

T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**BAZI *TRIFOLIUM* L. TÜRLERİ ÜZERİNDE
FARMAKOGNOZİK ARAŞTIRMALAR**

Ecz. Gülin RENDA

Farmakognozi Programı
DOKTORA TEZİ

Ankara
2010

T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**BAZI *TRIFOLIUM* L. TÜRLERİ ÜZERİNDE
FARMAKOGNOZİK ARAŞTIRMALAR**

Ecz. Gülin RENDA

Farmakognozi Programı
DOKTORA TEZİ

TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. Tayfun Ersöz

2. DANIŞMAN
Prof. Dr. İhsan Çalış

Ankara
2010

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne;

Bu çalışma jürimiz tarafından Farmakognozi Programında Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı:

Prof. Dr. L. Ömür Demirezer
Hacettepe Üniversitesi



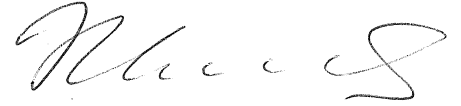
Tez Danışmanı:

Prof. Dr. Tayfun Ersöz
Hacettepe Üniversitesi



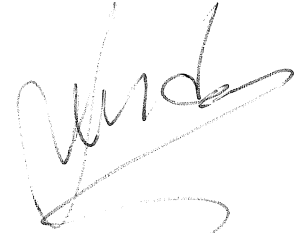
Üye:

Prof. Dr. Serdar Uma
Hacettepe Üniversitesi



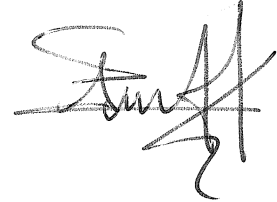
Üye:

Doç. Dr. Funda N. Yalçın
Hacettepe Üniversitesi



Üye:

Doç. Dr. Esra Küpeli Akkol
Gazi Üniversitesi



ONAY:

Bu tez, Hacettepe Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliği'nin ilgili maddeleri uyarınca, yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve Enstitü Yönetim Kurulu'nun kararıyla kabul edilmiştir.



Prof. Dr. Hakan S. Orer
Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Tez çalışmam sırasında bana her konuda destek olan, bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım değerli danışman hocalarım Prof. Dr. İhsan Çalış ve Prof. Dr. Tayfun Ersöz'e teşekkür ederim.

Çalışmamın her aşamasında yol gösterici olan, destek ve ilgisini esirgemeyen Doç. Dr. Funda N. Yalçın'a teşekkür ederim.

Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmakognozi Anabilim Dalı imkanlarından faydalanmamı sağlayan Anabilim Dalı eski başkanı Prof. Dr. L. Ömür Demirezer'e ve şu anki başkanı Prof. Dr. İclal Saraçoğlu'na teşekkür ederim.

Çalışmamın analitik kısmına verdiği destekten ötürü Dr. Ecz. Emirhan Nemutlu'ya (H. Ü. Ecz. Fak. Analitik Kimya Anabilim Dalı); çalışmamda kullandığım standartları sağlayan Prof. Dr. Sansei Nishibe (Sapporo, Japonya) ve Prof. Dr. Hiroji Ina'ya (Eczacılık ve Yaşam Bilimleri Tokyo Üniversitesi, Eczacılık Okulu); kullanılan bitkisel materyalin toplanmasındaki katkılarından ötürü Dr. Ecz. Didem Şöhretoğlu'na ve teşhisindeki katkılarından ötürü Yrd. Doç. Dr. M. Erkan Uzunhisarcıklı'ya (Gazi Ü. Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü) teşekkür ederim.

Aromataz enzim inhibitör etki çalışmalarına verdiği destekten ötürü Doç. Dr. E. Pelin Kelicen'e (H. Ü. Ecz. Fak. Farmakoloji Anabilim Dalı) ve Uzm. Ecz. Mehtap Cincioğlu'na (H. Ü. Ecz. Fak. Farmakoloji Anabilim Dalı); yara iyi edici aktivite çalışmalarına verdiği destekten ötürü Doç. Dr. Esra Küpeli Akkol'a (Gazi Ü. Ecz. Fak. Farmakognozi Anabilim Dalı) ve Uzm. Ecz. İpek Peşin'e (Gazi Ü. Ecz. Fak. Farmakognozi Anabilim Dalı) teşekkür ederim.

Tüm çalışmam boyunca desteklerini esirgemeyen H. Ü. Eczacılık Fakültesi Farmakognozi ve Farmasötik Botanik Anabilim Dallarına mensuplarına teşekkür ederim.

Eğitim hayatımın her aşamasında gösterdikleri fedakarlık, hoşgörü ve güven için aileme, tez çalışmam boyunca sabrı ve desteğiyle yanımda olduğu için eşime teşekkür ederim.

ÖZET

Renda, G., Bazı *Trifolium* L. türleri Üzerinde Farmakognozik Araştırmalar, Hacettepe Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Farmakognози programı, Doktora Tezi, Ankara 2010. *Trifolium* türleri, Türkiye’de ve dünyanın değişik yerlerinde halk ilacı olarak kullanılmaktadır. Bu çalışmada Türkiye’nin değişik bölgelerinden toplanan *Trifolium ambiguum*, *T. arvense* var. *arvense*, *T. campestre*, *T. canescens*, *T. hybridum* var. *anatolicum*, *T. hybridum* var. *hybridum*, *T. pannonicum*, *T. pratense* var. *pratense*, *T. purpureum* var. *purpureum*, *T. repens* var. *repens*, *T. resupinatum* var. *microcephalum*, *T. spadiceum*, *T. trichocephalum* türlerinin daidzein, genistein, formononetin ve biokanin A izoflavonoitlerine ait miktar tayinleri YBSK ile yapılmıştır. Daidzein en fazla oranda *T. trichocephalum*’da, genistein en fazla oranda *T. canescens*’de, formononetin en fazla oranda *T. pratense* var. *pratense*’de; biokanin A ise en fazla oranda *T. canescens*’de bulunmuştur. Toplam izoflavonoit miktarı (4 izoflavon bileşiği açısından) göz önüne alındığında *T. canescens* en zengin tür olarak değerlendirilmiş; dolayısıyla da *T. pratense*’ye alternatif olabilecek tür olarak belirlenmiştir. Ayrıca izoflavonoit miktarı fazla olan 3 tür için aromataz inhibitör etki araştırılmıştır. Bunun yanı sıra izoflavonoit içeriği yüksek olan *Trifolium* L. türlerinden hazırlanan ekstrelerin yara iyileştirici etkileri, fare ve sıçanlarda dairesel eksizyon ve çizgisel insizyon yara modelleri kullanılarak değerlendirilmiştir.

Anahtar kelimeler: *Trifolium* türleri, izoflavonoitler, yara iyileştirici etki, aromataz enzim inhibisyonu, YBSK.

ABSTRACT

Renda, G., Pharmacognostical Investigations on Some *Trifolium* L. species, Hacettepe University, Institute of Health Sciences, Pharmacognosy Programme, Ph. D. Thesis, Ankara 2010. *Trifolium* species are used in traditional medicine in Turkey and worldwide. In this study, *Trifolium ambiguum*, *T. arvense* var. *arvense*, *T. campestre*, *T. canescens*, *T. hybridum* var. *anatolicum*, *T. hybridum* var. *hybridum*, *T. pannonicum*, *T. pratense* var. *pratense*, *T. purpureum* var. *purpureum*, *T. repens* var. *repens*, *T. resupinatum* var. *microcephalum*, *T. spadiceum*, *T. triocephalum* collected from different regions of Turkey, were investigated to determine the isoflavone contents of daidzein, genistein, formononetin, biochanin A by HPLC. Highest amount of daidzein is found in *T. trichocephalum*, genistein in *T. canescens*, formononetin in *T. pratense* var. *pratense* and biochanin A in *T. canescens*. Since *T. canescens* is the richest species from the view point of four isoflavone concentrations, therefore *T. canescens* could be considered as an alternative species to *T. pratense*. On the other hand, three species with the high isoflavone concentration, were investigated for their aromatase inhibitory activity. In addition, wound healing activity was evaluated by linear incision and circular excision wound models on rats and mice, in the extracts prepared from some *Trifolium* L. species, rich in isoflavonoid content.

Keywords: *Trifolium* species, isoflavonoids, wound healing activity, aromatase enzyme inhibition, HPLC.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ONAY SAYFASI	iii
TEŞEKKÜR	iv
ÖZET	v
ABSTRACT	vi
İÇİNDEKİLER	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR	x
ŞEKİLLER DİZİNİ	xii
TABLolar DİZİNİ	xiii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Botanik Bilgiler	4
2.1.1. Fabaceae Familyası	4
2.1.2. Trifolieae Bronn. Tribusu	5
2.1.3. <i>Trifolium</i> L. Cinsi	5
2.1.3.1. <i>Trifolium repens</i> L.	16
2.1.3.2. <i>Trifolium ambiguum</i> Bieb.	17
2.1.3.3. <i>Trifolium hybridum</i> L.	18
2.1.3.4. <i>Trifolium spadiceum</i> L.	20
2.1.3.5. <i>Trifolium campestre</i> Schreb.	21
2.1.3.6. <i>Trifolium resupinatum</i> L.	24
2.1.3.7. <i>Trifolium pratense</i> L.	25
2.1.3.8. <i>Trifolium canescens</i> Willd.	28
2.1.3.9. <i>Trifolium trichocephalum</i> Bieb.	29
2.1.3.10. <i>Trifolium pannonicum</i> Jacq.	30
2.1.3.11. <i>Trifolium arvense</i> L.	32

	Sayfa
2.1.3.12. <i>Trifolium purpureum</i> Lois.	33
2.2. <i>Trifolium</i> Türleri Üzerinde Yapılan Çalışmalar	41
2.2.1. Fitokimyasal Çalışmalar	41
2.2.1.1. Basit Fenolik Bileşikler ve Flavonoitler	41
2.2.1.2. İzoflavonoitler	45
2.2.1.3. Kumarinler	50
2.2.1.4. Saponinler	52
2.2.1.5. Lipitler	55
2.2.1.6. Steroitler	56
2.2.1.7. Uçucu Bileşikler	57
2.2.1.8. Siyanogenetik Glikozitler	58
2.2.1.9. Megastigman Glikozitleri	59
2.2.1.10. Diğerleri	61
2.2.1.11. İzoflavonoitlerin Stabilitesi ve İzolasyon Teknikleri ile İlgili Çalışmalar	61
2.2.1.12. <i>Trifolium</i> İzoflavonoitlerinin Miktar Tayini Çalışmaları	64
2.2.2. <i>Trifolium</i> Türlerinin Kullanılışları ve Biyolojik Etkileri	66
2.2.2.1. Kullanılış	66
2.2.2.2. Biyolojik Etkiler	70
2.2.2.3. Biyoyararlanımı	90
2.2.2.4. Kullanım Dozu	91
2.2.2.5. Yan Etkileri	92
2.2.2.6. Etkileşimleri	92
2.2.2.7. Kontrendikasyonları	93
3. GEREÇ ve YÖNTEM	94
3.1. Fitokimyasal Çalışmalar	94

	Sayfa
3.1.1. Bitkisel Materyal	94
3.1.2. Kromatografik Yöntemler	95
3.1.3. Kullanılan Aletler	95
3.1.5. Kimyasal Maddeler ve Standartlar	95
3.1.6. Ticari Numuneler	96
3.1.7. Ekstraksiyon ve Hidroliz Çalışmaları	97
3.1.8. YBSK Çalışmaları	98
3.2. Aktivite Çalışmaları	99
3.2.1. Yara İyileştirici Aktivite Tayini	99
3.2.2. Aromataz Enzim İnhibitör Etki Tayini	101
4. BULGULAR	103
4.1. Fitokimyasal Çalışmalara Ait Bulgular	103
4.1.1. Sistem Uygunluk Çalışması	103
4.1.2. Duyarlılık	103
4.1.3. Doğrusallık	104
4.1.4. Tekrarlanabilirlik	107
4.1.5. Seçicilik	108
4.1.6. Numune Analizi	108
4.2. Aktivite Çalışmalarına Ait Bulgular	119
4.2.1. Yara İyileştirici Aktivite	120
4.2.2. Aromataz Enzim İnhibitör Etki	122
5. TARTIŞMA	123
6. SONUÇ ve ÖNERİLER	127
KAYNAKLAR	129
ÖZGEÇMİŞ	148

SİMGELER VE KISALTMALAR

AEF	: Ankara Ü. Ecz. Fak. Herbaryumu
AUF	: Ankara Üniversitesi Herbaryumu
BSS	: Bağlı standart sapma
c	: yaklaşık
dk	: dakika
DMSO	: Dimetilsülfoksit
ER	: Östrojen reseptörü
FSH	: Folikül Stimüle Edici Hormon
g	: gram
GAZİ	: Gazi Üniversitesi Herbaryumu
HDL	: High Density Lipoprotein
HÜEF	: Hacettepe Ü. Ecz. Fak. Herbaryumu
İTK	: İnce Tabaka Kromatografisi
LDL	: Low Density Lipoprotein
LOD	: Limit of detection
LpA	: Lipoprotein A
LOQ	: Limit of quantification
MAE	: Mikrodalga destekli ekstraksiyon
MeOH	: Metanol
mg	: miligram
MS	: Mass
µg	: mikrogram
µL	: mikrolitre
nm	: nanometre
O-DMA	: o-desmetilangolensin
ppm	: parts per million

SS : Standart Sapma

UV : Ultraviyole

YBSK : Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi

U-YBSK : Ultra Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi

ŞEKİLLER

	Sayfa
Şekil 1a. İzoflavonoit standartlarının YBSK kromatogramı	106
Şekil 1b. İzoflavonoit standartlarının UV kromatogramı	106
Şekil 2. <i>T. ambiguum</i> ekstresinin YBSK kromatogramı	110
Şekil 3. <i>T. arvense</i> var. <i>arvense</i> ekstresinin YBSK kromatogramı	110
Şekil 4. <i>T. campestre</i> ekstresinin YBSK kromatogramı	111
Şekil 5. <i>T. canescens</i> ekstresinin YBSK kromatogramı	111
Şekil 6. <i>T. hybridum</i> var. <i>anatolicum</i> ekstresinin YBSK kromatogramı	112
Şekil 7. <i>T. hybridum</i> var. <i>hybridum</i> ekstresinin YBSK kromatogramı	112
Şekil 8. <i>T. pannonicum</i> ekstresinin YBSK kromatogramı	113
Şekil 9. <i>T. pratense</i> var. <i>pratense</i> (A) ekstresinin YBSK kromatogramı	113
Şekil 10. <i>T. pratense</i> var. <i>pratense</i> (G) ekstresinin YBSK kromatogramı	114
Şekil 11. <i>T. purpureum</i> var. <i>purpureum</i> ekstresinin YBSK kromatogramı	114
Şekil 12. <i>T. repens</i> var. <i>repens</i> ekstresinin YBSK kromatogramı	115
Şekil 13. <i>T. resupinatum</i> var. <i>microcephalum</i> ekstresinin YBSK kromatogramı	115
Şekil 14. <i>T. spadiceum</i> ekstresinin YBSK kromatogramı	116
Şekil 15. <i>T. trichocephalum</i> ekstresinin YBSK kromatogramı	116

	Sayfa
Şekil 16. TN-1 ekstresinin YBSK kromatogramı	117
Şekil 17. TN-2 ekstresinin YBSK kromatogramı	117
Şekil 18. TN-3 ekstresinin YBSK kromatogramı	118
Şekil 19. TN-4 ekstresinin YBSK kromatogramı	118

TABLÖLAR

	Sayfa
Tablo 1. <i>T. repens</i> 'ten elde edilen flavonol glikozitleri	42
Tablo 2a. <i>T. repens</i> 'ten doğal olarak elde edilen flavonoidler	43
Tablo 2b. <i>T. repens</i> 'ten doğal olarak elde edilen flavonoidler	43
Tablo 3a. <i>T. pratense</i> , <i>T. repens</i> , <i>T. dubium</i> ve <i>T. corniculatus</i> yapraklarından elde edilen flavonoidler	44
Tablo 3b. <i>T. pratense</i> , <i>T. repens</i> , <i>T. dubium</i> ve <i>T. corniculatus</i> yapraklarından elde edilen flavonoller	44
Tablo 4a. <i>T. pratense</i> 'den elde edilen izoflavonoidler	47
Tablo 4b. <i>T. pratense</i> 'den elde edilen izoflavonoid glikozitleri	48
Tablo 5. <i>T. pratense</i> , <i>T. repens</i> , <i>T. dubium</i> ve <i>T. corniculatus</i> yapraklarından izole edilen bazı izoflavonoidler	49
Tablo 6. Gradient elüsyon basamakları	98
Tablo 7. İzoflavonoidler için elde edilen sistem uygunluk parametreleri	103
Tablo 8. İzoflavonoidlerin LOD ve LOQ değerleri	103

	Sayfa
Tablo 9. Standartların kalibrasyon eğrilerine ait veriler	104
Tablo 10. İzoflavonoitlerin DMSO'ya eklenmiş numunelerdeki kalibrasyon eğrilerine ait veriler	105
Tablo 11. Gün içi kesinlik ve doğruluk verileri	107
Tablo 12. Günler arası kesinlik ve doğruluk verileri	107
Tablo 13. Bitki numune ekstrelerindeki izoflavon miktarları	108
Tablo 14. Preparat numune ekstrelerindeki izoflavon miktarları	109
Tablo 15. Türkiye'de yetişen bazı <i>Trifolium</i> L. türlerinden hazırlanan ekstrelerin çizgisel insizyon yara modeli üzerindeki etkileri	119
Tablo 16. Türkiye'de yetişen bazı <i>Trifolium</i> L. türlerinden hazırlanan ekstrelerin dairesel eksizyon yara modeli üzerindeki etkileri	120
Tablo 17. <i>Trifolium</i> L. türlerinden hazırlanan ekstrelerin aromataz enzimi üzerine etkileri	122

1. GİRİŞ

Trifolium cinsi dünyada 300 civarında, Türkiye’de ise 96 türle temsil edilmektedir. Bu geniş yayılışlarıyla bağlantılı olarak *Trifolium* türlerinin dünyanın birçok yerinde geniş bir kullanım alanı vardır (29, 39, 40, 159, 160).

Ülkemizde genel olarak “yonca” adıyla bilinen *Trifolium* türlerinin toprak üstü kısımları, zengin protein içerikleri nedeniyle yem bitkisi olarak kullanılır. Bunun yanı sıra *T. pratense* çiçekleri halk arasında balgam söktürücü, antiseptik, yara iyi edici ve yatıştırıcı olarak; *T. arvense* kabız yapıcı olarak; *T. repens*’in çiçekli dalları ise kuvvet verici ve romatizma ağrılarını dindirici olarak kullanılır (15, 132).

Trifolium türlerinin dünya genelinde de benzer kullanım alanları vardır. Çeşitli kaynaklarda haricen, kronik deri hastalıklarında, egzama ve sedefte yara iyileştirici olarak kullanıldıkları; dahilen, antiastmatik, antidiyabetik, antiseptik, antitussif, diüretik ve mukoza sekresyonunu düzenleyici amaçlarla kullanıldıkları; anne sütünü artırıcı etkilerinin olduğu; romatizmal ağrıları gidermenin yanı sıra kanserde, meme iltihabında, sarılıkta, menopozal ve premenstrüel semptomlarda da kullanıldıkları bildirilmiştir (5, 41, 48, 79, 82, 89, 95).

Trifolium türleriyle beslenen hayvanların doğurganlığının azalması ve süt seviyelerindeki değişiklik dikkat çekmiş ve yapılan araştırmalar sonucunda bu hastalığa *Trifolium* türlerindeki östrojenik izoflavonların sebep olduğu bulunmuştur (156).

İzoflavonca zengin bitkilerle beslenen Uzakdoğu ülkelerinde, Batılı ülkelere oranla kalp hastalıkları, osteoporoz, meme kanseri, prostat kanseri ve menopozal semptomların daha az görüldüğü ve bu hastalıkların riskinin az olduğu toplumlardaki bireylerin idrar örneklerinde yüksek fitoöstrojen seviyeleri bulunduğu tespit edilmiştir (20).

Trifolium türlerinin kimyasal yapısında flavonoit türü bileşikler ve özellikle de izoflavonlar ön plana çıkmaktadır. Fitoöstrojenik izoflavonlar

difenolik östrojenlere yapısal olarak benzeyen bitkisel kaynaklı moleküllerdir. Bu benzerlik nedeniyle doğrudan östrojen reseptörlerine bağlanarak, östrojenden sorumlu gen ekspresyon cevabını düzenlerler. Fitoöstrojenlerin zayıf östrojenik aktiviteleri nedeniyle, endojen östrojenlerle yarışmalarının yanı sıra, 5- α -redüktaz, aromataz tirozin-spesifik protein kinaz enzimlerini ve angiogenezi inhibe ettikleri öne sürülmüştür (23, 77, 134).

Östrojen benzerlikleri nedeniyle östrojen reseptörlerine bağlanan, östrojen agonisti gibi davranan ve zayıf östrojenik aktivite gösteren izoflavonoitler, bu etkilerine bağlı olarak menopozla ilişkilendirilen sıcak basması gibi şikayetleri azaltır, meme tümörlerine ve diğer bazı kanser türlerine karşı koruyucu olarak kullanılabilirler (41, 105). Nitekim daidzein, genistein, formononetin ve biokanin A izoflavonlarını taşıdığı belirlenen *Trifolium pratense* bitkisinin toprak üstü kısımlarından hazırlanan ekstreler gerek yurt dışında ve gerekse ülkemizde benzer amaçlarla kullanılmaktadır.

