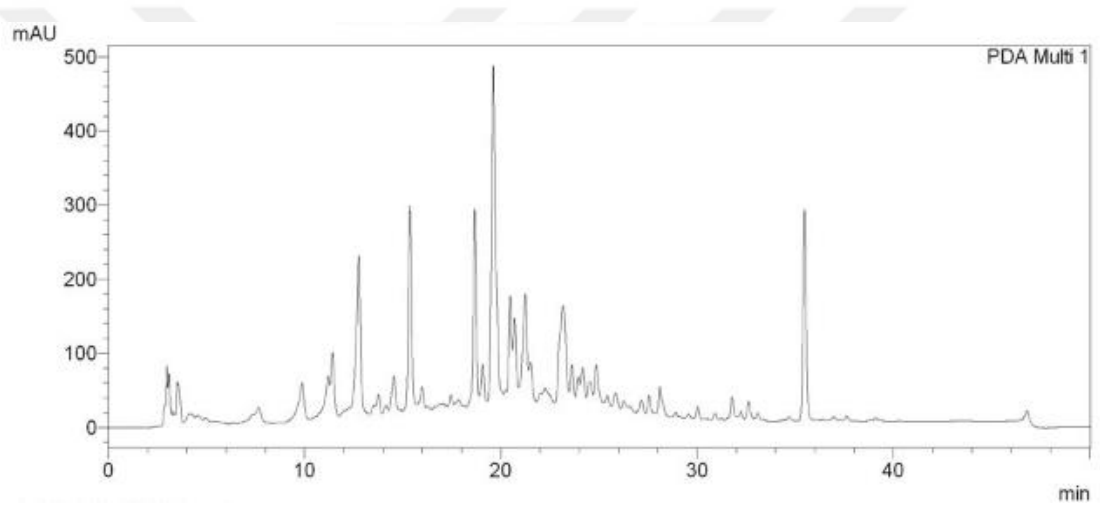
EK 31. NS28 (*L. cardiaca*) etanol ekstresinin PDA Kromatogramı (280 nm)



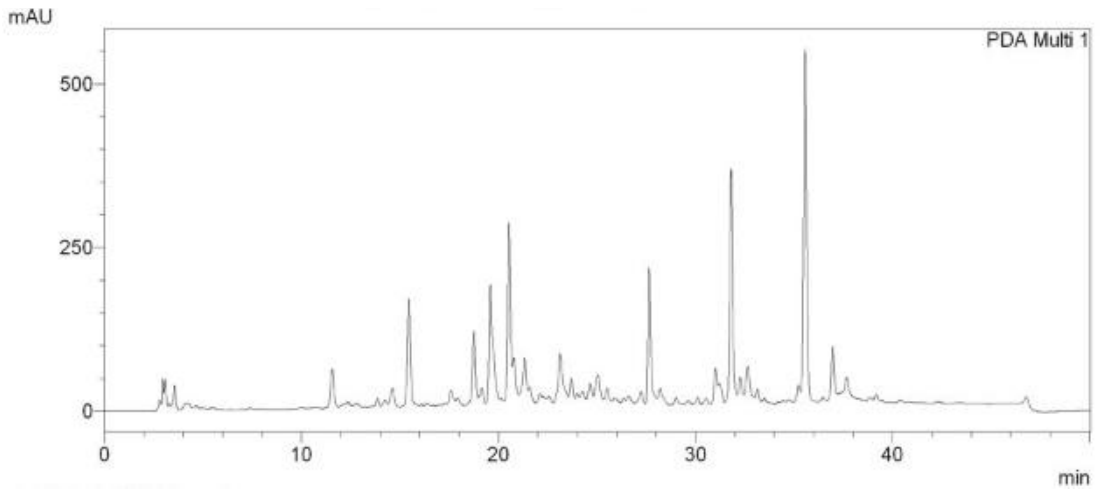
EK 32. NS28 (*L. cardiaca*) metanol ekstresinin PDA Kromatogramı (280 nm)



EK 33. NS28 (*L. cardiaca*) infüzyon PDA Kromatogramı (280 nm)



EK 34. NS25 (*L. persicus*) etanol ekstresinin PDA Kromatogramı (280 nm)



EK 35. NS25 (*L. persicus*) metanol ekstresinin PDA Kromatogramı (280 nm)