Ülkemiz bitki örtüsünde *Trifolium* cinsinin 13'ü endemik 130 taksonu bulunmaktadır (29, 40, 160). Çalışmamızda *Trifolium pratense* türüne alternatif olarak kullanılabilecek *Trifolium* türlerini belirlemek için, Türkiye'nin çeşitli bölgelerinden toplanan 13 *Trifolium* türünün toprak üstü kısımlarında bulunan daidzein, genistein, formononetin ve biokanin A izoflavonoitlerinin YBSK ile miktar tayinlerinin yapılması ve türlerin bu yönden karşılaştırılmaları; bunun yanı sıra Avrupa'da ve Türkiye'de kullanılan, *Trifolium* türlerinden hazırlanan ekstreleri içeren preparatlarda bulunan daidzein, genistein, formononetin ve biokanin A izoflavonoitlerinin YBSK ile miktar tayinlerinin yapılması ve önerilen kullanım alanlarının değerlendirilmesi hedeflenmiştir.

Trifolium türlerinin halk arasındaki kullanılışlarına dayanılarak östrojenik etki, sitotoksik etki, antikanser etki, antifungal etki, antioksidan etki gibi birçok aktivite denenmiştir. Bu deneyler sonucunda *Trifolium* türleri çeşitli derecelerde aktif bulunmuştur (20, 38, 76, 93, 96, 103, 128). Yapılan literatür araştırmasında *Trifolium* türlerinin yara iyileştirici etkilerine ve birçok kullanım ile etkisine açıklık getirebilecek aromataz enzim inhibisyonu etkilerinin test

edilmediği gözlenmiştir. Aromataz, östrojen biyosentezinde yer alan anahtar bir moleküldür. Aromataz enzim kompleksi, ovaryum, testis, plasenta, beyin ve adipoz doku dahil olmak üzere pek çok dokuda androjenlerin östrojenlere dönüşümünü katalizler. Aromataz enziminin inhibisyonu periferdeki androjenlerin östrojene dönüşümünü önemli ölçüde azaltarak kanda dolaşan östrojen seviyesinin %90'dan fazla azalmasına neden olur (13). Aromataz inhibitörleri özellikle postmenopozal kadınlarda, meme kanseri, endometriyozis, endometrium ve yumurtalık kanserinde androstenedionun östrona dönüşümünü inhibe etmek suretiyle östrojen seviyesini azaltarak tümör hücrelerinin proliferasyonunu önler (27). Fitoöstrojenlerin olası etki mekanizmalarından bir tanesinin de aromataz inhibisyonu olabileceği ileri sürülmüştür (66). Bu nedenle bu çalışmada, çalışma konusu olarak seçilen *Trifolium* türlerinin izoflavonoit içeriklerine yönelik çalışmaların yanı sıra yara iyileştirici etkileri ve aromataz enzim inhibisyonu özelliklerinin de bilimsel olarak kanıtlanması amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Botanik Bilgiler

2.1.1. Fabaceae Familyası

Otsu veya odunsu bitkiler. Yapraklar alternan, genellikle stipulalı, bipennat, basitçe pennat, dijitat, trifoliat veya basit. Çiçekler aktinomorf veya zigomorf, hipogin veya bazen perigin, genellikle erdişi ve salkım, başak veya şemsiye durumunda veya tek. Sepaller (4-)5, tek sepal her zaman önde. Petaller (1-)5, tomurcuk durumunda valvat veya imbrikat, serbest veya nadiren kısmen tepeleri birbirine yaklaşmış. Stamenler 4-çok, genellikle 10, hepsi bir tüp şeklinde birleşik (monodelf) veya üstteki stamen serbest (diadelf) veya hepsi serbest. Karpel 1 tane, üst durumlu, plasentalanma marjinal. Meyve legümen, tohum 1- çok sayıda (39).

Dünya üzerinde yaklaşık 630 cins ve 18000 türle temsil edilen Fabaceae familyası 3 alt familyaya ayrılır (39, 146, 160).

1) Caesalpinioideae (Syn: Caesalpiaceae): Çoğunlukla odunsu bitkiler. Yapraklar imparipennat, bazen bipennat veya basittir. Çiçekler zigomorf. Petaller tomurcukta yükselici veya imbrikat dizilişli, her iki yanda komşu petaller en üstte örtüşmüş durumda, nadiren petalsız. Stamenler serbest, 5-10 adet.

2) Mimosoideae (Syn: Mimosaceae): Çoğunlukla odunsu bitkiler. Yapraklar bipennat veya fillodik. Petaller tomurcukta kenarları ile birbirine değeri durumda. Stamenler serbest 4 veya çok. Tohumlar U şeklinde bir yan çizgiyle birlikte; tohumda embriyo kökcüğü dik.

3) Papilionoideae (Syn: Papilionaceae): ^a Otsu veya odunsu bitkiler. Yapraklar paripennat, imparipennat, dijitat, trifoliat veya tek, nadiren fillodik. Çiçekler zigomorf. Petaller tomurcukta alçalan-kiremitsi. En üst bayrakçık komşu

iki kanatçıkla birlikte, iki alt petal kayıkçık oluşturacak şekilde; korolla nadiren bayrakçığa indirgenmiş. Stamenler (5-)10 adet, monadelf veya diadelf, nadiren serbest. Tohumlar genellikle bir yan çizgiyle birlikte değil; tohumda bazen embriyonun kökçüğü içeri doğru kıvrılmış. Bu alt familyanın 18 tribusu vardır.

^a *Trifolium* cinsi bu alt familyaya dahildir.

2.1.2. Trifolieae Bronn. Tribusu ^b

Tek yıllık veya çok yıllık otsu bitkiler. Yapraklar trifoliat veya nadiren dijitat; stipulalar serbest veya yaprak sapına yapışık. Çiçekler şemsiye, salkım veya başak durumunda, nadiren tek. Stamenler diadelf; anterler birbirinin aynı şekilde. Stilus çıplak. Meyve kaliksin içinde veya dışarı uzamış, düz veya yüzeyi desenli, açılmayan, ovoid veya helezon şeklinde kıvrık, nadiren toprak altında olgunlaşan, düz, açılan veya kıvrık legümen; tohumlar strofiolsüz (159).

^b *Trifolium* cinsi bu tribusa dahildir.

2.1.3. *Trifolium* L. Cinsi

Tek veya çok yıllık otsu bitkiler. Yapraklar trifoliat veya nadiren dentat kenarlı 5-9 yaprakçık taşıyan bir dijitat. Stipulalar belirgin, genellikle tam, yaprak sapı ile birleşik. Çiçekler sapsız veya saplı başlar veya kısa salkımlar halinde. Nadiren tek, brakteli veya braktesiz. Kaliks değişken, bazen zamanla büyüyen, sert veya şişkin. Kaliks boğazı açık veya iki dudaklı sert bir şişkinlik ile kapalı. Kaliks dişleri eşit veya değil. Korolla pembe, kırmızıdan mora, beyaz veya sarı, genellikle kalıcı. Stamenler diadelf. Legümen genellikle kaliksin içinde, çoğu zaman açılmayan meyve, 1-2(-10) tohumlu (159).

Dünya üzerinde 300 civarında, Türkiye’de ise 96 *Trifolium* türü yetişmektedir. Türkiye’de yetişen endemik takson sayısı 13’tür (29, 40, 146, 159, 160).

Endemik taksonlar; *T. euxinum*, *T. barbulatum*, *T. pachycalyx*, *T. aintabense*, *T. longidentatum*, *T. davisii*, *T. caudatum*, *T. pannonicum* subsp. *elongatum*, *T. roussaeum*, *T. apertum* var. *kilaeum*, *T. chlorotrichum*, *T. rhizomatosum*, *T. pulchellum*, *T. batmanicum*'dur (40, 159).

Türkiye Bitki Örtüsünde Yetişen *Trifolium* Türleri İçin Tayin Anahtarı (159)

1. Çiçek durumu, 2-15 korollalı ve birçok verimsiz korollasız çiçekle birlikte

G. Sect. Trichocephalum

1. Çiçek durumu sadece korollalı çiçeklerle birlikte

2. Yapraklar 5-7 yaprakçıklı

1. polyphyllum

2. Yapraklar 3 yaprakçıklı

3. Çiçek durumu 1-2(-3) çiçekli; legümen dışarı çok uzamış (Sect. *Cryptosciadium*)

2. uniflorum

3. Çiçek durumu baş şeklinde veya umbellalı, 5 veya çok çiçekli; legümen hiç uzamamış veya sadece biraz dışarı uzamış

4. Bayrakçık kaşık veya bot şeklinde; ovaryum saplı; kaliks tüpü 5 damarlı

B. Sect. Chronosemium

4. Bayrakçık kaşık veya bot şeklinde değil; ovaryum sapsız; kaliks tüpü 10-20 veya çok damarlı (nadiren *Amoria* seksiyosunda 5 damarlı)

5. Meyve kaliksi 2 düzensiz dudaklı, üst dudak meyvede kese şeklinde, kaliksin ucundaki iki diş genellikle kalanlardan daha uzun

E. Sect. Fragifera

5. Meyve kaliksi şişkin değil veya simetrik olark şişkin, dişler eşit uzunlukta veya alttaki üsttekinden daha uzun

6. Stipulalar dentat veya serrat; kaliks boğazı açık (Sect. *Paramesus*)

7. Korolla 9-12 mm

41. glanduliferum

7. Korolla 6-8 mm

42. strictum

6. Stipulalar tam, nadiren dentat ise kaliks boğazı iki dudaklı sert bir şişkinlik ile kapalı

8. Çiçekler braktesiz, sapsız; kaliks boğazı halka şeklinde veya iki dudaklı sert bir şişkinlik ile kalınlaşmış veya tepede tüy halkası ile birlikte, olgunlukta genellikle kapalı **F. Sect. Trifolium**

8. Çiçekler brakteli; kaliks boğazı çıplak ve açık

9. Kaliks 20 veya çok damarlı, meyve durumunda tekdüze şişkin

D. Sect. Mistyllus

9. Kaliks 5 veya 10 damarlı, meyve durumunda değişken değil

10. Çiçek durumu sapsız

C. Sect. Micrantheum

10. Çiçek durumu saplı, nadiren sapsız ise kaliks dişleri biz şeklinde dikencikli, kuvvetlice geri kıvrık **A. Sect. Amoria**

A. Sect. Amoria

1. Çiçek durumu sapsız

9. retusum

1. Çiçek durumu saplı

2. Meyve kaliksinin sapları kaliks tüpünden çok daha kısa

3. Tek yıllık bitkiler; çiçekler meyvede bile hemen hemen sapsız; yaprakçıklar obovat, otsu **8. isthmocarpum**

3. Çok yıllık bitkiler; çiçekler kısa saplı; yaprakçıklar eliptik, az çok derimsi

4. Brakteler genişçe lanseolat, kaliks tüpünü sarar, yaklaşık 2 mm genişlikte; korolla (12)15-17 mm **4. montanum** subsp. **humboldtianum**

4. Brakteler linear-lanseolat, kaliks tüpünü sarmaz, yaklaşık 1 mm genişlikte; çiçekler genellikle 10-12 mm **5. ambiguum**

2. Meyve kaliksinin sapları kaliks tüpünden uzun veya eşit uzunlukta

5. Gövde sürünücü, boğumlarda köklenici

3. repens

5. Gövde dik veya yükselici, boğumlarda köklenici değil

6. Kaliks 5 damarlı; tek yıllık bitkiler

7. Aşağıdaki brakteler genellikle belirsiz; yaprakçıklar orta yukarıda en geniş **7. nigrescens**

7. Aşağıdaki brakteler belirgin, involukrum oluşturur; yaprakçıklar ortada veya aşağıda en geniş **10. euxinum**

6. Kaliks 10 damarlı; tek veya çok yıllık bitkiler

8. Tek yıllık bitkiler; yapraklar otsu, belirgin damarlı değil

9. Yaprakçıklar obovattan baklavamsıya kadar veya ters üçgensel; üst kaliks dişleri meyvede aşağı doğru kıvrık şekilde **7. nigrescens**

9. Yaprakçıklar eliptik; üst kaliks dişleri meyvede dik

11. balansae

8. Çok yıllık bitkiler; yaprakçıklar belirgin damarlarla birlikte $\pm$ derimsi

6. hybridum

B. Sect. Chronosemium

1. Uçtaki yaprakçıklar bariz kısa saplı

2. Çiçekler (6-)7-9 mm

3. Bayrakçık katlı; gövde ve çiçek sapı dağınık tüylü

14. boissieri

3. Bayrakçık katlı değil; gövde ve çiçek sapı yüzey üzerine yatık tüylü

4. Korolla yaklaşık 9 mm, çiçekli iken menekşe renginde

13. speciosum

4. Korolla yaklaşık 7 mm, çiçekli iken sarı

15. mesogitanum

2. Çiçekler (4-)5-7 mm

5. Bayrakçık katlı; çiçek durumu üzerindeki çiçekler ana ekseninde seyrek dizili

6. Yaprakçıklar dar eliptikten oblonga kadar; küçük çiçek sapları kaliks tüpünden kısa **23. patens**

6. Yaprakçıklar obovat; küçük çiçek sapları kaliks tüpünden uzun veya kaliks tüpüyle eşit uzunlukta **24. dubium**

5. Bayrakçık katlı değil; çiçek durumu yoğun, çiçekler imbrikat

22. campestre

1. Uçtaki yaprakçıklar sapsız veya hemen hemen sapsız

7. Korolla 10-12 mm, açık mor

12. sintenisii

7. Korolla 1,5-8 mm, sarı veya pembe

8. Çiçek durumu 2-20 çiçekli; korolla 1,5-5 mm

9. Çiçek durumu 4-6(-10) çiçekli; kaliks yaklaşık 1,5 mm

25. micranthum

9. Çiçek durumu 8-20 çiçekli; kaliks en az 3 mm

10. Çiçekler pembe veya leylak rengi; küçük çiçek sapları kaliks tüpünden kısa **8. erubescens**

10. Çiçekler sarı; küçük çiçek sapları kaliks tüpünden uzun

11. Çiçek durumu sapı taşıyıcı yapraklardan kısa; çiçekler 3-4 mm

19. sebastinii

11. Çiçek durumu sapı taşıyıcı yapraklardan uzun; çiçekler yaklaşık 5 mm **23. patens**

8. Çiçek durumu 20-70 çiçekli; korolla 4-8 mm

12. Meyveli çiçek durumunda bayrakçıklar katlı, çiçekler imbrikat değil

13. Meyveli çiçek durumu küre şeklinde veya yarıküremsi; korolla meyve durumunda kahverengi **16. rytidosemium**

13. Meyveli çiçek durumu silindir veya koni şeklinde; korolla meyve durumunda siyahımsı kahve **17. spadiceum**

12. Meyveli çiçek durumunda bayrakçıklar düz ve çiçekler imbrikat

14. Kaliks dişleri tüysüz

20. aureum

14. Kaliks dişleri tüylü

21. barbulatum

C. Sect. Micrantheum

1. Bitkiler gövdesiz; meyve kaliksi damarlı

27. suffocatum

1. Bitkiler gövdeli; meyve kaliksi damarlı veya damarsız

2. Korolla kaliksin dışına uzamış; meyve kaliksi damarlı ve zarımsı

26. glomeratum

2. Korolla kaliksten kısa; meyve kaliksi damarsız ve mantarimsı hale gelir

28. pachycalyx

D. Sect. Mistyllus

1. Meyve kaliksinin tüpü uzunluğuna ve enine damarlı

2. Korolla uzunlamasına taşkın, aşağı doğru kıvrık; yaprakçıklar eliptik

30. vesiculosum

2. Korolla dışarı kısaca uzamış, düz; yaprakçıklar obovattan ters üçgene kadar

29. spumosum

1. Meyve kaliksinin tüpü sadece boyuna damarlı

3. Kaliks dişleri tabanda kirpiksi, aniden daralan, bayrakçık sivri

32. setiferum

3. Kaliks dişleri tabanda tüysüz, daralmış mızraklı; bayrakçık obtus

4. Kaliks tüpü tüysüz

31. aintabense

4. Kaliks tüpü iki boyuna olarak iki tüy sırası ile

33. argutum

E. Sect. Fragifera

1. Çok yıllık bitkiler, sürünücü veya kökten itibaren çok gövdeli; korolla baş aşağı dönmüş değil

2. Çiçek durumu alttaki çiçeklerin geniş brakteleriyle oluşan bariz involukrum

34. fragiferum

2. Çiçek durumu involukrum değil

3. Korolla 10-15 mm, pembe

35. physodes

3. Korolla 6-8(-10) mm, sarı veya pembemsi sarı

6. tumens

1. Tek yıllık bitkiler; korolla baş aşağı dönmüş

4. Meyveli çiçek durumu yıldız şeklinde; yaprakçıklar 10-25 mm

37. resupinatum

4. Meyveli çiçek durumu yıldız şeklinde değil; yaprakçıklar 7-10 mm

5. Korolla kalıcı fakat meyvede solmuş durumda; yaprakçıklar obovat, tepede kesik veya girintili değil

38. clusii

5. Korolla meyvede düşücü; yaprakçıkların tepesi kesik veya girintili

6. Çiçek durumu 3-5 mm, az çiçekli; alt kaliks dişleri meyvede 1-2 mm veya küçük sert şişkinliklere indirgenmiş

40. bullatum

6. Çiçek durumu 5-7 mm, çok çiçekli; alt kaliks dişleri 2-3 mm, çok belirgin veya meyveli kaliksin tüylerinde gizlenmiş

39. tomentosum

F. Sect. Trifolium

1. Sert odunlaşmış gövdeli çok yıllık bitkiler

2. Kaliks tüpü (12-)15-20 damarlı

56. alpestre

2. Kaliks tüpü 10 damarlı

3. Kaliks tüpü tüysüz

46. medium

3. Kaliks tüpü tüylü

4. Kaliks dişleri küt, linear-subulat
5. Korolla genellikle kırmızımsı mor; stipulanın serbest kısmı aniden kılsı bir tepe oluşturacak şekilde daralmış **43. pratense**
5. Korolla sarı veya krem rengi; stipulanın serbest kısmı, mızraksı biz şeklinde tepe oluşturacak şekilde derece daralmış **53. trichocephalum**
4. Kaliks dişleri sivri
6. Kaliks dişleri tüysüz veya az çok tüysüz **47. heldreichianum**
6. Kaliks dişleri yoğun tüylü
7. Korolla 15-18 mm, pembeden mora; yaprakçıklar ovattan ovat-eliptiğe kadar, genellikle genişliğinin 1,5 katından uzun değil **54. caudatum**
7. Korolla (15-)20-30 mm, 20 mm'den kısaysa sarı; yaprakçıklar genellikle genişliğinin 1,5 katından uzun
8. Stipulanın serbest kısmı yapraksı, lanseolat veya üçgensiz ovat **48. longidentatum**
8. Stipulanın serbest kısmı biz şeklinde
9. Bayrakçık 15-18 mm **49. ochroleucum**
9. Bayrakçık 20-30 mm
10. En alt kaliks dişi kalanların yaklaşık 2 katı uzunluğunda; korolla pembe **50. caucasicum**
10. En alt kaliks dişi kalanların 1,5 katı uzunluğunda veya daha kısa; korolla sarı veya beyaz
11. Bayrakçık tepede kesik veya girik, kanatçık ve kayıkçıktan 3-4 mm uzun
12. Kaliks dişleri 5-7 mm; alt yaprakların yaprakçıkları tepede derin girintili **51. canescens**
12. Kaliks dişleri 9-12 mm; alt yaprakların yaprakçıkları tepede küçük girintili **52. davisii**
11. Bayrakçık yukarıda daralmış, kanatçık ve kayıkçıktan 6-8 mm uzun **55. pannonicum** subsp. **elongatum**
1. Bitkiler tek yıllık veya iki yıllık
13. Kaliks tüpü yaklaşık 20 damarlı
14. Kaliks tüpü yoğun tüylü; çiçek durumu sapsız, involukrumlu

15. Alt yaprak stipulalarının serbest kısımları subulat-aristat; meyveli başlar çökük değil **68. hirtum**
15. Alt yaprak stipulalarının serbest kısımları üçgensiz lanseolat; meyveli başlar çökük **70. cherleri**
14. Kaliks tüpü tüysüz; çiçek durumu saplı **69. lappaceum**
13. Kaliks tüpü 10 damarlı
16. Stipulaların serbest kısımları ovat, üçgensiz veya genişçe lanseolat, subulat veya aristat uç oluşturacak şekilde daralmıyor
17. Kaliks dişleri akut; korolla 10-18 mm; kaliks boğazı sert bir şişkinlikle kapalı değil; stipulalar dentat
18. Çiçek durumu küremsi; stipulalar keskin küçük dişli **57. stellatum**
18. Çiçek durumu oblongdan silindiriğe kadar; stipulalar hafifçe dentat **58. incarnatum**
17. Kaliks dişleri obtus; korolla 8-10 mm; kaliks boğazı sert bir şişkinlik ile kapalı; stipulalar tam **59. sylvaticum**
16. Stipulaların serbest kısımları aristat veya subulat uzantılı
19. Korolla 3-13(-15) mm
20. Korollanın kanatçıkları en azından kulakçıkların yakınında yumuşak kılsı
21. Korolla 10-15 mm
21. Korolla 3-10 mm
22. Korolla yaklaşık olarak kaliksle aynı uzunlukta **61. bocconeii**
22. Korolla kaliksin 2 katı uzunlukta **63. trichopterum**
20. Korollanın kanatçıkları tüysüz
23. Yaprakçıklar obovat, nadiren eliptik, genişliğinin 1-1,5(-2) katı uzunluğunda
24. Meyve kaliksinin boğazı iki dudaklı sert bir şişkinlikle kapalı **89. scutatum**
24. Meyve kaliksinin boğazı açık
25. Korolla 8-14 mm

26. Korolla pembemsi beyaz, boyu kaliksin boyunu fazlaca aşmış
44. pallidum
26. Korolla kırmızımsı mor, boyu kaliksin boyunu hafifçe aşmış
veya aşmamış **45. diffusum**
25. Korolla 5-7 mm
27. Yaprakçıklar kalınlaşmış, kenarda yaysı kıvrılmış belirgin yan damarlarla birlikte
28. Çiçekteki kaliks subulat hirsut dişli; çiçek durumu geniş tabanlı
65. lucanicum
28. Çiçekteki kaliks lanseolat, çoğunlukla tüsüz dişli; çiçek durumu tabanda kuneat **64. scabrum**
27. Yaprakçıklar belirgin kıvrılmış yan damarlı değil
29. Korolla kaliksten kısa; kaliks tüpü meyvede topaç şeklinde
67. ligusticum
29. Korolla kaliksten daha uzun veya kaliksle eşit uzunlukta; kaliks tüpü meyvede küremsi **60. striatum**
23. En azından gövde yaprakları, genişliğinin (2,5-)3-7 katı uzunlukta lineardan oblong-eliptiğe kadar yaprakçıklarla birlikte
30. Korolla kaliksten kısa veya kaliksle eşit uzunlukta
31. Korolla 3-6 mm; kaliks dişleri eşit uzunlukta
32. Kaliks dişleri subulat
33. Yaprakçıklar tam; korollanın kanatçıklarının dışı tüylü
72. affine
33. Yaprakçıklar dentat; korollanın kanatçıkları tüsüz
71. arvense
32. Kaliks dişleri üçgensel lanseolat **66. phleoides**
31. Korolla 8-13 mm; kaliks dişleri eşit değil
34. Alt yapraklar linear lanseolat; kaliks yatık tüylü
73. angustifolium
34. Alt yapraklar obovat; kaliks yayık tüylü **85. leucanthum**
30. Korolla bariz olarak kaliksten uzun
35. Kaliks dişlerinin tepesi küt

36. Kaliks dişleri $\pm$ eşit uzunlukta
37. Bütün yapraklar alternan; kaliks hirsut **74. purpureum**
37. En üst yapraklar karşılıklı; kaliks ipeksi tüylü **75. rousseanum**
36. Kaliks dişleri bariz olarak eşit değil **76. haussknechtii**
35. Kaliks dişlerinin tepesi akut
38. Korolla 5-7 mm **60. striatum**
38. Korolla (7-)8-15 mm
39. Meyveli kaliks şişkin, boğazda daralmış
40. Kaliks dişleri tabanda daralmamış, meyvede belirgin şekilde farklı uzunlukta **84. constantinopolitanum**
40. Kaliks dişleri tabanda daralmış, meyvede $\pm$ eşit uzunlukta **83. obscurum**
39. Meyveli kaliks şişkin olmadığı gibi boğazda da daralmamış olmasına rağmen bazen kapalı veya kalınlaşmış
41. Meyveli kaliksin boğazı neredeyse tamamen sert bir şişkinlik ile kapalı
42. Yaprakçıklar dar eliptik, genişliğinin 4-5 katı uzunlukta **86. latinum**
42. Alt yaprakların yaprakçıkları genişçe eliptikten obovata kadar, genişliğinin 1,5-2.5(-3) katı uzunlukta
43. Kaliks dişleri 1 damarlı veya sadece tabanda 3 damarlı **87. echinatum**
43. Kaliks dişleri tepede 3 damarlı **82. squamosum**
41. Meyveli kaliksin boğazı açık
44. Kaliks meyvede zarımsı kalır; meyveli çiçek durumu olgunlukta kopar veya kopmaz
45. Kaliks dişleri mor tepeli; çiçek durumu olgunlukta kopar **78. apertum**
45. Kaliks dişleri mor tepeli değil; çiçek durumu olgunlukta kopmaz **80. alexandrinum**

44. Kaliks meyvede sertleşmiş; meyveli çiçek durumu olgunlukta kopar

46. Korolla pembe; kaliks dişleri tabanda üçgenimsi

79. meironense

46. Korolla krem rengi; kaliks dişleri tabanda biz şeklinde

81. berytheum

19. Korolla 15-30 mm

47. Yaprakçıklar genişliğiyle eşit uzunlukta; en alt kaliks dişleri ovat-oblong

88. clypeatum

47. Yaprakçıklar lineardan oblonga kadar, genellikle genişliğinin 2 katı uzunlukta; en alt kaliks dişleri biz şeklinde

48. Kaliks dişleri tepede akut

73. angustifolium

48. Kaliks dişleri tepede obtus

49. Kaliks yaklaşık 15 mm, dişler eşit

77. dasyurum

49. Kaliks 8-10 mm, dişler bariz farklı uzunlukta

74. purpureum

G. Sect. Trichocephalum

1. Verimsiz çiçekler, verimli çiçeklerin olgunlaşmasından sonra gelişir; olgun kapitulum toprağa veya toprak altına yatık

94. subterraneum

1. Verimsiz çiçekler verimli çiçeklerle aynı zamanda gelişir; olgun kapitulum her zaman havada gelişir

2. Kaliks dişleri tüysüz veya az çok tüysüz

93. chlorotrichum

2. Kaliks dişleri yoğun yumuşak uzun sık tüylü veya pamuksu

3. Verimli çiçekler 10-16 tane, 2 halka halinde dizilmiş

92. globosum

3. Verimli çiçekler (1-)2-8 tane, tek halkada dizili

4. Verimli çiçekler 1-2 tane; meyveli başlar 1 cm çapta

91. pilulare

4. Verimli çiçekler (4-)5-8 tane; meyveli başlar 1cm'den büyük çapta

90. pauciflorum

2.1.3.1. *Trifolium repens* L.

Toprak üstünde yatık, çok yıllık, 10-30 cm boyunda, nodlarda köklenici. Yapraklar uzun saplı; yaprakçıklar 1-2 cm, genişçe obovat, tepede dairemsi veya girik. Stipulalar geniş tabanlı ve kısa bizli. Çiçek durumu umbellat, 1,5-4 cm çapında, 20-40 çiçekli. Çiçek durumu sapı, taşıyıcı yapraklardan çok daha uzun. Çiçekler beyaz veya pembemsi, hoş kokulu. Küçük çiçek sapları en az kaliks uzunluğunda, erkenden kıvrılıcı. Kaliks 2-6 mm, kampanulat, 10 damarlı; dişler eşit değil, lanseolat. Korolla 4-12 mm. Legümen genellikle 3-4 tohumlu. Çiçeklenme Mart Eylül ayları arası (159).

1. Şemsiye şeklindeki çiçek durumu 3,5 cm çapında; yaprakçıklar 1-4 cm

var. giganteum

1. Şemsiye şeklindeki çiçek durumu 2 cm çapında; yaprakçıklar daha küçük

2. Şemsiye şeklindeki çiçek durumu 1,5-2 cm çapında; çiçekler 5-(8-10)

mm

var. repens

2. Şemsiye şeklindeki çiçek durumu 1,2 cm çapında; çiçekler 4-8 mm

3. Çiçekler pembe; çiçek sapları tüysüz

var. orphanideum

3. Çiçekler beyaz; çiçek sapları tüylü

var. macrorrhizum

T. repens var. *repens*

(Syn. *T. repens* L. var. *genuinum* Aschers.&Graebn.)

Habitat: Bataklık toprağında, meralarda, 500-2700 m yükseklikte yetişir.

Yayılış^a: **A1(A)** Çanakkale: Erenköy, Sint. 1883-29b, **A2(E)** İstanbul: Tarabya, 01.08.1892, Azn., **A2(A)** İstanbul: Paşabahçe'den Polonezköy'e kadar, 02.06.1940, B. Post, **A3** Bolu: Bolu'dan Adapazarı'na 25 km, yaklaşık 500 m, McNeill 251, Bolu: Kale, Kırıkyayla, 1550 m, orman içi açıklık, 24.06.1990, İ. Kılıç (GAZİ 1145!), Bolu: Yedigöller Milli Parkı, Tombullar sırtı, 1500 m, 14.06.1977, R. İlarslan, (AUF 79!), **A4** Kastamonu: Ilgaz Dağı, Baldıran Deresi, 1370 m, E. Yurdakul, (AUF 11696!), Kastamonu: Tosya,

Kösedağ, Büyükyazı mevkii, 1800 m, 12.06.1976, M. Kılınç, (AUF 7049!), **A5** Çorum: Alaca'dan Sungurlu'ya 20 km, 1200 m, Coode & Jones 1655, Yozgat: Çekerek, Yavıhasan çalınpınar, 1500 m, 28.06.1979, R. İlarıslan, (AUF 571!), **A7** Trabzon: Zıgana'yı geçince, 2000m, Furze 3891, **A8** Artvin: Çoruh, Murgal'ın yukarısında Şavval Tepe, 2200 m, D.32363, Rize: Fındıklı, Arıslandere köyü, Gürcüdüzü mevkii, karışık orman, 550-700 m, 27.06.1980, A. Güner, (AUF 2617!), **A9** Kars: Kötek yakınları, 28.06.1967, Ross, **B4** Ankara, Hacettepe Üniversitesi Sıhhiye Kampüsü İlaç fabrikası yanları, 800 m, 13.06.2009, G. Renda, (HÜEF 09331!) **B6** Yozgat: Akdağmadeni, Nalbant Dağı, ıslak ayır, 2050 m, T. Ekim, (AUF 3917!), Bitlis: Tatvan, 1750 m, D. 22188, **B10** Ağrı: Doğubayazıt ve İğdır arasında, 2050 m, M. Zohary & Plitmann 2265-90, **C2** Antalya: Yuva Yaylası, D. 14227, Muğla: Köyceğiz, ayırılık, 15 m, 15.04.1991, A. Güner, (GAZİ A. Güner 8641!), **C4** Antalya: Gazipaşa, obanlar Köyü yaylası, Akamuğar mevkii, korunmuş arazi, 1800-2000 m, 20.07.1981, H. Sümbül, (AUF 1149!), **C5** Adana: Karsantı, Torasan Dağı, Küçük Kuruca mevkii, çayırılık, 2090 m, 16.06.1977, E. Yurdakul, (AUF 1680!), **C6** Gaziantep: Ayntab, Haradj 1318, Kahramanmaraş: Engizek Dağı, Ağabeyli Köyü evresi, 1250-1300 m, 21.05.1987, (GAZİ H. Duman 2724!), **C10** Hakkari: Yüksekova civarı, Sat Dağı, 2700 m, Duncan & Tait 108.

^a Yerinde görülen örnekler dışındaki bilgiler Zohary, 1970'den (159) alınmıştır.

2.1.3.2. *Trifolium ambiguum* Bieb.

Toprak üstünde yatıktan yükseliciye kadar çok yıllık bitkiler, 8-35 cm. Yaprakçıklar (1-)1,5-3,5 cm, eliptikten ters ovata kadar; stipulalar genişçe ovat, yaprak sapı ile birleşik, serbest kısım lanseolat-subulat. iek durumu baş veya yumurta şeklinde, sonradan uzayan, 1-1,5 cm genişlikte. iek durumu sapı 4-10 cm. Brakteler dar lanseolat-subulat, kaliks tüpünden kısa. Çiçekler beyaz, pembeye dönen; iek sapları kaliksin üçte biri uzunlukta, daha sonra aşağı doğru kıvrılan. Kaliks 4-5 mm, kampanulat, beyazımsı, 10 damarlı, dişler hemen hemen eşit. Korolla 1-1,2 cm, bayrakçık, kayıkçıktan

uzun. Legümen yaklaşık 3 mm, gagalı, 2 tohumlu. Çiçeklenme Haziran Ağustos ayları arası (159).

Habitat: Dik, taşlı topraklı yamaçlarda, orman kenarlarında, tarlalarda, 1700-2750 m yükseklikte yetişir.

Yayılış^a: **A8** Artvin: Çoruh, Artvin'in yukarısındaki dağda, 1900 m, D.29721; Rize: Cimil, 2000 m, 1866, Bal.; Erzurum: İspir, 2120 m, Alpay (ANKO 2630), Rize: İkizdere, Cimil deresi, tiran çevresi, 1200 m, sulak çayırılık, 26.06.1984, A. Güner, (AUF 5677!), Rize: İkizdere, Anzer Köyü üstü, 2100-2500 m, sarp kayalık yamaçlar, 11.07.1984, A. Güner, (AUF 5803!), Rize: İkizdere, Ballıköy (Anzer), 2150 m, 19.07.1984, M. Vural, (AUF 3080!), Rize, İkizdere, Cimil vadisi, yol kenarları, 1200 m, 20.06.2009, G. Renda, (HÜEF 09891!). **A9** Kars: Sarıkamış, 2100 m, D. 30800; Erzurum: Kop Dağı'nı geçince, 2350 m, Furze 3795, **B4** Ankara: Orman Çiftliği, Üresin 114, **B9** Ağrı: Ağrı'nın 3 km doğusunda, 1700 m, D. 44105; Bitlis: Kotum, 1900 m, D. 22440, **B10** Van: Başkale'nin 5 km kuzey doğusunda, 2150 m, D. 45941, **C9** Van: Harefta Dağı, Başkale ve Koçanes arasında, 2700 m, Nab. 2857.

^aYerinde görülen örnekler dışındaki bilgiler Zohary, 1970'den (159) alınmıştır.

2.1.3.3. *Trifolium hybridum* L.

Yükselici veya dik, çok yıllık, 5-50 cm. Yaprakçıklar 1-3 cm, obovattan rombiğe kadar, tepeleri emarginat. Stipulalar otsu, obovattan lanseolata kadar, tepeleri sivri uçlu veya biz şeklinde. Çiçek durumu umbellat, 1-2 cm çapında, küremsi, 12-20 çiçekli, çiçek durumu sapı yapraklardan uzun. Brakteler 1-2 mm, ovat. Çiçekler beyazdan pembeye kadar, uzun saplı. Kaliks 7-9 mm, beyazımsı, 5 damarlı; dişler lanseolat, eşit değil. Korolla 7-9 mm. Legümen 2-4 tohumlu(159).

1. Gövde yükselici, genellikle 20-30(-50) cm; yaprakçıklar 2-3 cm

var. hybridum

1. Kökten itibaren çok gövdeli, 5-20 cm; yaprakçıklar 0,7-1,0(-1,5) cm

var. anatolicum

T. hybridum* var. *hybridum

(Syn. *T. elegans* Savi)

Habitat: Çayırılarda ve nemli yerlerde, 1-2000 m yükseklikte yetişir.

Yayılış^a: **A2(E)** İstanbul: Tarabya yakınlarındaki tepeler, 01.07.1988, Azn., **A2(A)** İstanbul: Paşabahçe'den Polonezköy'e, 02.06.1910, B. Post, **A3** Bolu: Abant Gölü, 1400 m, D.37287, Bolu: Yedigöller Milli Parkı, balık üretim sahası, 900 m, 14.06.1977, R. İlarslan, (AUF 156!), **A4** Zonguldak: Gerede'nin 14 km güneyi, 1300 m, M. Zohary 5163, Ankara: Çubuk, Ovacık, Saraycık köyleri, Hallayıkpınarı, çalılıklar, çeşme kenarı, 1250-1380 m, 11.09.1992, E. Dünder, (GAZİ 1484!), **A6** Sivas: Zara'dan Şerefiye Yaylası'na, 1600 m, Hub.-Mor. 15023, **A7** Trabzon: Yomra, Şana mevkii, 100 m, 30.04.2009, G. Renda, (HÜEF 09337!), **A9** Erzurum: Horasan'dan Karaorgan'a 22 km, 2000 m, Davis & Hedge, (AEF Davis 29518!), **B3** Eskişehir: Türkmen dağı, Meşelipınar, 1350 m, T. Ekim, (AUF 3159!), **B7** Tunceli: Ovacık'tan Hozat'a, 2000 m, D. 31540, **B8** Muş: Bingöl Dağı'nın güney batı eteklerinde, Çaylar'dan Karlıova'ya 11 km, 1800 m, D. 46159, **B10** Ağrı: Doğubayazıt'ın güney nahiyelerinde, M. Zohary & Plitmann 2263-5, **B/C9** Van: Şatak civarı, Görendaş, 2000 m, D. 23228, **C1** İzmir: Kuşadası, Hub.-Mor. 17540, **C2** Burdur: Tefenni, Bayramlar Çaylı arası 3.km, tarla kenarı, K 37° 13' 00", D 29° 49' 25", 1390 m, 07.06.2009, Z. C. Arıtuluk, (HÜEF 09408!), **C10** Hakkari: Gevar Ovası, Yüksekova'dan 2-3 km, 1950 m, D. 45769.

T. hybridum* var. *anatolicum

(Syn. *T. anatolicum* Boiss., *T. parvulum* Beck)

Habitat: Çayırılarda ve nehir kenarlarında, 700-2400 m yükseklikte yetişir.

Yayılış^a: **A2(E)** İstanbul: Alemdağ, 25.06.1940, B. Post, **A3** Bolu: Ala Dağ civarı, Kartal Kaya Tepesi, 2000 m, Khan ve ark. 485, Bolu: Aladağ

Yaylası, çayırılık, 1350 m, 11.08.1985, M. Vural, (GAZİ M. Vural 2622!), Bolu: Gerede, Aktaş ormanı, 1300 m, 20.09.1976, O. Ketenoğlu, (AUF 362!), **A4** Ankara: Karagöl, Ankara'nın 65 km kuzeyi, 1600 m, Coode & Jones 2198, Ankara: Kızılcahamam, Soğuksu Milli Parkı, İncegeliş Civarı, orman açıklığı, 1550-1600 m, 09.08.1990, Ö. Eyüboğlu, (GAZİ 2040!), Ankara: Kızılcahamam, Işık Dağı, 1500 m, 10.07.1976, F. Demircioğlu, (AEF 81!), Ankara: Kızılcahamam, Işık Dağı, 1500 m, 12.06.1976, F. Demircioğlu, (AEF 6871!), Ankara: Soğuksu Milli Parkı, 1000 m, 14.06.2009, G. Renda, (HÜEF 09333!), Kastamonu: Duday, Ballıdağ, Sanatoryum üstü, Karaçam ormanı, 1000 m, 20.06.1978, O. Ketenoğlu, (AUF 1231!), **A5** Amasya: Merzifon'dan Havza'ya 17 km, 700 m, Coode & Jones 1965A, **A6** Tokat: Yıldızeli'nden Artova'ya, 1700 m, Reese, **A7** Gümüşhane: Zigana'yı geçince, 2000 m, M. & D. Zohary 357, **B2** İzmir: Ödemiş civarı, Bozdağ Yaylası, Bal. 170, **B5** Kayseri: Bakır Dağı, Akoluk Yaylası'nın yakınında Kisge'nin yukarısında, 2300 m, D. 19527, **C2** Muğla: Girdev Dağı, Bel Yaylası ve Duğer arasında, 1800 m, D. 13798, Muğla: Köyceğiz, Sandran Dağı, Köklüce, 2300 m, 23.07.1947, Karaosmanoğlu, (AEF 13554!), **C4** Antalya: Alanya civarı, Ak Dağı, Geyik Dağı'nın güneyi, 2300 m, D. 14361.

^a Yerinde görülen örnekler dışındaki bilgiler Zohary, 1970'den (159) alınmıştır.

2.1.3.4. *Trifolium spadiceum* L.

(Syn. *T. litigiosum* Desv.)

Dik tek veya iki yıllık bitkiler, 10-40 cm. Yaprakçıklar 0,8-2,0 cm, obovattan eliptiğe kadar, taban baltamsı, hepsi sapsız. Çiçek durumu 2,2 cm genişliğe kadar, başlangıçta ovat, silindriğe dönüşen, 50-70 çiçekli. Çiçekler siyahımsı-kahveye dönüşen sarı. Çiçek sapları kaliks tüpünden kısa. Kaliks çıplak, 2-3 mm, dişler ince uzun yumuşak tüylü. Korolla 4-5 mm, bayrakçık katlı. Çiçeklenme Haziran Temmuz ayları arası (159).

Habitat: Nehir, çayır kenarı gibi nemli yerlerde, 1200-2300 m yükseklikte yetişir.

Yayılış^a: **A3** Bolu: Abant, 1200 m, Alpay (ANKO 2602), Bolu: Aladağ Yaylası, sarı çam ormanı, 1350 m, 11.08.1983, Ö. Eyüboğlu, (GAZİ 2635!), Bolu: Aladağ Yaylası, çayırılık, 1350 m, 11.08.1983, M. Vural, (GAZİ 2673!), **A4** Ankara: Kızılcahamam civarı, Işık Dağı zirve yakınları, Khan ve ark. 729, **A7** Trabzon: Hamsiköy, 1200 m, Balls 1646, Gümüşhane: Artabir'in yukarısında Büyükdere, Sint. 1894:7158, Giresun: Tamdere'nin üstleri, 1620-1700 m, Hub.-Mor. 15018, **A8** Erzurum: Erzurum'dan Tortum'a 35 km, 2250 m, Watson ve ark. 3230, Rize: İkizdere, Cimil, Başköy üstleri, 2010 m, 24.07.1984, M. Vural, (GAZİ 3203!), Rize: İkizdere, Çiçekli (Aşağı Anzer) Köyü, çayırılık, 1820 m, 07.08.1983, A. Güner, (AEF 13333!), Rize: Çamlıhemşin, Amlakıt Yaylası, Arkovit çevresi, sulak çayırılık, 2400 m, 12.08.1984, A. Güner, (GAZİ 6129!), Rize: İkizdere, Cimil vadisi, yol kenarındaki yamaçlar, 1200 m, 20.06.2009, G. Renda, (HÜEF 09339!), Artvin: Çoruh, Ardanuç, Kardevan Dağı, 1450 m, Davis & Hedge, (AEF Davis 30122!), **A9** Çoruh: Ardanuç'tan Kordevan Dağı'na, 1450 m, D. 30122, Kars: Kağızman'ın doğu dağları, Akçay'dan Cumaçay'a 20 km, 2200 m, D. 46732, Kars: Arpaçay, Kısır Dağı, dağ köyü, Dereçayırı mevki, dere kenarı, sarp kayalıklar, 2430 m, 24.07.2000, M. Vural (GAZİ M. Vural 8370!), Kars: Haçuvan, Kars-Ardahan, 1900 m, Davis&Hedge, (AEF Davis 30122!), Erzurum: Oltu, 2000 m, Alpay 2430, **B8** Erzurum: Palandöken Dağı, Çat'tan Erzurum'a 29 km, 2300 m, D. 47403.

^a Yerinde görülen örnekler dışındaki bilgiler Zohary, 1970'den (159) alınmıştır.

2.1.3.5. *Trifolium campestre* Schreb.

(Syn. *T. agrarium* L., *T. procumbens* L., *T. lagrangei* Boiss., *T. glaucescens* Hausskn., *T. pumilum* Hossain)

Yükselici veya toprak üzerinde yatık tek yıllık bitkiler, 10-30 cm. Yaprakçıklar 0,8-1,6 cm, rombikten obovata kadar, uçtaki yaprakçık saplı. Çiçek durumu 0,8-1,3 cm genişlikte, küremsi, çok çiçekli. Çiçekler soluktan parlak sarıya kadar, nadiren mor. Küçük çiçek sapı kaliksten kısa, çabuk

kıvrılan. Kaliks tüysüz veya nadiren az tüylü, 1,5-2,0 mm. Korolla (4-)5-7 mm, bayrakçık katlanmış. Çiçeklenme 2-4(-9). aylar arası (159).

Habitat: Tarlalarda, ekilmemiş boş alanlarda, 1-2200 m yükseklikte yetişir.

Yayılış^a: **A1(E)** Kırklareli: Demircihalil'in 4 km güneybatısı, Bauer & Spitzenberger 112, **A1(A)** Çanakkale: Lapseki'den Biga'ya 27 km, 10 m, Hub.-Mor. 17537, Çanakkale: Karabiga Alman çiftliği, 06.1976, T. Ekim, (AUF T. Ekim 1662!), **A2(E)** İstanbul: Belgrad Ormanı, 20.05.1960, Yalt., **A2(A)** İstanbul: Kartal, Aytuğ & Yaltırık 3340, İstanbul: Bulgurlu Dağı, 22.05.1931, Krause, (AUF 3196!), **A2** Bursa: Uludağ, Kirazlı Yayla, 1650 m, 28.05.1977, M. Keskin, (AEF 5955!), **A3** Bolu: Aladağ, Kartalkaya Tepesi, 1750 m, D. 37419, Bolu: Yedigöller Milli Parkı, 900 m, 12.07.1977, R. İlarslan, (AUF 88!), **A4** Ankara: Kızılcahamam, soğuksu Milli Parkı, Göllü mevkii, orman açıklığı, 1600 m, 31.07.1990, Ö. Eyüboğlu, (GAZİ 1975!), Kastamonu: İnebolu, Özlüce, 100 m, 31.05.1978, O. Ketenoğlu, (AUF 1292!), Kırıkkale: Delice, Büyükavşar kasabası, Büyükhelmit mevkii, seyrek meşe altı, 1100 m, 04.07.1991, M. Yaman, (GAZİ 1067!), **A5** Sinop: İnceburun, 30 m, Tobey 1617, Tokat: Zile, Kasın köyü, Gavurcalı tepesi, 1250-1300 m, 29.06.1977, R. İlarslan, (AUF 570!), Kastamonu: Devrehanı, Oyrak 2 mevkii, 1210 m, 08.07.1991, Yurdakul, (AUF 3576!), **A7** Giresun: Tamdere'den Yavuzkema'l'e, Karınca yakınları, 1500 m, Davis, (AUF 20712!), **A8** Artvin: Borçka, Gökteş yolu, Alaca (Tiryal) Dağı, kuzeydoğu yamaçları, manastır mevkii, Fagus altında, 960 m, 16.06.1977, A. Düzenli, (AUF 984!), Trabzon: Of, D. 32017, Rize: Rize sahil yolu, yol kenarı, 10 m, 25.05.1985, A. Güner, (GAZİ 6435!), Rize: Çamlıhemşin, Aşağı Vice Mahallesi üstü, karışık orman, 500-650 m, 26.06.1980, A. Güner, (AEF 13111!), Rize: İkizdere, Cimil Yaylası, yol kenarları, 1200 m, 20.06.2009, G. Renda, (HÜEF 09341!), **A9** Kars: Hacuvan, Kars'dan Adahan'a, 1900 m, D. 30470, **B1** İzmir: Çeşme, 10-50 m, D. 41839, **B3** Afyon: Bayat, Otlugedik sırtı kuzey yamaç, 1450 m, M. Vural, (GAZİ M. Vural 125!), **B5** Kayseri: Bakır Dağı, Kısge'nin yukarısında Akoluk Yaylası yakınları, 2000 m, Davis, (AUF 19360!), Nevşehir: Göreme, volkanik tuf, nemli ve gölgeli vadi, 17.06.1989, M. Vural, (GAZİ 5174!), **B7**

Erzincan: Kemaliye, Venk köprüsü Salihli köyü arası, meşelik alan, 912 m, 14.05.2006, H. Duman, (GAZİ H. Duman 5032!), **B8** Siirt: Bekirhan'ın 6 km güneyi, 700 m, Cheese & Watson 1120, **B9** Muş: Muş-Tatvan arası, nemli yerler ve aralıklar, 1500 m, 22.06.1983, T. Ekim, (GAZİ 7463!), Bitlis: Pelli, rutubetli sırtta, 2200 m, 06.07.1954, Davis, (AUF 22397!), Muş: Muş ile Tatvan arası, nemli yerler ve aralıklar, 1500 m, 22.06.1983, T. Ekim, (AUF 7463!) **C1** Muğla: Bodrum civarı, Muşgebi'den Karatoprak'a, 50-100 m, D. 40985 (çiçekler mor), **C2** Burdur: Tefenni, Tefenni Belkaya arası, yolun sol tarafındaki orman yolu, Küçükoğlan Yaylası, çayırılık, K 37° 17' 29", D 29° 38' 02", 1450 m, 06.06.2009, Z. C. Arıtuluk, (HÜEF 09405!), Muğla: Marmaris civarı, Söğüt'ten Bozburun'a, D. 41193, Muğla: Marmaris ile Bozburun arası, Bayır köyüne varmadan yamaçlar, 50 m, 30.04.1982, M. Koyuncu, (AEF 10651!), Muğla: Köyceğiz, Çandır-Kaunas, Sareupoterium friganası, 50 m, M. Vural, (GAZİ M. Vural 5777!), **C3** Antalya: Antalya Korkuteli caddesi, Burdur yolu bağlantısından 1.5 km, Jackson 5010, Antalya: Manavgat, Karaburun, 3 m, 10.04.1956, O. Polunin, (AUF 25832!), Burdur: Beyşehir ile Şarkikaraağaç asfaltının 11 km doğusundaki yamaçlar, 1250 m, 24.06.1975, R. Çelik, (AUF 3781!), **C4** İçel: Mut civarı, Adras Dağı, Coode & Jones 1014, İçel: Tarsus, Egemen Köyü ile Eksibelar arası, rutubetli yerlerde, 26.04.1955, Huber Morath, (AEF 5337!), Konya: Ermenek, Kazancı Kasabası, yayla pazarı, zeyve çayı boyunca, 600-800 m, 13.10.1983, H. Sümbül, (GAZİ 2591!), **C5** Hatay: Antakya, Samandağ civarı, Çevlik yakınları, 100 m, Coode & Jones 634, Hatay: Antakya, İskenderun ile Belen arası, Soğukoluk yolu başlangıcı arası, 300 m, 26.04.1978, M. Keskin, (AEF 6383), **C6** Kahramanmaraş: Engizek Dağı, Aksu Mah. Çevresi, çayırılık, 1000 m, 01.06.1987, H. Duman, (GAZİ H. Duman 2990!), Adana: Nurdağı geçidinin aşağıları, 1100 m, Cheese & Watson 987, **C7** Urfa: Suruç'tan Urfa'ya, 600 m, 12.07.1958, Davis & Hedge, (AUF 27892!), **C8** Mardin: Savur'un 10-12 km batısı, 900 m, D. 42454, **C9** Mardin: Hessana, Cudi Dağı eteklerinde, 900 m, D. 42808, **C10** Hakkari: Gevar Ovası, Yüksekova ve Sat Dağı arası, 1930 m, D. 45800.

^a Yerde görülen örnekler dışındaki bilgiler Zohary, 1970'den (159) alınmıştır.

2.1.3.6. *Trifolium resupinatum* L.

Yükselici veya dik tek yıllık bitkiler, 20-60 cm. Yaprakçıklar 1,0-2,5 cm, tepesi yuvarlakça daralıyor, romboitten ovat-oblonga kadar, donuk mavimsi yeşil olmayan. Çiçek durumu 1,0-1,5 cm genişlikte, küremsi, çok çiçekli, involukrum yok. Çiçek durumu meyvede yıldız şeklinde; çiçek sapı, taşıyıcı yapraklardan uzun. Kaliks, meyvede şişkin; ağımsı damarlı, tüysüz. Korolla 6-10 mm, baş aşağı dönmüş. Çiçeklenme Mayıs ayında (159).

Habitat: Tarlalarda, yol kenarlarında, ekilmemiş boş yerlerde, 1-1500 m yükseklikte yetişir.

1. Yaprakçıklar 3-5 cm; korolla 8-10 mm; gövde boşluklu, 80 cm'ye kadar uzunlukta **var. majus**

1. Yaprakçıklar 0,4-2,0 cm; korolla 5-8 mm; gövde 60 cm'ye kadar uzunlukta
2. Meyveli başlar 1,3-3,0 cm çapında **var. resupinatum**

2. Meyveli başlar 0,7-1,0 cm çapında **var. microcephalum**

Trifolium resupinatum var. *microcephalum* Zoh.

Yayılış^a: **A1(E)** Çanakkale: Erenköy, Sint 1883:173, **A2(E)** İstanbul: İstanbul, Clementi, **A4** Ankara: Ayaşbeli, Akkaya tepenin güneydoğusu, sulak yerler, 1200 m, 27.06.1986, M. Vural, (AUF 4198!), Çankırı: Atkaracalar, Dumanlı Dağı, Atkaracaların 500 m güneyi, su yakını, 1200-1300 m, 14.06.1991, A. Duran, (AUF 1037!), **A5** Çorum: İskilip, 750 m, Coode&Jones 1809, **B4** Konya: Konya'dan Çumra'ya doğru, Küçükköy, Helbaek 2471, **A6** Amasya: Çiğdemlik, Seki mahallesi, tarla kenarları, c. 500 m, 01.06.1987, S. Peker, (AUF 1271!), Tokat: Niksar, Hamidiye köprüsünden 300 m ileride, yolun sol tarafındaki tarla kenarları, 15.06.2009, D. Şöhretoğlu, (HÜEF 09892!), **C1** İzmir: Kuşadası, Hub.- Mor. 17541, **C3** Antalya: Akseki, Geyran Yaylası, Belen mevki, nemli yerler, 1200 m, 10.06.1995, A. Duran, (AUF 2604!), **C5** İçel: Çukurova, Tarsus, Dava T 135, **C6** Adana: Osmaniye civarı, Toprakkale, 80 m, D. 26915, Kahramanmaraş: Engizek Dağı, Aksu mahallesi çevresi, çayırılık, c. 1000 m, 10.06.1987, H. Duman, (AUF 2965!), **C7**

Şanlıurfa: Ceylanpınar, misafirhane çevresi, yol kenarı, 435 m, 15.04.1995, Z. Aytaç, (AUF 2126!).

^aYerinde görülen örnekler dışındaki bilgiler Zohary, 1970'den (159) alınmıştır.

2.1.3.7. *Trifolium pratense* L.

Dikten uçlarda yükseliciye çok yıllık bitkiler, 20-60 cm. Stipulalar ovat-lanseolat, serbest kısım çok dik mukronat veya sivri uçlu. Yaprakçıklar 1,5-3,0(-5,0) cm, obovattan genişçe eliptiğe kadar. Çiçek durumu küremsiden yumurtamsıya kadar, 0,7-2,2 cm genişlikte, sapsız veya nadiren saplı, genellikle küçülmüş yaprakların stipulalarından oluşan bir involukrumla birlikte. Kaliks tüp şeklinde veya kampanulat, 10 damarlı, yayık tüylü, nadiren tüysüz. Kaliks tüpünün boğazı halka şeklinde tüylü bir kalınlıkla açılmış. Korolla kırmızımsı-mordan pembeye kadar, nadiren beyazımsı, 13-18 mm. Çiçeklenme Mayıs Eylül ayları arası (159).

Habitat: Çayırlarda, yol kenarlarında, orman açıklıklarında, 1-2300 m yükseklikte yetişir.

1. Gövde genellikle 20-40 cm, yoğun yatık tüylü; yaprakçıklar 1,5-3,0 cm

var. pratense

1. Gövde 40-70(-100) cm, içi dolu veya boş, yatık tüylü veya tüysüz ; yaprakçıklar 3-5 cm

2. Gövde dik tüylü; korolla koyu kırmızı

var. americanum

2. Gövde az çok çıplaklaşan veya çıplak; korolla genellikle pembe

var. sativum

Trifolium pratense* var. *pratense

(Syn. *T. silvestre* Ducomm, *T. pratense* L. subsp. *eupratense* Aschers & Graebn, *T. purpureum* Gilib., *T. fontanum* Bobrov)

Yayılış^a: **A1(E)** Kırklareli: Kırklareli'nden Demirköy'e, 200 m, Bozakman 2603, **A3(E)** İstanbul: Sarıyer, Yalt. 2484, **A3** Bolu: Bolu'dan Sakarya'ya yaklaşık 25 km, yaklaşık 500 m, McNeill 250, Bolu: Yukarı Soku Köyü civarı, tarla ve bahçe kenarları, 800 m, 09.08.1983, M. Vural, (GAZİ 2574!), Bolu: Aladağ Yaylası, sarı çam ormanı, 1350 m, 11.08.1983, M. Vural, (GAZİ 2670!), Bolu: Abant çevresi, 1350 m, 31.08.1989, M. Vural, (AEF 23254!), Bolu: Gerece, Aktaş ormanı, Kürek köyü, meşe içi, 1250 m, 08.07.1976, O. Ketenoglu, (AUF 521!), Zonguldak: Hacıali köyü mevkii, 400 m, 18.07.1983, M. Demirörs, (AUF 1673!), **A4** Zonguldak: Karabük'ün yukarısında Keltepe'de Sorgun Yaylası, 1300 m, D. (S.60/1962), Ankara: Ayaşbeli yol kenarı, 1100 m, 24.05.1975, Y. Akman, (AUF 6666!), Ankara: Kızılcahamam, Soğuksu Milli Parkı, çayırliklar, 1600 m, 01.08.1989, Ö. Eyüboğlu, (GAZİ 1105!), Ankara: Çubuk, Peçenek Köyü ile Hasanoğlan arası, 1200 m, 05.07.1987, M. Koyuncu, (AEF 16296!), Ankara: Çubuk, Karagöl, volkanik yamaç, 23.06.1973, S. Erik, (AUF 59!), Ankara: Soğuksu Milli Parkı, 1000 m, 14.06.2009, G. Renda, (HÜEF 09332!), Çankırı: Atkaracalar, Dumanlı Dağı, Atkaracaların 500 m güneyi, tarla kenarı, 1200-1300 m, 14.06.1991, A. Duran, (GAZİ 1057!), Çankırı: Atkaracalar, Dumanlı Dağı, Çalıçukur mevkii, 1450-1630 m, 05.07.1991, A. Duran, (GAZİ 1206!), Çankırı: Işıkdag, güney yamaç, yangın kulesi yakını, 1900-200 m, 27.07.1975, Y. Akman, (AEF 5019!), Kastamonu: Pınarbaşı, Kaval, Nalbantoğlu mahallesi, orman açıklığı, yol kenarı, 950 m, 25.06.2003, M. Ufuk Özbek, (GAZİ 1595!), Kastamonu: Sakadağı, Yukarıköy, 1300 m, 27.06.1980, M. Demirörs, (AUF 489!), **A5** Çorum: Alaca'dan Sungurlu'ya 20 km, 1200 m, Coode & Jones 1670, **A6** Ordu: Aybastı'nın yukarısında, 1100 m, Tobey 1388, **A7** Giresun: Tamdere, 1600 m, D. 20643, Gümüşhane: Torul karayolu kenarı, 23.06.2009, G. Renda, (HÜEF 09893!), **A8** Rize: İkizdere, Cimil, Başköy üstleri, çayırlik, 2010 m, 24.07.1984, M. Vural, (GAZİ 3200!),

Rize: İkizdere, Cimil deresi, Tiran çevresi, sulak çayırılık, 1200 m, 26.06.1984, A. Güner, (GAZİ 5674!), **A9** Çoruh: Ardanuç'tan Kordevan Dağı'na, 1400 m, D. 30152, **B2** Kütahya: Simav, 1650 m, Durubal 310, **B3** Isparta: Eğirdir civarı, Barla Dağı, 1200 m, Khan ve ark. 420, Kütahya: Dumlupınar, Gökdağ, Akdere mevki, *P. nigra* ormanı, 1330 m, 22.07.1983, M. Vural, (GAZİ 2458!), **B4** Ankara: Ahlatlıbel, step yamaçlar, yol kenarları, 1245 m, 02.06.2009, S. Arabacı, (HÜEF 09161!), **B5** Nevşehir: Arılıburun Deresi, volkanik tüf, nemli vadi, 1100-1250 m, 19.05.1989, M. Vural, (GAZİ 4709!), Yozgat: Akdağ madeni, Sırıklı dağ, Fındıcak dere kenarında, 1600 m, T. Ekim, (AUF 3915!), Yozgat: Milli Park, *P. nigra* altı, 1500 m, 26.06.1979, B. Sayın, (AUF 86!), **B7** Elazığ: Hecili (Aydınlar) Köyü civarı, güney yamacı, 950 m, 20.06.1980, H. Evren, (AUF 315!), Erzincan: Munzur Dağı, Kennahuşağı Köyü aşağısı, Karasu çevresi, 1100-1300 m, 29.05.1979, Ş. Yıldırım, (AUF 1755!), Tunceli: Pülümür'ün yukarıları, 1900 m, D. 31597, **B8** Erzurum: Varto'dan Hınıs'a 20 km, 1900 m, D. 46250, Muş: Muş ile Tatvan arası, bataklık ve nemli yerler, 1500 m, 22.06.1983, N. Adıgüzel, (AUF 7354!), **B9** Van: Timar, 1750 m, D. 44199, Bitlis: Por Deresi, step ve kayalık, 1300-1500 m, 23.06.1983, N. Adıgüzel, T. Ekim, (AUF 7538!), **B10** Van: Başkale'nin 3-4 km kuzeydoğusunda, 2300 m, D. 44540, **C2** Burdur: Tefenni, Bayramlar Çaylı arası 3. km, tarla kenarı, K 37° 13' 00", D 29° 49' 25", 1390 m, 07.06.2009, Z. C. Arıtuluk, (HÜEF 09410!), Denizli: Honaz Dağı, 1250 m, Sorger 66-8-60, **C4** Konya: Karaman, Andrasovszky 407, Konya: Seydişehir, fidanlık kenarı, çayırılık, 1140 m, 20.07.1982, H. Ocakverdi, (AUF 1528!), İçel: Arslanköy, *Cedrus libani* ormanı, 1680 m, 07.06.1973, T. Uslu, (AUF 2899!), **C5** Adana: Saimbeyli-Develi yol ayrımına varmadan soldaki ağaçlandırma sahası, 1500 m, 03.06.1981, M. Koyuncu, (AEF 9802!), Adana: Hamidiyeköy sırtları, 280 m, 14.06.1990, E. Yurdakul, (AEF 3172!), **C6** Kahramanmaraş: Engizek Dağı, Aksu mahallesi çevresi, çayırılık, 1000 m, 10.06.1987, H. Duman, (GAZİ H. Duman 2952!), **C9** Van: Warak Dağı (Erek Dağı), 2200 m, Nabelek 2849, **C10** Hakkari: Yüksekova'dan Şemdinli'ye 10 km, 1950 m, D. 45146.

^a Yerinde görülen örnekler dışındaki bilgiler Zohary, 1970'den (159) alınmıştır.

2.1.3.8. *Trifolium canescens* Willd.

(Syn. *T. hohenackeri* Jaub. & Spach)

Çok yıllık bitkiler, 10-35 cm, basit gövdeler odunsu bir tabandan yükselir. Floral yapraklar kısa saplı. Stipulaların serbest kısmı biz şeklinde, tabanı geniş. Yaprakçıklar 1-3 cm, obovattan genişçe eliptiğe kadar, tepede derin girik. Çiçek durumu ovoid, meyvede silindirik hale gelir, 1,5-3,0 cm genişlikte, sapsız. Kaliks tüp şeklinde, 10 damarlı, tüylü, dişler lanseolat-subulat, 5-7 mm, akut, eşit değil, meyvede boğaz kısmı 2 dudaklı sert bir şişkinlik ile kapalı. Korolla soluk sarı, 30 mm'ye kadar. Çiçeklenme Mayıs Ağustos ayları arası (159).

Habitat: Alpin bölge altı, nehir kenarı, yaprak döken orman altları gibi yerlerde, 200-2000 m yükseklikte yetişir.

Yayılış^a: **A5** Amasya: Amasya civarı, Çakıralan'ın 6 km batısında, yaklaşık 700 m, M. Zohary & Orshan 10761, Kastamonu: Tosya, Suuçtudere, Sint. 1892:4489, **A6** Ordu: Çambaşı'nda, 2000 m, Tobey 1249, **A7** Giresun: Tamdere'nin aşağısında, 1600 m, D. 20627, Trabzon: Hamsiköy, 1500 m, Balls 487, Gümüşhane: Erimez, 24.06.1977, Y. Akman, (AUF 7161!), **A8** Rize: Cimil Vadisi, 2000 m, Bal. 1403, Rize: İkizdere, Gölyayla köyü altı, çayırılık, 1300-1500 m, 26.07.1985, A. Güner, (GAZİ 6677!), Rize: Rize-Ayder, alpinik step, 2350-2450 m, 26.08.1984, M. Vural, (GAZİ 3368!), Rize: İkizdere, Anzer Köyü üstü, sarp kayalık yamaçlar, 2100-2150 m, 11.07.1984, A. Güner, (GAZİ 5822!), Rize: İkizdere, Cimil Vadisi, 1200 m, 20.06.2009, G. Renda, (HÜEF 09340!), Trabzon: Zigana geçidi ile Hamsiköy arası, Bekçiler mevkii, 1600 m, 17.06.1970, M. Koyuncu, (AEF 3333!), Artvin: Çoruh, Artvin'in yukarısındaki tepelerde, 200 m, Stn. & Hend. 5932, **A9** Erzurum: Erzurum'dan İspir yolu, Winter 44, Çoruh: Ardanuç'tan Kordevan Dağı'na, 1450 m, D. 30126, **B8** Erzurum: Oltu ile Tortum arası, 2000 m, 12.07.1971, M. Koyuncu, (AEF 1480!), **B9** Van: Van ile Başkale arası, Güzeldere geçidi, 2400-2800 m, 02.07.1983, M. Koyuncu, (AEF 12469!), Van: Çatak-Bahçesaray yolu, Aşağınarlıca Köyü karşısı, çayırılıklar, 2100 m, 30.06.1983,

M. Koyuncu, (AEF M. Koyuncu 6177!), **C5** Hatay: Antakya, Amanoslar, Nur Dağı, Alman pınarı üzeri, 16.05.1969, R. Çetlik, (AUF 673!).

^aYerinde görülen örnekler dışındaki bilgiler Zohary, 1970'den (159) alınmıştır.

2.1.3.9. *Trifolium trichocephalum* Bieb.

(Syn. *T. trichocephalum* Bieb. var. *macrophyllum* Hossain, *T. trichocephalum* Bieb. var. *lonchophyllum* Hossain)

Dik veya yükselici çok yıllık bitkiler, 30-70 cm. Stipulalar ovat-oblong, serbest kısım biz oluşturacak şekilde derece derece inceliyor. Alt yaprakların yaprakçıkları 3-4 cm, ovattan eliptiğe kadar, tepede girik, üst yapraklar eliptikten lanseolata kadar. Çiçek durumu yumurtamsı, 1,5-2 cm genişlikte, sapsız. Kaliks silindrik-kampanulat, 10 damarlı, ince uzun yumuşak tüylü, 2 dudaklı sert bir şişkinlikle kapalı, dişler eşit değil, lanseolat-subulat, küt. Korolla krem rengi, 20-25 mm, yaklaşık kaliksin 2 katı uzunlukta. Çiçeklenme Mayıs Temmuz ayları arasında (159).

Habitat: Çayırliklarda, orman ve bataklık toprağında, 1670-2600 m yükseklikte yetişir.

Yayılış^a: **A7** Trabzon: Trabzon ve Meryemana arasında, 1700 m, Alpay (ANKO 2604), **A8** Rize: İkizdere, Cimil Yaylası, 1200 m, 20.06.2009, G. Renda, (HÜEF 09335!), **A9** Erzurum: Horasan'dan Karaorgan'a 22 km, 2000 m, D. 29507, Kars: Göle yolu 40. km, çayırliklar, 2200 m, 22.07.1990, M. Koyuncu, (AEF M. Koyuncu 8717!), Kars: Sarıkamış'tan Karakurt'a 10 km, 2050 m, D. 46546, **B8** Muş: Mollaali ve Konizoipo arasında, 07.06.1916, Şişkin, Erzurum: Ilıca'nın batısı, 06.08.1967, Ross, Erzurum: Karaköse'den 54 km sonra dağ çayırı, 2300 m, Huber-Morath, (AEF 540!), **B9** Erzurum: Ağrı ve Horasan arasını geçince doğuda, 2250 m, Lamond 2578, **B10** Ağrı: Hamur'un 2 km güneybatısında, 1670 m, D. 44021, Van: Başkale'den Hoşap'a 30 km geçince batıda, 2600 m, D. 45922, Ağrı: Doğubayazıt'tan Iğdır'a doğru, 2050 m, M. Zohary & Plitmann 2265-74.

^aYerinde görülen örnekler dışındaki bilgiler Zohary, 1970'den (159) alınmıştır.

2.1.3.10. *Trifolium pannonicum* Jacq.

(Syn. *T. elongatum* Willd., *T. armenium* Willd., *T. olympicum* Hornem., *T. sulphureum* Koch)

Trifolium pannonicum subsp. *elongatum* (Willd.) Zoh. Endemik

Dik veya yükselici çok yıllık bitkiler, 20-40(-60) cm. Stipulaların serbest kısımları linear-subulat. Yaprakçıklar 0,5-1,2 cm, lineardan oblong-lanseolata kadar. Çiçek durumu ovoidden ovoid-oblonga kadar, 1,5-3 cm genişlikte, saplı. Kaliks silindrik, kampanulata dönüşen, tüp 10 damarlı, yayık tüylü, meyvede 2 dudaklı sert bir şişkinlikle kapalı, dişler biz şeklinde, akut, stellat veya meyvede kıvrılmış. Korolla beyazdan krem rengine, 25 mm'ye kadar, kaliksin yaklaşık 2 katı uzunlukta, bayrakçık yaklaşık 4 mm genişlikte, daralmış hemen hemen sivri uçlu. Çiçeklenme Haziran Ağustos ayları arasında (159).

Habitat: Çayırliklarda, orman açıklıklarında, steplerde, 300-2350 m yükseklikte yetişir.

Yayılış^a: **A2(A)** İstanbul: Alemdağ, 25.05.1939, B. Post, **A3** Bolu: Ala Dağ, Kartal Tepe üzerinde, 1750 m, D. 37434, Bolu: Aladağ Yaylası, sarıçam ormanı, 1350 m, 11.08.1983, M. Vural, (GAZİ 2661!), Bolu: Yedigöller Milli Parkı, Tambullar sırtı, 1500 m, 12.07.1977, R. İlarslan, (AUF 155!), **A4** Bolu: Gerede'nin 34 km güneydoğusu, yaklaşık 1600 m, Sorger 62-82-23, Ankara: Beypazarı, Tekke yamaçları, step, 1350 m, 08.07.1986, Z. Aytaç, (GAZİ 2155!), Ankara: Kalecik, İdris Dağı, Ahmetadil Köyü üst yamaçları, 1200-1300 m, 23.06.1989, M. Coşkun, (AEF 16294!), Ankara: Hasanoğlu, İdris Dağı, Hasanoğlu'nun üstü, 1400-1700 m, 27.06.1989, N. Tanker, (AEF 16292!), Ankara: Soğuksu Milli Parkı, girişten 5 km sonra, yol kenarları, 1000 m, 14.06.2009, G. Renda, (HÜEF 09338!), Çankırı: Atkaracalar, Dumanlı Dağı, Avlağan Sivren Yaylası arası, step, 1500-1600 m, 09.07.1992, A. Duran, (GAZİ 1568!), **A5** Çorum: Samsun Çorum yolu üzerinde Çorum'un 40 km doğusunda, Jardine 395, Amasya: Akdağ, 800-1200 m, Bornm. 1889-2236, **A7** Gümüşhane: Köse ve Gümüşhane arasını geçince, 2000 m, D.

31914a, **A9** Kars: Arpaçay, Gülyüzü-Zinzal, dağ çayırı, 2020 m, 21.07.2000, M. Vural (GAZİ 8270!), **B2** Kütahya: Simav'dan Simav Dağı'na 3 km, 1200 m, Coode & Jones 2651, **B3** Eskişehir: Sündiken Dağı, sarıçam deresi, 600 m, 04.06.1971, T. Ekim, (AUF 561!), **B4** Ankara: Beynam, Ankara'nın 55 km güneybatısında, 1000 m, Ledingham & Ekim 4326, **B5** Kayseri: Kisge ve Bakıroluk Yaylası arasında Bakırdağ, 1700 m, D. 19490, Nevşehir: Ortahisar, Cemil Dağı, volkanik tüf, bağ bahçe kenarı, 1400 m, 18.06.1989, M. Vural, (GAZİ 5213!), **B7** Tunceli: Pülümür, 1550 m, 08.06.1957, Davis&Hedge, (AUF 29261!), **B8** Erzurum: Palandöken Dağı, Çat'tan Erzurum'a 25 km, D. 47384, Muş: Muş ile Tatvan arası, bataklık ve nemli yerler, 1500 m, 22.06.1983, N. Adıgüzel, T. Ekim, (AUF 7354!), **C1** Muğla: Datça, Kızılan ağaçlandırma sahası, 100 m, 01.05.1982, M. Koyuncu, (AEF 5105!), **C3** Isparta: Dedegöl Dağı, Sorger 66-46-7, Antalya: Akseki, Geyran Yaylası, Taşlıca yayla evleri mevkii, taşlı yamaçlar, 1450-1600 m, 09.06.1995, A. Duran, (GAZİ 2571!), **C4** Konya: Hacı Süleyman Yaylası'nın yukarısında Karadağ'da, Andrasovszky 406.

^a Yerinde görülen örnekler dışındaki bilgiler Zohary, 1970'den (159) alınmıştır.

T. pannonicum subsp. *pannonicum*, *T. pannonicum* subsp. *elongatum*'dan uzun ve kısmen geniş yaprakçıklarıyla, geniş çiçek durumuyla, obtus uclu geniş bayrakçığıyla (5-6 mm), daha az yoğun tüylü kaliks tüpüyle daralmış loblarıyla farklılık gösterir. Kuzey İtalya'dan Güney Rusya'ya ve Güney Kafkasya'ya kadar geniş bir yayılım gösteren *T. pannonicum* subsp. *pannonicum* Türkiye'de görülmemektedir (159).

2.1.3.11. *Trifolium arvense* L.

Dik veya yükselici tek yıllık bitkiler, 5-30 cm. Stipulalar uzun sivri uclu ovat-oblong. Yaprakçıklar 1-2 cm, linear-oblongdan dar eliptiğe kadar, dentat, mukronat. Çiçek durumu ovoidden silindiriğe, meyvede uzayan, kısa saplı. Kaliks tüpsü kampanulat, yaygın tüylü, 10 damarlı, dişler kılsı, akut, çoğu zaman morumsu veya pembe, boğaz açık, viloz. Korolla beyaz veya pembe, 3-6 mm, kalıcı, kaliksten çok daha kısa, kanatlar tüysüz. Çiçeklenme Mart Mayıs ayları arasında (159).

Habitat: Çimenli ve boş alanlarda, açık bitki topluluklarında, 1-2300 m yükseklikte yetişir.

1. Dik, gür bitkiler, gövde yoğun tüylü, kaliks 4.5-7.0 mm, yumuşak ince uzun sık tüylü, dişler tüpün 2-3 katı uzunlukta **var. arvense**

1. Yatık, daha az gür bitkiler, gövde tüysüz veya seyrek tüylü, kaliks 3-5 mm, tüysüz veya yaygın tüylü, dişler genellikle tüple eşit uzunlukta (nadiren 2 katı uzunlukta), çoğu zaman kırmızımsı **var. gracile**

Trifolium arvense var. *arvense*

(Syn. *T. eriocephalum* Ledeb., *T. longisetum* Boiss & Bal.)

Yayılış^a: **A1(E)** Tekirdağ: Tekirdağ'ın 11 km batısında, yaklaşık 100 m, Coode & Jones 2838, **A2(E)** İstanbul: Kemerburgaz'ın kuzeyi, 100 m, Demeriz & Baytop 3939, **A2(A)** İstanbul: Paşabahçe'den Polonezköy'e, 02.06.1940, B. Post, **A3** Bolu: Devrek'in 30 km güneyinde, 250 m, Kühne 3084, **A4** Ankara: Kızılcahamam yakınları, 1200 m, Mc Neill 275, Ankara: Kızılcahamam, Soğuksu Doğal Parkı, volkanik trüf, 1000 m, 40° 29' N, 32° 39' E, 26.07.1988, R. M. Nesbitt, D. Samuel, (GAZİ 1918!), Ankara: Çubuk, Ovacık-Sarayak köyleri, Akçameydan mevki, çalılıklar, 1250-1380 m, 11.09.1992, E. Dünder, (GAZİ 1463!), Ankara: Soğuksu Milli Parkı, 1000 m, 14.06.2009, G. Renda, (HÜEF 09336!), **A5** Çorum: İskilip'in 6 km güneyi, 750

m, Coode & Jones 1805, **A6** Samsun: Samsun Kızılkamp arası 5 m, Tobey 270, **A7** Trabzon: Trabzon yakınlarında Boztepe, Hand.-Mazz. 187, **A8** Artvin: Çoruh, Borçka'nın üstünde, 300 m, D. 29864, Rize: Çayeli'nden Pazar'a 5-10 km, heyelanlı ve nemli yamaç, 17.03.1984, B. Yıldız, (GAZİ A. Güner 5407!), **B1** İzmir: Ödemiş civarı, Bozdağ, 1200m, D. 18169, **B2** Kütahya: Uşak'ın 20 km kuzeyinde, Gediz'e doğru Gediz yolu üzerinde, 1200 m, Coode & Jones 2591, **B4** Ankara: Dikmen Dağı, 07.05.1933, Kotte, **B5** Nevşehir: Nevşehir'den Ürgüp'e doğru, 1200-1300 m, D. 19108, Nevşehir: Göreme, Arılıburun Deresi, volkanik trüf, nemli vadi, 1100-1250 m, 19.05.1989, M. Vural, (GAZİ 4706!), **B8** Muş: Çaylar, 1600 m, D. 46366, **B9** Bitlis: Pelli Dağı, Pelli'nin üzerinde, 2300 m, D. 22616, **C2** Antalya: Avlan Gölü, Elmalı'nın batısında, Sorger 63-36-22, Muğla: Köyceğiz, Ekinok Köyü, Sandallitepe, makilik, kalkerli arazi, 19.05.1991, A. Güner, (GAZİ 9104!), **C3** Antalya: Kemer civarı, Gönük, 0-50 m, D. 15034, **C4** İçel: Güzeldere, Mersin'in 30 km kuzeybatısında, 20.05.1855, Bal. **C5** Niğde: Hasan Dağı, Taşpınar üzerinde, 1100-1200 m, D. 18886, **C6** Kahramanmaraş: Akher Dağı (Ahir Dağı), 1200 m, Balls 1115, Kahramanmaraş: Engizek Dağı, Engizek Köyü çevresi, tarla açıklıkları, 1400-1500 m, 15.06.1987, H. Duman, (GAZİ H. Duman 3342!), **C10** Hakkari: Yüksekova'dan Şemdinli'ye 32 km mesafede, 1750 m, D. 45077.

^aYerinde görülen örnekler dışındaki bilgiler Zohary, 1970'den (159) alınmıştır.

2.1.3.12. *Trifolium purpureum* Lois.

Dik veya yükselici, nadiren yatık, $\pm$ yatık kısa yumuşak tüylü, tek yıllık, 10-30(-50) cm. Stipulalar oblong-lanseolat, serbest kısım uzun biz şeklinde. Yaprakların tümü alternan. Yaprakçıklar (-1)2-4(-6) cm, oblong-lanseolattan lineara kadar, yaprağın tepesi sivri, küçük sert bir ucla sonlanır. Çiçek durumu çiçekliyken ovoitten koni şekline kadar, meyve durumunda silindirik, saplı. Kaliks 1 cm'ye kadar, tüpsü, hirsut, 10 damarlı; kaliks dişleri subulat-kılsı, küt, eşit veya değil. Meyve durumunda kaliks yayılan veya birbirinden uzaklaşan dişli, kaliks ağzı 2 dudaklı sert bir şişkinlikle kapanır. Korolla mor,

leylak rengi veya beyazımsı, 10-25 mm, kaliksin dışına taşmış. Çiçeklenme Ocak Haziran ayları arasında (159).

1. Kaliks dişleri $\pm$ eşit veya en alttaki diş hafifçe uzun **var. pamphylicum**

1. Kaliks dişleri bariz eşit değil, en alttaki diş, diğer dişin 1,5-2 katı uzunlukta

2. Çiçekli başlar uzamış-silindrik, 2-4 cm veya daha uzun; çiçekler genellikle yoğun, çok sayıda, genellikle 17-25 mm; meyveli başlar 3-6 cm uzunlukta; bitki genellikle dik; yaprakçıklar genellikle oblong eliptik **var. purpureum**

2. Çiçekli başlar küremsiden ters koniye kadar, 1-2 cm uzunlukta; çiçekler çok sayıda değil, genellikle 13-15 mm; çiçekli başlar 1,5-2(-4) cm uzunlukta; bitki dik veya yatık; yapraklar dar eliptikten şeritsiye kadar **var. laxiusculum**

Trifolium purpureum* var. *purpureum

Yayılış^a: **A1(E)** Tekirdağ: Tekirdağ'dan Malkara'ya, Kumbağ'ın yukarısı, 1-50 m, Dudley, D. 34671 **A2(E)** İstanbul: Kilya ve Domuzdere arası, 25.06.1893, Azn. **A2(A)** İstanbul: Drako'dan Maltepe'ye, 27.06.1897, Azn. **A5** Amasya: Borabay Gölü, piknik alanı girişi, 15.06.2009, D. Şöhretoğlu, (HÜEF 09890!), Amasya: Çiğdemlik Köyü, Pınarbaşı mevki, nemli yerler, 700 m, 04.06.1987, S. Peker, (HÜEF 1301!), **B1** Balıkesir: Edremit, 07.1960, Kayacık, **B2** Manisa: Demirci, 700m, Coode&Jones 2761 **B4** Ankara: Ankara, 28.07.1963, Üresin, **B5** Yozgat: Yozgat yakınları, 08.07.1961, Chamberlain, **B6** Adana: Feke civarı, Himmetli'nin aşağısında Göksu geçidinde, 700-800 m, D.19836, **B8** Bingöl: Bingöl Elazığ arası, Kuru Sarıcan yokuşu, bazalt moloz ve kayalık, 1600-1800 m, 26.06.1983, N. Adıgüzel, (AUF 7802!), **C1** İzmir: Efes, Bornm. 1906:9286, **C2** Denizli: Babadağ ilçesi, kuzeybatı yamaçlar, *Pinus brutia* ormanlığı, 870-1200 m, 29.07.1988, Z. Aytaç, (HÜEF 2454!), **C3** Antalya: Manavgat'tan Akseki'ye, 80 m, Dudley, D. 35756, **C4** İçel: Anamur civarı, Anamur'dan Gilindere'ye, 20 m, D.25993, **C5** İçel: Kız Kalesi plajı, Tarsus'un 90 km güneyi, Deaver T 158, **C6** Adana: Osmaniye İskenderun arası, Toprakkale, 1400 m, 27.04.1990, M.

Nydegger, (AUF 45254!), Adıyaman: Atatürk Barajı, 700 m, 13.07.1996, Z. Aytaç, (HÜEF 2739!), Maraş: Maraş'tan Göksun'a 25. km, 1300 m, Stn. & Hend. 5564, **C7** Urfa: Urfa'dan Viranşehir'e, 650 m, D.42352, **C8** Siirt: Botan Çayı Geçidi, Siirt'ten 11 km, 450 m, D. 43263, **C9** Mardin: Cizre, 400 m, D. 42524.

^a Yerinde görülen örnekler dışındaki bilgiler Zohary, 1970'den (159) alınmıştır.



Resim 1. *Trifolium repens* var. *repens*
(Foto: G. Renda)



Resim 2. *Trifolium ambiguum*
(Foto: G. Renda)



Resim 3. *Trifolium hybridum* var. *anatolicum*
(Foto: G. Renda)



Resim 4. *Trifolium hybridum* var. *hybridum*
(Foto: G. Renda)



Resim 5. *Trifolium spadiceum*
(Foto: G. Renda)



Resim 6. *Trifolium campestre*
(Foto: G. Renda)



Resim 7. *Trifolium resupinatum* var. *microcephalum*
(Foto: D. Şöhretoğlu)



Resim 8. *Trifolium pratense* var. *pratense*
(Foto: G. Renda)



Resim 9. *Trifolium canescens*
(Foto: G. Renda)



Resim 10. *Trifolium pannonicum*
(Foto: <http://yabanicicek.com>)



Resim11. *Trifolium trichocephalum*
(Foto: G. Renda)



Resim 12. *Trifolium arvense* var. *arvense*
(Foto: <http://luirig.altervista.org>)



Resim 13. *Trifolium purpureum* var. *purpureum*
(Foto: D. Şöhretoğlu)



2.2. *Trifolium* Türleri Üzerinde Yapılan Çalışmalar

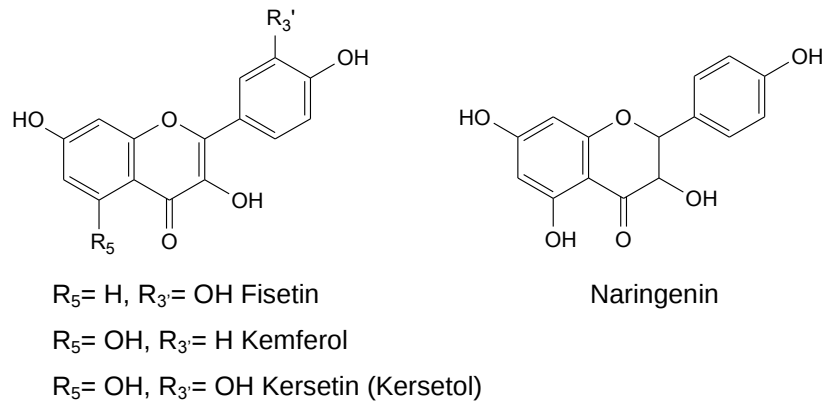
Trifolium türleri üzerinde bu güne kadar yapılmış olan çalışmalar “Fitokimyasal Çalışmalar” ve “*Trifolium* Türlerinin Kullanılışları ve Biyolojik Etkileri” başlıkları altında derlenerek iki bölümde verilmiştir.

2.2.1. Fitokimyasal Çalışmalar

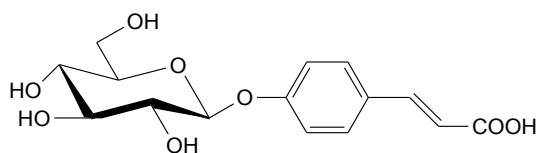
Bu bölümde *Trifolium* türleri üzerinde bugüne kadar yapılmış olan fitokimyasal çalışmalarda elde edilen bileşikler, ana yapılarına göre derlenerek on alt başlık altında sunulmuş; bu sınıflamanın dışında kalan bileşikler ise “Diğerleri” başlığı altında toplu olarak verilmiştir.

2.2.1.1. Basit Fenolik Bileşikler ve Flavonoidler

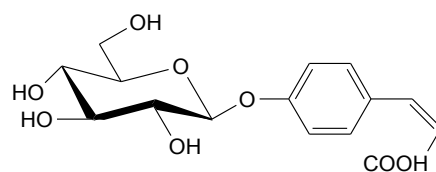
Trifolium pratense bitkisinden hazırlanan ticari bir ürünün YBSK tekniği ile incelenmesi sonucunda ekstrenin flavonol (fisetin, kersetin, kemferol) ve flavanon (naringenin) yapısında bileşikler taşıdığı belirlenmiştir (22).



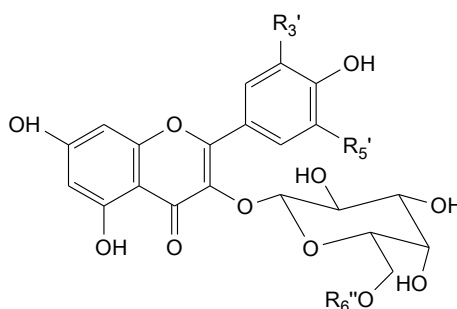
T. repens türü üzerinde yapılan bir çalışmada bitkinin çiçeklerinden *trans*- ve *cis*- *p*-kumarik asit 4-*O*- β -D-glukopiranozit ile mirisetin, kersetin ve kemferol'ün 3-*O*- β -D-galaktopiranozit ve 3-*O*-(6"-asetil)- β -D-galaktopiranozit türevleri elde edilmiştir (Tablo 1) (49).



trans-p-kumarik asit 4-O-β-D-glukopiranozit



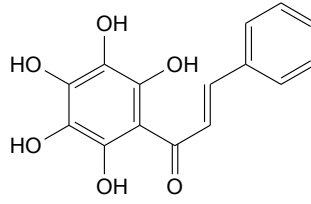
cis-p-kumarik asit 4-O-β-D-glukopiranozit



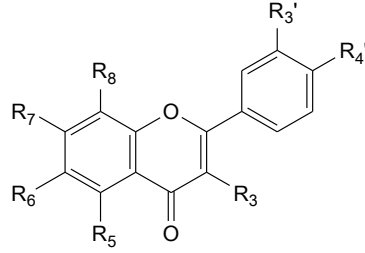
Tablo 1. *T. repens*'ten elde edilen flavonol glikozitleri

Bileşik	R _{3'}	R _{5'}	R _{6''}
Mirsetin-3-O-β-D-galaktopiranozit	OH	OH	H
Kersetin-3-O-β-D-galaktopiranozit	OH	H	H
Kemferol-3-O-β-D-galaktopiranozit	H	H	H
Mirsetin-3-O-(6"-asetil)-β-D-galaktopiranozit	OH	OH	COCH ₃
Kersetin-3-O-(6"-asetil)-β-D-galaktopiranozit	OH	H	COCH ₃
Kemferol-3-O-(6"-asetil)-β-D-galaktopiranozit	H	H	COCH ₃

T. repens bitkisinin sürgünleri ve kökleri üzerinde yapılan başka bir çalışmada bitkiden çok sayıda flavon ve metoksiflavon yapısında bileşikler (Tablo 2a) ile 2',3',4',5',6'-pentahidroksikalkon, bileşiği elde edilmiştir. Aynı çalışmada bitkinin kökleri *Glomus intraradices* adlı bir mantar ile inoküle edilmiş ve inoküle edilen köklerde akasetin, kersetin ve ramnetin gibi flavonoit bileşiklerinin de oluştuğu belirlenmiştir (Tablo 2b) (110).



2',3',4',5',6'-pentahidroksikalkon

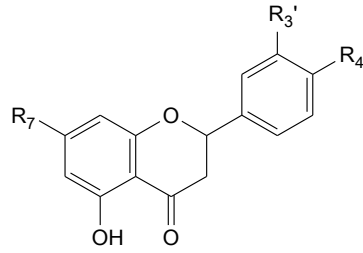
Tablo 2a. *T. repens*'ten doğal olarak elde edilen flavonoitler

Bileşik	R ₃	R ₅	R ₆	R ₇	R ₈	R _{3'}	R _{4'}
4',5,6,7,8-pentahidroksiflavon	H	OH	OH	OH	OH	H	OH
3,4',5,6,7-pentahidroksiflavon (6-hidroksikemferol)	OH	OH	OH	OH	H	H	OH
5,6,7,8-tetrahidroksi-4'-metoksiflavon	H	OH	OH	OH	OH	H	OCH ₃
3,5,6,7,8-pentahidroksi-4'-metoksiflavon	OH	OH	OH	OH	OH	H	OCH ₃
3,7-dihidroksi-4'-metoksiflavon	OH	H	H	OH	H	H	OCH ₃
4',5,6,7,8-pentahidroksi-3-metoksiflavon	OCH ₃	OH	OH	OH	OH	H	OH
5,6,7,8-tetrahidroksi-3-metoksiflavon	OCH ₃	OH	OH	OH	OH	H	H
5,7-dihidroksi-3,4'-dimetoksiflavon (3,4'-dimetoksikemferol)	OCH ₃	OH	H	OH	H	H	OCH ₃

Tablo 2b. *T. repens*'ten doğal olarak elde edilen flavonoitler

İnokülasyon sonrası oluşan bileşikler	R ₃	R ₅	R ₆	R ₇	R ₈	R _{3'}	R _{4'}
5,7-dihidroksi-4'-metoksiflavon (akasetin)	H	OH	H	OH	H	H	OCH ₃
3,3',4',5,7-pentahidroksiflavon (kersetin)	OH	OH	H	OH	H	OH	OH
3,3',4',5-tetrahidroksi-7-metoksiflavon (ramnetin)	OH	OH	H	OCH ₃	H	OH	OH

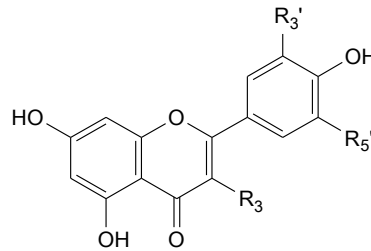
T. pratense, *T. repens*, *T. dubium* ve *T. corniculatus*'un yapraklarında yapılan bir çalışmada, yapraklardan metanollü ekstrater hazırlanmış ve bu ekstraterden C-18 ters faz kolonlarda gerçekleştirilen sıvı kromatografisi (LC) tekniği ile çeşitli bileşikler elde edilmiştir. Bitkilerde tespit edilen flavonoit bileşikleri Tablo 3a ve 3b'de verilmiştir (115).



Tablo 3a. *T. pratense*, *T. repens*, *T. dubium* ve *T. corniculatus* yapraklarından elde edilen flavonoitler

Bileşik	R ₇	R _{3'}	R _{4'}
Hesperitin	OH	OH	OCH ₃
Hesperedin	O-glu	OH	OCH ₃
Naringenin	OH	H	OH
Naringin	O-glu	H	OH

glu: β-glukopiranoz

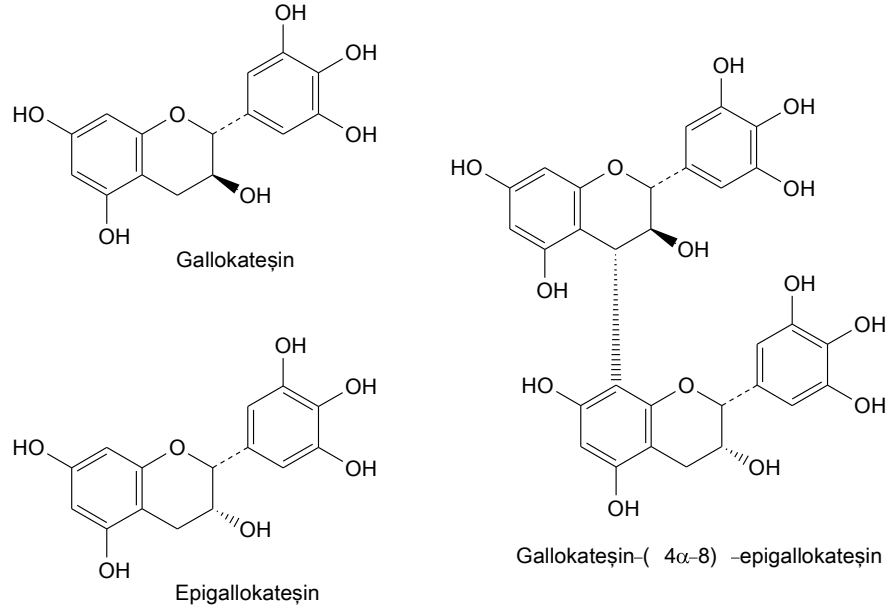


Tablo 3b. *T. pratense*, *T. repens*, *T. dubium* ve *T. corniculatus* yapraklarından elde edilen flavonoller

Bileşik	R ₃	R _{3'}	R _{5'}
Kemferol	OH	H	H
Kersetin	OH	OH	H
Mirsetin	OH	OH	OH
İzoramnetin	OH	OCH ₃	H
Rutin trihidrat	O-glu	OH	H

glu: β-glukopiranoz

T. repens üzerinde yürütülen başka bir çalışmada da bitkiden gallokateşin, epigallokateşin, gallokateşin-(4 α -8)-epigallokateşin gibi polifenolik bileşikler yanında bu bileşiklerin prodelfinidin polimerleri de elde edilmiştir (49).



Yukarıdaki türlere ek olarak *T. pannonicum*'dan hispidulin-7-*O*-glukozit, apigenin-7-*O*-glikozit, luteolin-7-*O*-glukozit ve luteolin-7-*O*-glukuronit (87, 131); *T. arvense*'den de kersetin, kersetin-3-glikozit, kemferol-3-glikozit ve kafeik asit izole edilmiştir (56).

57 *Trifolium* türünün tohumları üzerinde yapılan bir çalışmada da incelenen türlerin çoğunda kersetin'in tek başına veya tanımlanamayan başka flavonoidlerle birlikte karışım halinde bulunduğu belirlenmiştir (99).

2.2.1.2. İzoflavonoitler

İzoflavonoitler, yapısal olarak östrojene benzedikleri ve östrojen reseptörlerine bağlandıkları için fitoöstrojenler arasında sınıflandırılan, genellikle Fabaceae familyasındaki bitkilerde yaygın olarak bulunan flavonoid izomerleridir (105).

Trifolium pratense yapraklarından hazırlanan ekstre üzerinde yapılan

bir çalışmada C₁₈ ters faz silikajel adsorban üzerinde gerçekleştirilen sıvı kromatografisi tekniği ile bitkinin daidzin ve genistin (izoflavon glikozitleri) ile formononetin-7-O-β-D-glukozit-6''-O-malonat ve biokanın A-7-O-β-D-glukozit-6''-O-malonat (izoflavon glukozit malonatları) taşıdığı belirlenmiştir. Aynı çalışmada daidzin ve genistin aglikonları olan daidzein ve genisteine; formononetin-7-O-β-D-glukozit-6''-O-malonat önce ononin ve daha sonra formononetine; biokanın A-7-O-β-D-glukozit-6''-O-malonat ise önce sissotrin ve sonra biokanın A'ya hidroliz yoluyla dönüştürülerek aglikonlar üzerinden miktar tayinleri yapılmıştır. Ayrıca bitkinin yaprakları için en uygun hidroliz ve saklama koşulları da araştırılmıştır. Bitkinin saklanabileceği en uygun sıcaklığın -20°C olduğu belirtilirken, asitsiz hidroliz için yüksek sıcaklıkta (83°C) 2 saatlik süre önerilmiştir (114).

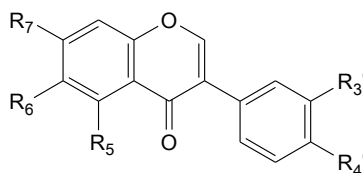
Soya ve yonca (*T. pratense*) izoflavonoitleri üzerinde yapılan bir çalışmada, bazı izoflavonoitlerin düşük çözünürlükleri nedeniyle YBSK ile izolasyonlarının uygun olamayacağından hareketle, izolasyon için HSCCC (High-Speed Countercurrent Chromatography) tekniği kullanılmıştır. Daha sonra izole edilen izoflavonlar YBSK yöntemi kullanılarak tanımlanmıştır. HSCCC tekniğinde *T. pratense* için hekzan-etilasetat-metanol-su (6:5:6:5) çözücü sistemi kullanılmış ve bu yöntemle biokanın A ve formononetin bileşikleri izole edilmiştir. Diğer fraksiyonlar için yarı preparatif YBSK tekniği kullanılarak prunetin ve irilon izole edilmiştir. Ayrıca HSCCC tekniği ile metil-*t*-bütileter-asetonitril-su (6:3:8) iki fazlı çözücü sistemi kullanılarak elde edilen fraksiyonlar yarı preparatif YBSK ile saflaştırılmış ve bu çalışma sonucunda ononin ve sissotrin izole edilmiştir (137).

T. pratense üzerinde çift boyutlu katı-faz ekstraksiyon sıvı kromatografisi yöntemi (LC-MS) kullanılarak yapılan bir çalışmada bitkide 14 izoflavon malonat glikoziti ve 6 izoflavon asetil glikoziti bulunduğu anlaşılmıştır. İzoflavon malonat glikozitlerinin yapıları daidzin-6''-O-malonat, genistin-6''-O-malonat, orobol-7-O-β-D-glukozit-6''-O-malonat, 3-metilorobol-7-O-β-D-glukozit-6''-O-malonat, kalikozin-7-O-β-D-glukozit-6''-O-malonat, pratensein-7-O-β-D-glukozit-6''-O-malonat, psödobaptigenin-7-O-β-D-

glukozit-6''-O-malonat, formononetin-7-O-β-D-glukozit-6''-O-malonat, irilon-4'-O-β-D-glukozit-6''-O-malonat, afrormosin-7-O-β-D-glukozit-6''-O-malonat, biokanin A-7-O-β-D-glukozit-6''-O-malonat, teksasin-7-O-β-D-glukozit-6''-O-malonat, 5,7,2'-trihidroksi-6-metoksiizoflavon-7-O-β-D-glukozit-6''-O-malonat, prunetin-4'-O-β-D-glukozit-6''-O-malonat olarak belirlenmiştir. İzoflavon asetil glukoziti yapısındaki bileşiklerin ise daidzin-6''-O-asetat, formononetin-7-O-β-D-glukozit-6''-O-asetat, psödobaptigenin-7-O-β-D-glukozit-6''-O-asetat, irilon-4'-7-O-β-D-glukozit-6''-O-asetat, biokanin A-7-O-β-D-glukozit-6''-O-asetat ve prunetin-4'-O-β-D-glukozit-6''-O-asetat oldukları anlaşılmıştır (72).

T. pratense kökleri üzerinde gerçekleştirilen diğer çalışmalarda bitkinin köklerinden 4',5-dihidroksi-6,7-metilendioksiizoflavon ve onun 4'-O-β-D-glukozit'i (50), daidzein, kalikozin, genistein, pratensein, psödobaptigenin, formononetin, irilon, prunetin, biokanin A, dihidrobiokanin A, siserin (21) ile formononetin ve formononetin-7-O-β-D-galaktopiranozit gibi izoflavonoitler de izole edilmiştir (43).

T. pratense bitkisinden elde edilen izoflavonoitlerin yapıları Tablo 4a ve 4b'de verilmiştir.

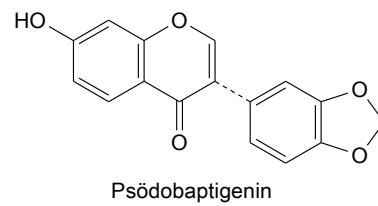
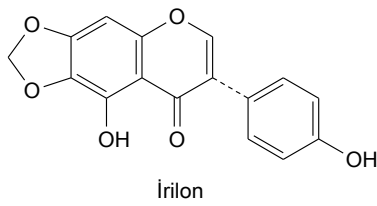
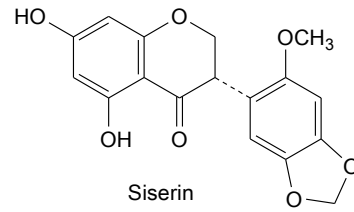
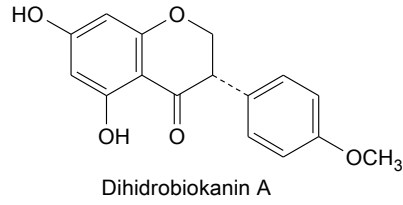


Tablo 4a. *T. pratense*'den elde edilen izoflavonoitler

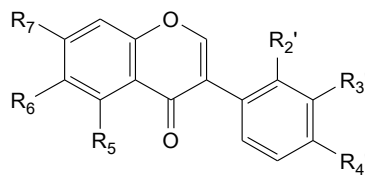
Bileşik	R ₅	R ₆	R ₇	R _{3'}	R _{4'}
Daidzein	H	H	OH	H	OH
Kalikozin	H	H	H	OH	OCH ₃
Genistein	OH	H	OH	H	OH
Pratensein	OH	H	OH	OH	OCH ₃
Formononetin	H	H	OH	H	OCH ₃
Prunetin	OH	H	OCH ₃	H	OH
Biokanin A	OH	H	OH	H	OCH ₃

Tablo 4b. *T. pratense*'den elde edilen izoflavonoit glikozitleri

Bileşik	R ₅	R ₆	R ₇	R _{3'}	R _{4'}
Ononin	H	H	O-β-glukopiranozit	H	OCH ₃
Sissotrin	OH	H	O-β-glukopiranozit	H	OCH ₃
Daidzin	H	H	O-β-glukopiranozit	H	OH
Genistin	OH	H	O-β-glukopiranozit	H	OH
Formononetin-7-O-β-D-galaktopiranozit	H	H	O-β-galaktopiranozit	H	OCH ₃
Formononetin-7-O-β-D-glukozit-6"-O-malonat	H	H	O-β-glukopiranozit-6"-O-malonat	H	OCH ₃
Biokanin A-7-O-β-D-glukozit-6"-O-malonat	OH	H	O-β-glukopiranozit-6"-O-malonat	H	OCH ₃
Orobol-7-O-β-D-glukozit-6"-O-malonat	OH	H	O-β-glukozit-6"-O-malonat	OH	OH
Afrormosin-7-O-β-D-glukozit-6"-O-malonat	H	OC H ₃	O-β-glukozit-6"-O-malonat	H	OCH ₃
Teksasin-7-O-β-D-glukozit-6"-O-malonat	H	OH	O-β-glukozit-6"-O-malonat	H	OCH ₃



T. pratense, *T. repens*, *T. dubium* ve *T. corniculatus*'un yapraklarının metanollü ekstreleri üzerinde LC-Floresans tekniği kullanılarak ekstrenin taşıdığı izoflavonlar belirlenmiştir. Çalışma sonunda daha önce elde edilmiş olan biokanin A, daidzein, formononetin, genistein, irilon ve psödobaptigenin yanında varlıkları belirlenen diğer izoflavonlar Tablo 5'te gösterilmiştir (115).



Tablo 5. *T. pratense*, *T. repens*, *T. dubium* ve *T. corniculatus* yapraklarından izole edilen bazı izoflavonoitler

İzoflavon	R ₅	R ₆	R ₇	R _{2'}	R _{3'}	R _{4'}
Afrormosin	H	OCH ₃	OH	H	H	OCH ₃
Kalikosin	H	H	OH	H	OH	OCH ₃
Glisetin	H	OCH ₃	OH	H	OH	OH
İrilin B	OH	OCH ₃	OH	OH	H	H
3-Metilorobol	OH	H	OH	H	OCH ₃	OH
Pratensein	OH	H	OH	H	OH	OCH ₃
Teksasin	H	OH	OH	H	H	OCH ₃

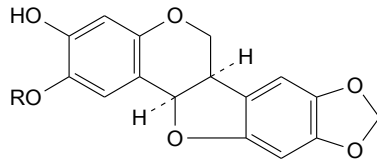
Trifolium pratense, *T. repens*, *T. hybridum* ve *T. campestre* türleri üzerinde yapılan bir çalışmada türlerin taşıdığı izoflavonlar HPLC-UV-ESI-MSD yöntemleri yardımıyla incelenmiş ve standartlarla karşılaştırılarak tayinleri yapılmıştır. *T. pratense* yaprak ve gövdesinde 31 izoflavonoit olduğu bulunurken, *T. repens*'te 9, *T. hybridum*'da 11 ve *T. campestre*'de de 4 izoflavonoit tespit edilerek yapısı aydınlatılmıştır. İncelenen dört *Trifolium* türünün de formononetin, daidzein ve bunların glikozitleriyle glikozit malonatlarını taşıdığı bulunmuştur. Formononetin ve biokanin A'nın yapraklarda, kök, gövde ve çiçeklere göre çok daha fazla olduğu tespit edilmiştir. Ters faz YBSK yardımıyla daidzein, formononetin, genistein, psödobaptigenin, glisetin, kalikozin, prunetin, biokanin A, irilon, pratensein olmak üzere 10 adet izoflavonoitin, asit hidroliz gerçekleştirilmiş ve ekstraktlerdeki miktar tayinleri yapılmıştır (157).

T. repens'in etanollü ekstresinden açılınmış bir izoflavon türevi olan genistein-7-(2"-p-kumaroilglukozit) elde edilmiştir (129).

T. resupinatum var. *microcephalum*'dan genistein (genistein-7-O-β-glukozit), formononetin, formononetin-7-O-β-glukozit, kemferol-3-O-(6"asetil)-

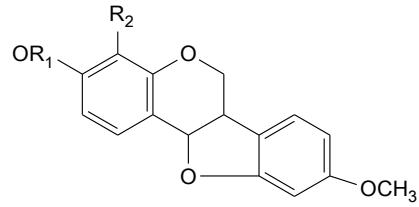
β -galaktopiranozit ve sitosterol-3-O- β -glukozit izole edilerek yapısı aydınlatılmıştır (68).

Trifolium türlerinde bulunan izoflavonoitlerin bir bölümü de pterokarpan sınıfından bileşiklerdir. *T. pratense*, *T. repens* ve *T. hybridum* kökleri üzerinde yapılan bir çalışmada köklerden yedi pterokarpan sınıfı izoflavonoit bileşiği elde edilmiştir. Bu bileşiklerin yapıları inermin, trifolian, homopterokarpan, medikarpan, 4-metoksi-medikarpan ile inermin ve medikarpanın glukozitleridir (51).



R= H İnermin

R= CH₃ Trifolian



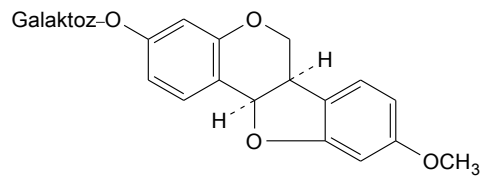
R₁= R₂= H Medikarpan

R₁= β -Glukoz R₂= H Medikarpan glikoziti

R₁= H R₂= OCH₃ 4-Metoksimedikarpan

R₁= OCH₃ R₂= H Homopterokarpan

T. pratense kökleri üzerinde sürdürülen çalışmalarda elde edilen trifolirhizin ve inermin-3-O- β -D-galaktopiranozit bileşiklerinin her ikisi de pterokarpan sınıfından ve inermin türevi bileşiklerdir (43, 51).



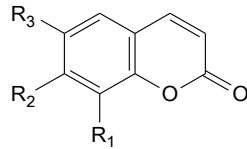
İnermin-3-O- β -D-galaktopiranozit

2.2.1.3. Kumarinler

T. pratense'den 1965 yılında bir kumarin bileşiği izole edilmiş fakat yapı tayini gerçekleştirilememiştir (35). Daha sonraki yıllarda *T. pratense*'den

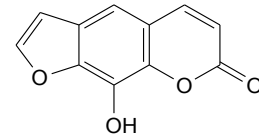
YBSK tekniği yardımıyla kumarin yapısında; skopoletin, fraksidin, ksantotoksol, kumestrol, dafnoretin gibi bileşikler izole edilerek yapıları aydınlatılmıştır (22, 121).

T. repens üzerinde yapılan çalışmalarda bitkiden dafnoretin, 6',7'-dihidroksibenzofuro [3',2',-3,4] kumarin izole edilerek kumestrol olarak isimlendirilmiştir (19, 83, 121). Aynı bitkiden 7,7'-dihidroksi-6,8'-biskumarinil bileşiği elde edilmiş ve bileşik bikumol olarak isimlendirilmiştir. Ayrıca bitkide umbelliferon (7-hidroksikumarin) bulunduğu da tespit edilmiştir (135).

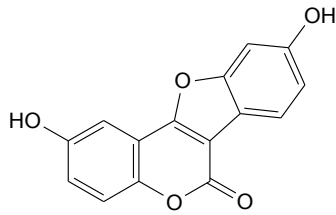


R₁= H, R₂= OH, R₃= OCH₃ Skopoletin

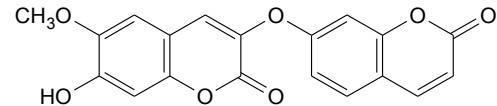
R₁= OH, R₂= OCH₃, R₃= OCH₃ Fraksidin



Ksantotoksol

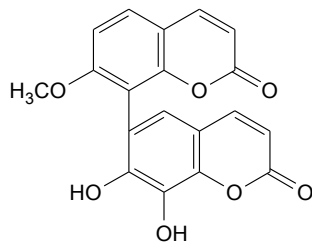


Kumestrol

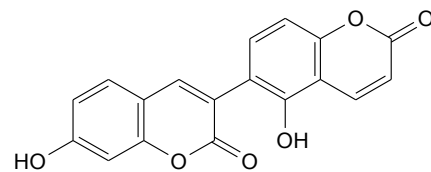


Dafnoretin

T. repens'in etanollü ekstresi ile yapılan bir çalışmada iki yeni biskumarin bileşiği repensin A ve repensin B izole edilmiştir (158).



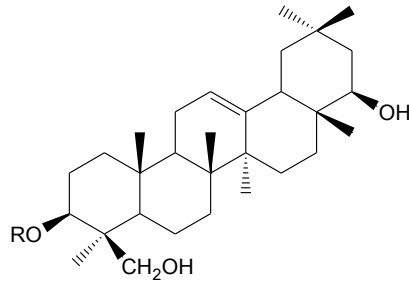
Repensin A



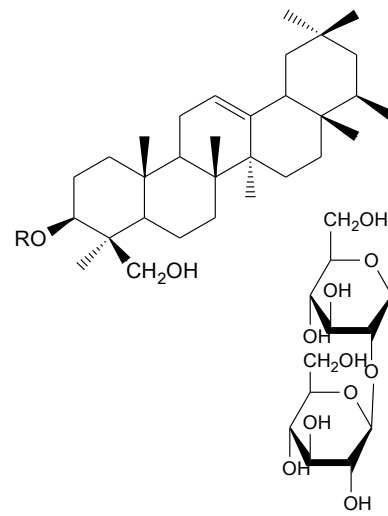
Repensin B

2.2.1.4 Saponinler

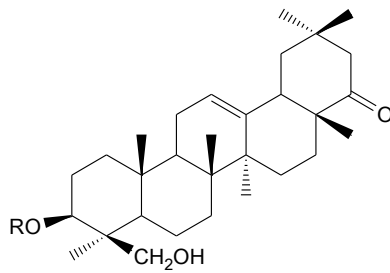
T. alexandrinum tohumlarından bersimozit II, dehidroazukisaponin V soyasaponin I, azukisaponin V, soyasapogenol B, bersimozit I, prosapogenin, dehidrosoyasaponin I, soyasapogenol E, sofroraflozot II ve oksitrogenin gibi çok sayıda oleanan tipi triterpen saponinler izole edilmiştir (88).



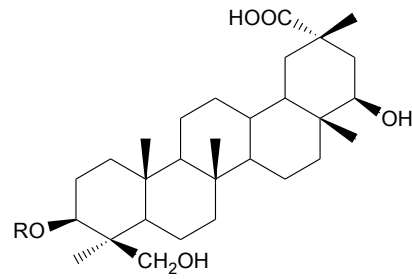
R=S-1, [R₁=Me] Soyasaponin I metil ester
 R=S-2 Azukisaponin V metil ester
 R= H Soyasapogenol B

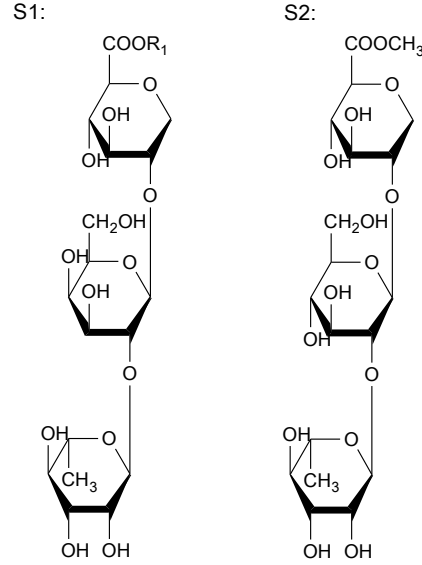


R=S-1, [R₁=Me] Bersimozit I metil ester
 R=H Prosapogenin
 R=S-2 Bersimozit II metil ester



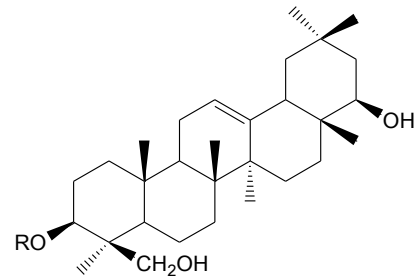
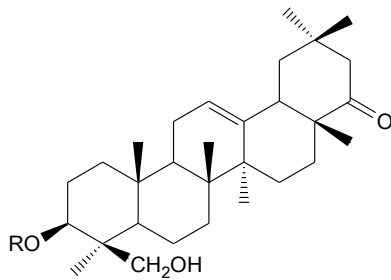
R=S-1, R₁= Me Dehidrosoyasaponin I metil ester R=S-1, R₁=H Sophoraflozot II metil ester
 R=S-2 Dehidroazukisaponin V metil ester
 R=H Oksitrogenin
 R=H Soyasapogenol E





Trifolium resupinatum tohumlarından soyasaponin I, 3-O-[α -L-ramnopiranozil(1 $\rightarrow$ 2)- β -D-galaktopiranozil(1 $\rightarrow$ 2)- β -D-glukopiranozil]-22-O-[β -D-glukopiranozil(1 $\rightarrow$ 2)- β -D-glukopiranozil]soyasapogenol B, soyasaponin II, 3-O- β -D-glukopiranozil sitosterol, 3-O- β -D-glukopiranozil stigmasterol, 3-O- α -L-arabinopiranozil-(1 $\rightarrow$ 6)- β -D-glukopiranozil]okt-1-en-3-ol ve 3-O- α -L-ramnopiranozil(1 $\rightarrow$ 2)- β -D-galaktopiranozil(1 $\rightarrow$ 2)- β -D-glukopiranozil]-22-O- β -D-glukopiranozil soyasapogenol B izole edilmiştir (133).

T. repens'in toprak üstü kısımlarından triterpen saponin yapısında beş bileşik elde edilmiş ve bileşiklerin yapıları kloversaponin I-V, ayrıca β -D-glukuronopiranozil soyasapogenol B, soyasaponin I, soyasaponin II, azukisaponin II ile bu bileşiklerin metil esterleri olarak tayin edilmiştir (124).



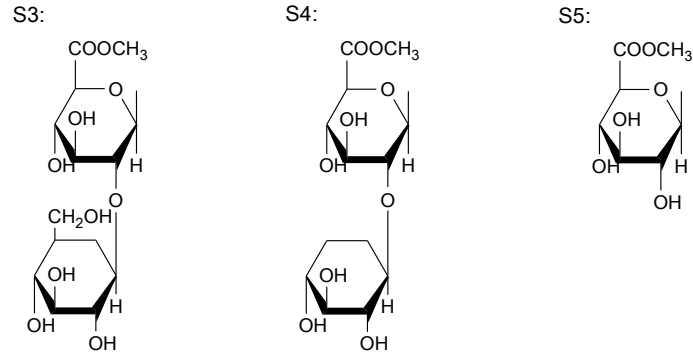
$R_1 = H$, $R_2 = S-5$ Kloversaponin I metil ester

$R = S-4$ Klover saponin IV metil ester

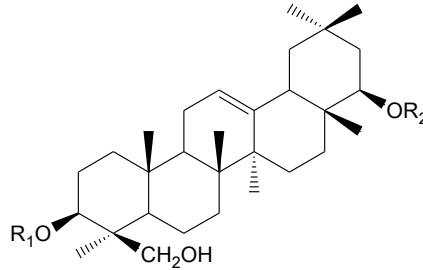
$R_1 = COOCH_3$, $R_2 = S-5$ Kloversaponin II metil ester:

$R_1 = COOCH_3$, $R_2 = S-3$ Kloversaponin III metil ester

$R_1 = COOCH_3$, $R_2 = S-4$ Kloversaponin V metil ester



57 *Trifolium* türünün tohumları üzerinde yapılan bir çalışmada, soyasapogenol B glikozitlerin varlığı araştırılarak miktar tayinleri yapılmıştır. İncelenen bütün türlerde soyasaponin I ve bazı türlerde astragalozit VIII ve soyasaponin I'in 22-O-glukozit'i ile 22-O-diglukozit'i bulunmuştur. soyasapogenol B glikozitlerinin Fabaceae familyası için kemotaksonomik açıdan önemli bileşikler olabileceği ileri sürülmüştür (99).



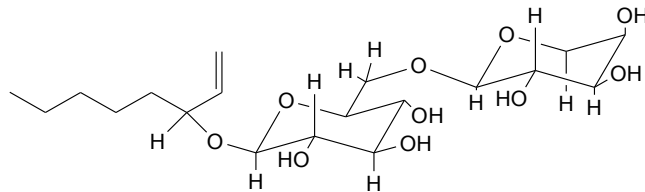
$R_1 = -\text{Glu} \leftarrow \text{Gal} \leftarrow \text{Ram}$ $R_2 = \text{H}$ Soyasaponin I

$R_1 = -\text{Glu} \leftarrow \text{Ksi} \leftarrow \text{Ram}$ $R_2 = \text{H}$ Astragalozit VIII

$R_1 = -\text{Gu} \leftarrow \text{Gal} \leftarrow \text{Ram}$ $R_2 = -\text{Glu}$ Soyasaponin glukozit

$R_1 = -\text{Glu} \leftarrow \text{Gal} \leftarrow \text{Ram}$ $R_2 = -\text{Glu} \leftarrow \text{Glu}$ Soyasaponin diglukozit

Glu: β -glukopiranozit; Gal: β -galaktopiranozit, Ksi: β -ksilopiranozit

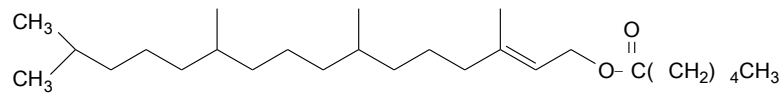


3-O-[α -L-arabinopiranozil-(1 $\rightarrow$ 6)- β -D-glukopiranozil]okt-1-en-3-ol

2.2.1.5. Lipitler

T. resupinatum var. *microcephalum* bitkisinin dikolorometan ile ekstre edilerek fraksiyonlanması ile lipit yapısında 3-metil-1-nonen-3-ol ve 2',3'-dihidroksi propil pentadekanoat ile fitil-1-hekzanoat elde edilmiştir (118).

T. balansae üzerinde yapılan bir çalışmada bitkiden fitilester, fitil-1-hekzanoat ve pentakozanol izole edilmiştir (117).



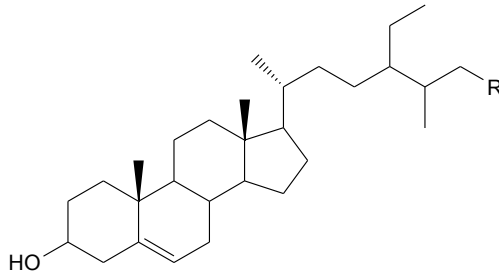
Fitil-1-hekzanoat

T. pratense yapraklarındaki asetonda çözünen trigliseritlerin, digliseritlerin, sterol esterlerin, serbest sterollerin ve hidrokarbonların incelendiği bir çalışmada, bu lipitlerin total ekstrenin sırasıyla % 1,5, % 0,60, % 0,57, % 0,80 ve % 0,38'inde bulunduğu, serbest ve kombine sterollerin, β -sitosterol içerdiği bildirilmiştir. Fraksiyonların yağ asiti içeriği incelendiğinde ise, digliseritlerin %50'den fazla oranda palmitik asit taşıdığı, linoleik ve linolenik asitlerin ise ana bileşen olarak, sterol esterlerin ve trigliseritlerin yapısında bulunduğu gösterilmiştir (152). Daha sonra yine aynı araştırmacı tarafından *T. pratense* yaprakları üzerinde yapılan bir başka çalışmada da bitkinin lipitlerinin ekstraksiyonundan sonra asetonla kristallendirme yapılmış ve asetonda çözünmeyen kısımlar fraksiyonlandığında bu kısmın ağırlık olarak %23'ünün mum, %25'inin galaktolipit ve %52'sinin fosfolipit olduğu; fosfolipit bileşiminin fosfatidilkolin, fosfatidilgliserol, fosfatidiletanolamin ve fosfatidillinositollerden oluştuğu bulunmuştur. Ayrıca fosfatidilgliserol fraksiyonunda da 16 karbonlu doymamış bir yağ asidine rastlanmıştır (153). *T. pratense* yapraklarının lipit fraksiyonlarındaki metil esterlerini oluşturan yağ asitlerini izole etmek için, total fosfolipitler gaz kromatografisi ile incelenmiştir. Saf halde izole edilen asit trans-3-hekzadekanoik asit olarak tanımlanmıştır. *Trans* asitlerin *T. pratense* yapraklarındaki toplam yağ asitlerinin yaklaşık % 1.4'ünü oluşturduğu bildirilmiştir (154).

T. pratense ve *T. resupinatum* türlerinin yapraklarındaki yüzey lipitleri de incelenmiştir. *T. pratense* ve *T. resupinatum* türlerinde bulunan yüzey lipitlerinin sırasıyla % 27,7 ve % 30,3'ünü yağ asitlerinin; %26 ve %14'ünü ise esterlerin oluşturduğu bulunmuştur. Ayrıca hidrokarbonların da zincir uzunlukları C25 ile C35 arasında değişen 11 *n*-alkenlerini içerdiği bildirilmiştir (142).

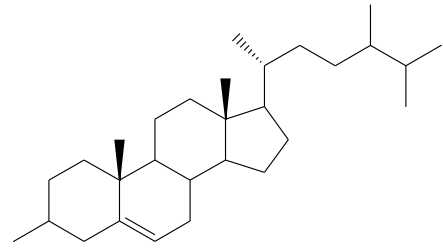
2.2.1.6. Steroitler

T. balansae'den stigmast-5-en-3 β ,26-diol, stigmast-5-en-3-ol, ve kemfesterol izole edilmiştir (117).



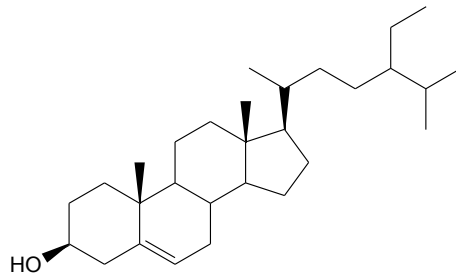
R= OH Stigmast-5-en-3 β ,26-diol

R= H Stigmast-5-en-3-ol

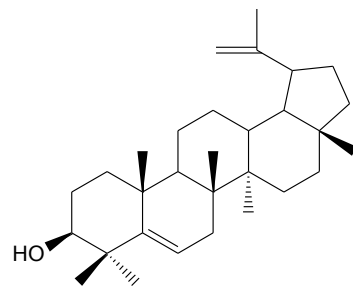


Kempfesterol

T. resupinatum var. *microcephalum* bitkisinin diklorometan ile ekstre edilerek fraksiyonlanması ile bitkiden ikisi yeni altı bileşik izole edilmiştir. İzole edilen lipid yapısındaki yeni bileşikler; 3-metil-1-nonen-3-ol ve 2',3'-dihidroksi propil pentadekanoat'tır. Bu çalışmada ayrıca β -sitosterol, lupeol ve fitil-1-hekzanoat bileşikleri de elde edilmiştir (118).



β -Sitosterol



Lupeol

2.2.1.7. Uçucu Bileşikler

T. strictum, *T. glanduliferum* ve *T. subterraneum* bitkilerinin olgun yaprakları üzerinde yapılan bir çalışmada, uçucu bileşikler incelenmiştir. Uçucu bileşiklerin yapısının alkol, aldehit, keton, asit, oksijenli heterosiklik bileşikler ve terpenlerden oluştuğu bildirilmiştir (151).

T. pratense'nin kurutulmuş yaprakları üzerinde yapılan bir çalışmada, 100 g kuru yaprakta 11,45 mg (% 28,63) 1,4-Sineol, 3,25 mg (% 8,13) mentol, 6,77 mg (% 16,93) menton, 5,11 mg (%12,78) α -tuyon olduğu tespit edilmiştir (1).

1,5 ve 2,5 yıllık *T. pratense* bitki örneklerinin kök ekstraktları üzerinde yapılan bir çalışmada köklerde bulunan uçucu bileşikler incelenmiştir. Bitkide uçucu bileşik olarak n-butil asetat, *E*-2-hekzenal, α -pinen, benzaldehit, 6-metil-5-hepten-2-on, limonen, asetofenon, metilbenzoat, oktanoik asit, dekanal olduğu bulunmuştur. 1,5 ve 2,5 yıllık bitkilerdeki uçucu bileşik konsantrasyonları karşılaştırıldığında; metil benzoat konsantrasyonunun değişmediği; *E*-2-hekzenal konsantrasyonunun ise geçen bir yılda azalmış olduğu, limonen konsantrasyonunun ise arttığı gözlenmiştir (140).

T. pratense yaprak, çiçek ve tohumlarının böcek çekici özelliklerinden yola çıkılarak yapılan bir çalışmada, bitkinin uçucu bileşikler olarak alifatik ketonlar, aldehitler, alkoller, esterler, asitler, terpenoitler ve aromatik bileşikler taşıdığı belirlenmiştir. Yapraklardaki başlıca uçucu bileşikler (*Z*)-3-hekzenil asetat, (*Z*)-3-hekzenol, (*E*)- ve (*Z*)- β -osimenler; çiçeklerdeki başlıca uçucu bileşikler asetofenon, metil sinamat, 1-feniletanol; tohumlardaki başlıca uçucu bileşikler ise (*E*)- ve (*Z*)- β -osimenler, longifolen ve yapısı aydınlatılmamış bir seskiterpen hidrokarbon olarak tespit edilmiştir (28).

T. pratense uçucu yağları üzerinde yapılan bir başka çalışmada, taze toplanmış, kuru ve depolanmış bitki olmak üzere 3 farklı *Trifolium* örneğinin uçucu organik bileşenleri GC ve GC/MS yöntemleri ile incelenmiştir. Taze bitki örneğinde en çok rastlanan maddelerin; 3-oktanol, 6,10,14-trimetil-2-pentadekanon, benzaldehit, (*Z*)- β -karyofillen, β -farnesen, 3-metil-1-butanol,

3-oktanon olduğu bulunmuştur. Kuru bitki örneğinde 3-metilbutanol ve 1-hekzanol gibi alkollerin, aldehitlerin ve düşük kaynama noktasına sahip ketonların yüzdelerinin azaldığı; en çok saptanan maddelerin bir seskiterpen olan β -farnesen ve bir fitol degradasyon ürünü olan 6,10,14-trimetil-2-pentadekanon olduğu belirtilmiştir. Depolanmış bitki örneğinde fermentasyon sonucu olarak esterler en yüksek orandaki (% 46) grup olarak saptanmıştır. 1-okten-3-ol ise kuru bitki örneğinde olmasına karşın taze bitkide bulunmamıştır (48).

T. pratense ve *T. repens* türlerinin uçucu yağlarının incelendiği bir çalışmada örneklerde yer alan 50'den fazla bileşiğin yapısı aydınlatılmıştır. *T. pratense*'de maltol, linalool, 1-feniletılalkol, fenol, feniletılasetat, asetofenon, (Z)-3-hekzenil asetat; *T. repens*'te ise maltol, linalool, fenol, feniletıl asetat, 2-feniletıl alkol başlıca bileşikler olarak tespit edilmiştir (25). Aynı türler üzerinde yapılan bir başka çalışmada ise uçucu yağların analizinde asit, fenol, aldehit, keton, alkol esterleri, hidrokarbonlar ve başka bazı bileşikler olmak üzere 80 kadar bileşik bulunmuştur. *T. pratense*'nin uçucu yağının hidrokarbonlarca, *T. repens*'in uçucu yağının ise alkol ve esterlerce zengin olduğu bildirilmiştir (69).

2.2.1.8. Siyanogenetik Glikozitler

Siyanogenetik heterozitlere *Trifolium* cinsinde özellikle *T. repens*'te rastlanmıştır. Siyanogenetik glukozit miktarı bitkinin yetiştii coğrafik bölge, sıcaklık, bitkinin genotipi ve başka birçok faktöre bağlıdır. *Trifolium* türlerinin farklı kısımlarında değişik miktarlarda siyanogenetik glikozitlere rastlanmıştır. Özellikle yapraklarda, köklerde, petiollerde ve pedinkullarda yüksek oranda siyanogenetik glukozit bulunduğu bildirilmiştir (10, 102).

T. repens'te linamarin ve R-lotaustralin siyanogenetik glukozitleri bulunur. Siyanogenetik glukozitler ve onların hidrolizinden sorumlu olan linamaraz enzimi, bitkinin hasar görmesinden bağımsız olarak bitki yapraklarında hazır halde bulunur (37).

T. repens'te bulunan siyanogenetik glikozitlerin varlığını tespit etmek için hızlı ve yarı-kantitatif bir yöntem geliştirilmiştir. Bu işlem pikrat yöntemine dayanmaktadır. Bu yöntemde standart çözeltideki siyanid ile pikrat kağıdı üzerinde oluşan renk reaksiyonunun spektroskopik yoğunluğu (kırmızı, yeşil, mavi bantlar) arasındaki kalibrasyon ilişkileri kullanılarak *T. repens* yaprağındaki hidrosiyanik asit konsantrasyonu hesaplanmaktadır (10).

Siyanogenetik potansiyelin belirlenmesinde kullanılan alkalin pikrat reaksiyonunun kolorimetrik değerlendirilmesi yöntemine alternatif olarak *T. repens* üzerinde yapılan bir çalışmada spektrofotometre yöntemi kullanılmıştır. Bu yöntemde bitki tarafından salınan hidrojen siyanit miktarı tam olarak belirlenebilmektedir. Siyanogenetik glukozitler, β -glukozidaz enzimi ile hidroliz olduğu için aynı deney, ortama bu enzim de dahil edilerek tekrarlanmıştır. Deney sonucunda ortama eklenen enzimin oluşan siyanit miktarını artırmadığı gözlenmiştir (141).

T. repens'in 8 farklı kültür örneğinin değişik ekim sıcaklıklarındaki siyanogenetik glukozit miktarı karşılaştırılmıştır. 15 °C'nin altında tüm örneklerin siyanogenetik glukozit miktarları en yüksek seviyededir. Sıcaklıktaki artış özellikle yaz mevsiminde, siyanogenetik glikozit sentezinde azalmaya neden olur (136).

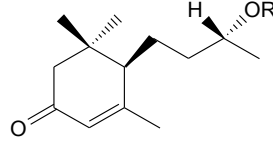
Başka bir çalışmada da 8°C -27°C dışındaki sıcaklıklarda, aynı bitkide siyanogenetik glikozit miktarı az bulunmuştur. Bu çalışmada fideler karanlıkta ve ışık alan ortamda yetiştirilerek siyanogenetik glukozit üretimleri de karşılaştırılmıştır. Karanlıkta yetişen fidelerdeki siyanogenetik glukozit üretiminin diğerlerine göre % 50 daha fazla olduğu bulunmuştur (37).

2.2.1.9. Megastigman Glikozitleri

T. alexandrinum bitkisinin tohumlarının metanollü ekstesinden ters faz kolon kromatografisi ve preparatif YBSK teknikleri kullanılarak 5 megastigman glikoziti izole edilmiştir. Bu bileşiklerden iki tanesi daha önce başka bitkilerden de izole edilip yapıları aydınlatılmış olan (6*S*,7*E*,9*R*)-6,9-dihidroksimegastigma-4,7-dien-3-on-9-*O*- β -D-glukopiranozit (rozeozit) ve

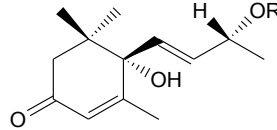
(6*R*,7*E*,9*R*)-9-hidroksimegastigma-4,7-dien-3-on-9-*O*-β-D-glukopiranozit'tir.

Diğer bileşikler ise oz ünitesi olarak apiofuranozil-(1→2)-glukopiranozit yapısı taşıdıkları belirlenen yeni bileşiklerdir. Bu bileşikler trifostigmanozit I-III olarak isimlendirilmişlerdir (89).



R= Glu ² Api Trifostigmanozit III

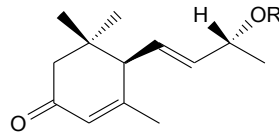
R= H Blumenol C



R=Glu Rozeozit

R=H Vomifoliol

R=Glu ² Api Trifostigmanozit I



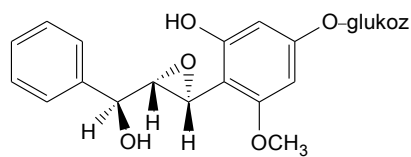
R= Glu (6*R*,7*E*,9*R*)-9-hidroksimegastigma-4,7-dien-3-on-9-*O*-β-D-glukopiranozit

R= H (6*R*,7*E*,9*R*)-9-hidroksimegastigma-4,7-dien-3-on

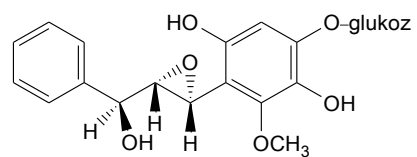
R= Glu ² Api Trifostigmanozit II

Glu: β-glukopiranoz, Api: β-apiofuranoz

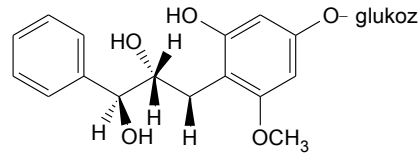
Aynı bitki üzerinde yapılan bir başka çalışmada bitkinin tohumlarından üç kalkanol glikoziti izole edilmiştir. Spektroskopik analizlerle yapısı aydınlatılan bileşiklerin ikisi α'-kalkanol-α,β-epoksit'leri olup (trifokalkanolozit I ve II) diğeri α-β-dihidroksi- α'-kalkanol (trifokalkanolozit III) 'dür (90).



Trifokalkanolozit I



Trifokalkanolozit II

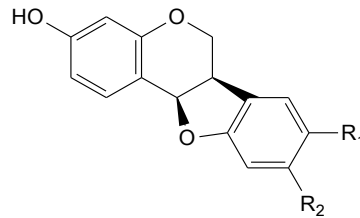


Trifokalkanolozit III

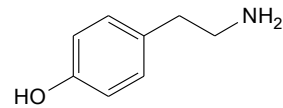
2.2.1.10. Diğerleri

T. resupinatum var. *microcephalum* bitkisinden bir alkenol ve bir alkil glukozit izole edilerek yapıları sırasıyla 4,15-dimetil-5-(1,2-dihidroksietil)-hekzadeken ve 1-undeken-1-O- β -2',3',4',6'-tetraasetil glukopiranozit olarak aydınlatılmıştır (119).

T. pratense'den YBSK ile maakiain ve medikarpin adı verilen iki bileşik izole edilmiştir. Ayrıca aynı çalışmada ekstenin sulu fraksiyonlarında, bazı aminoasitlerin bozunma ürünü olduğu düşünülen tiramin adlı bir madde daha bulunmuştur (22).



$R_1 = \text{OCH}_2\text{O}$, $R_2 = \text{OCH}_2\text{O}$ Maakianin
 $R_1 = \text{H}$, $R_2 = \text{OCH}_3$ Medikarpin



Tiramin

2.2.1.11. İzoflavonoitlerin Stabilitesi ve İzolasyon Teknikleri İle İlgili Çalışmalar

Bitkilerdeki doğal maddelerin stabilitesi, ışık sıcaklık gibi fiziksel faktörlerden ve pH, çözücü sistemleri gibi kimyasal faktörlerden etkilenir. İzoflavonlar UV fotodegradasyonuna karşı hassastırlar. Daidzein ve formononetin'in asetonitril, metanol, hekzan gibi çeşitli organik solvanlardaki çözeltileri güneş tipi radyasyona maruz kaldıklarında fotodegradasyona

uğrarlar. İzoflavonların degradasyonu maksimum absorpsiyonlarındaki (250 nm civarı) düşüşle ve floresans emisyonlarındaki değişikliklerle tespit edilebilir. Bu nedendir ki izoflavon içeren standart, numune ve diğer bütün preparatların karanlıkta saklanması önerilir (148).

Yüksek sıcaklıklar da izoflavonların stabilitesini etkilemektedir. Daidzin ve genistin'in malonil ve asetil konjugatlarının stabilitesinin 25 °C, 80 °C ve 100 °C'de ve değişik pH değerlerinde çalışıldığı araştırmalarda, yüksek sıcaklıkta tüm türevlerin hidroliz oldukları görülmüştür. Saklama koşullarının sıcaklığının, ekstraktlerdeki izoflavon türevlerinin stabilitesini etkilediği görüldüğünden, çalışılacak örneklerin dondurularak saklanması önerilmiştir (148).

İzoflavonoit izolasyonu için uygun yöntem ve koşulları saptamayı hedefleyen birçok çalışma vardır. Temel olarak izoflavonların analizi sırasıyla; örneklerin toplanması, bitki dokularının toplanması, örneğin homojenizasyonu, ham ekstraktlerin elde edilmesi ve saflaştırılması, bileşiklerin ayrılması ve tanımlanması, bileşiklerin tespiti ve miktar tayini ve sonuçların yorumlanması basamaklarından oluşur. Önceleri solvan ekstraksiyonu kullanılırken günümüzde iki fazlı sistemde sıvı ekstraksiyonu daha çok tercih edilmektedir. İzoflavonların ekstraksiyonunda yüksek yoğunluklu ultrason destekli ekstraksiyon (sonikasyon) ve mikrodalga destekli ekstraksiyon (MAE) teknikleri de başarıyla kullanılmıştır. Daidzein, genistein, formononetin ve biokanin A, *speed ABN* kartuşları kullanılarak % 90 ekstraksiyon verimiyle elde edilmiştir. Genellikle ön temizleme için kullanılan bu yöntem, bitkilerdeki izoflavonların hızlı bir şekilde elde edilmesini mümkün kılmıştır. Daha sonra bu yöntem geliştirilerek çift boyutlu katı faz ekstraksiyonu (2-D SPE) kullanılmış, bu yöntemle *T. pratense*'den 14 izoflavon glikozit malonati ve 6 asetil glikozit izole edilmiştir (72, 148).

İzoflavonoitlerin ayrılmasında ince tabaka kromatografisi ve poliamit dolgu materyalinin kullanıldığı kolon kromatografisi uygulanan yöntemler arasındadır. İzoflavon tayini çalışmalarında YBSK en çok uygulanan yöntemdir (41, 52, 71, 73, 75, 109, 111, 122, 128, 157).

YBSK yönteminin uzun analiz süreleri ve kısa kolon ömürleri gibi dezavantajları değerlendirilerek alternatif yöntem bulmayı hedefleyen bir çalışmada *T. pratense* izoflavonoitleri (biokanin A, daidzein, genistein) elektrokimyasal dedektörlü kapiler elektroforez (CE-ED) ile belirlenmiştir. Çalışmanın sonucunda kullanılan yöntemin az miktarda numune kullanılarak gerçekleştirilebileceği, yüksek çözünürlükte ve hassasiyette ucuz bir yöntem olduğu ileri sürülmüştür (104, 148).

Daidzein, genistein, formononetin, biokanin A ve kumestrol ekstraksiyonu ve miktar tayini için yapılan çalışmada numune olarak değişik bölgelerde yetişen legümenler ve yöntem olarak Diod-array ters faz YBSK kullanılmıştır. Ekstraksiyon esnasında asit hidroliz yapılarak bileşikler aglikonlarına çevirilmiştir (52).

İzoflavonoit analizi için U-YBSK tekniği ile taşıyıcı fazları değiştirerek en uygun koşulları bulmayı hedefleyen bir çalışmada, ters faz kolon, fenil kolon ve siyanopropil kolon sistemleri denenmiştir. Çalışma sonucunda daidzein gibi kompleks yapılar için metanolün ayırıcı etkisinin asetonitrile göre daha yüksek olduğu; daidzein ve genistein'in alıkonma zamanlarının formononetin ve biokanin A'ya göre daha kısa olduğu için formononetin ve biokanin A'nın elüsyonu amacıyla daha yüksek konsantrasyonda metanol kullanılması gerektiği ileri sürülmüştür. Çalışmada izoflavonlar için ters faz kolonda değişik konsantrasyonlarda metanol/asetik asit mobil fazı kullanılarak daha iyi ayırım yapılabildiği ve 270 nm dalga boyunun ideal dalga boyu olduğu bulunmuştur. U-YBSK tekniği ile izoflavonların temel ayırımı 1,9 dakikada yapılmıştır. Çalışma, izoflavon ayırımı için ters faz veya daha polar siyanopropil veya fenil taşıyıcı fazlarının U-YBSK sisteminde kullanılabileceğini ortaya koymuştur (73).

Sıvı- sıvı ayırımına dayanan yüksek hızda karşı akım kromatografisi de flavonoitlerin ayırımında kullanılmıştır. İmmünokimyasal analiz, izoflavonoitlerin bitki materyalinde ve farmasötik preparatlarda tanımlanmasını sağlayan önemli tekniklerden birisidir. Geçmişte kullanılan

radioaktif işaretleme (RIA: radioimmunoassay) yöntemlerinin yerini, günümüzde ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*) almıştır (148).

T. pratense'deki izoflavon malonil glukozitlerin ekstraksiyonunun karmaşık olduğundan yola çıkarak yapılan bir çalışmada bir β -glukozidaz enzim inhibitörü olan Tris kullanılarak malonil glukozitlerin aglikonlara dönüşmesi engellenmiştir. Tris kullanılarak veya kullanılmadan *T. pratense*'nin değişik kısımları üzerinde ve çeşitli Fabaceae türlerinde karşılaştırmalı çalışmalar yapılmıştır. Ekstraksiyon sonucunda izoflavonlar incelenmiş, dejeneratif β -glukozidaz enzimlerinin miktarı ve aktivitesinin bitki türlerine ve bitkinin kısımlarına göre değiştiği bildirilmiştir (144).

İzoflavonoitlerin belirlenmesinde UV-Vis dedektörleri, genellikle de diyot-array dedektörler (DAD) tercih edilir. Mass (MS) dedektörler ise izoflavonların aglikonlarını, türevlerini veya glikozitlerini ya da diğer konjugatlarını belirlemede kullanılır (148).

T. pratense ve başka bazı bitkilerdeki uçucu yağların hızlı ve kolay tespiti ve miktar tayini için ise Headspace Single-Drop Microextraction (HS-SDME) yönteminin kullanılabileceği bildirilmiştir (1).

2.2.1.12. *Trifolium* İzoflavonoitlerinin Miktar Tayini Çalışmaları

T. pratense bitkisinden hazırlanan ticari bir ürünün YBSK ile incelenmesi sonucunda ekstrenin %35,54 izoflavonlar, %1,11 flavonoitler, %0,06 pterokarpanlar, %0,03'ten az kumarinler, %0,03'ten az tiramin taşıdığı bildirilmiştir (22).

Farklı *T. pratense* ekstreleri serbest izoflavon içerikleri açısından karşılaştırılmıştır. Bu amaçla *T. pratense*'nin *n*-hekzan, kloroform, *n*-butanol, metanol ve sulu ekstreleri hazırlanmış ve tüm ekstrele trifloroasetik asitle pH'sı 3'e ayarlanmış % 80 metanol kullanılarak hidroliz işlemi uygulanmıştır. Hidroliz işlemi sonrasında ham ve hidrolize ekstrelerdeki serbest izoflavon

miktarları karşılaştırılmıştır. En yüksek izoflavon içeriğinin hidroliz edilmiş kloroform ekstresinde bulunduğu tespit edilmiştir (155).

7 *Trifolium* türünün gövde, yaprak ve çiçeklerindeki genistein, daidzein, formononetin ve biokanin-A konsantrasyonları YBSK metodu kullanılarak karşılaştırılmıştır. Hipersil ODS kolon ve hareketli faz olarak % 55 metanol % 45 KH_2PO_4 çözeltisi kullanılan çalışmada; *T. montanum*, *T. fragiferum*, *T. incarnatum* ve *T. repens*'teki izoflavon konsantrasyonunun düşük olduğu bulunmuştur. *T. alpestre*, *T. pratense*, *T. subterraneum* türlerinde ise izoflavon miktarının yukarıdaki bitkilerden daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Bitki organlarının karşılaştırılması sonucunda; çiçekte en yüksek oranda genistein (*T. subterraneum*), daidzein (*T. pratense*), biokanin-A (*T. alpestre*) bulunmuştur. *T. subterraneum* ve *T. pratense* yapraklarının ve çiçeklerinin fraksiyonları benzer oranları gösterirken, *T. pratense*'nin yaprağındaki daidzein oranı çiçeğe göre daha düşüktür. Gövde fraksiyonlarının toplam izoflavon konsantrasyonlarının genel olarak düşük olduğu fakat istisna olarak *T. pratense*'nin gövdesindeki daidzein oranı ile *T. subterraneum*'un gövdesindeki daidzein ve biokanin-A oranının yüksek olduğu bildirilmiştir (150).

Glomus mossaea simbiyotik mantarı ile aşılansmış *T. pratense*'deki izoflavonoidlerin miktar tayinleri yapılarak değişim olup olmadığının incelendiği bir çalışmada mantarın, bitkinin kök ve sürgünlerindeki biokanin A miktarını arttırdığı, sürgünlerdeki genistein miktarını ise azalttığı bulunmuştur. Diğer izoflavonoidlerin miktarı etkilenmemiştir (70).

2.2.2. *Trifolium* Türlerinin Kullanılışları ve Biyolojik Etkileri

2.2.2.1. Kullanılış

Türkiye bitki örtüsünde doğal olarak yetişen *T. ambiguum* Erzurum ve Kars'ta "kuş elması, at elması"; *T. spadiceum* Kars, Çıldır'da "çayır dutu"; *T. cherleri* Antalya'nın Akseki ilçesinde "tokalı dücük" isimleriyle tanınan bitkilerdir. Ayrıca Türkiye genelinde *T. incarnatum* "kırmızı üçgül"; *T. hybridum* "melez üçgül"; *T. pannonicum* "üçgül"; *T. subterraneum* "yer altı üçgülü"; *T. fragiferum* "çilek üçgülü"; *T. medium* "üçgül"; *T. nigrescens* "Anadolu üçgülü"; *T. alexandrinum* "İskenderiye üçgülü"; *T. resupinatum* "İran üçgülü" olarak isimlendirilir (14, 44, 120).

T. pratense "kırmızı yonca, çayır tıfılı, çayır üçgülü" adıyla bilinir ve halk arasında çiçekleri balgam söktürücü, antiseptik ve yatıştırıcı olarak kullanılır. *T. pratense* var. *pratense* "üçkulak" ismiyle bilinir ve yaprakları haricen yara iyi edici olarak kullanılır (132). *T. arvense* ise "yonca, üçgül" olarak isimlendirilir ve halk arasında kabız yapıcı olarak, "beyaz yonca veya aküçgül" olarak isimlendirilen *T. repens*'in çiçekli dalları ise kuvvet verici ve romatizma ağrılarını dindirici olarak kullanılır (15, 120). Artvin'in Yusufeli ilçesinde ve Türkiye'nin diğer bazı bölgelerinde *Trifolium* türlerinden hazırlanan bir macunun kanayan yaralara sürüldüğü bildirilmiştir (101).

Homeopatik Materia Medica'da *T. pratense*'nin tükürük bezlerini uyardığı, kabakulakta faydalı etkileri olduğu, pankreası etkilediği ve antikanser etkisinin olduğu belirtilmiştir. Ülserasyon gelişmeden önce kullanıldığında kanserli tümör oluşumunu geciktirdiği, kanser tedavisinde çiçeklerinin kullanıldığı kayıtlıdır (103). Çin tıbbında, *T. pratense* sedatif olarak, ağrı için, kanserle ilgili semptomlarda, romatizmada ve gut tedavisinde kullanılır (96). *T. pratense* çiçekleri Güney Amerika'da antispazmodik, kan temizleyici olarak ve kronik deri hastalıklarında, ekzema ve sedefte yaraları iyileştirmek için kullanılmaktadır (41, 45). Ayrıca kanser tedavisinde kullanılan bir alternatif tıp preparatı olan Hoxsey'in bileşiminde yer almaktadır (41). *T. pratense* bazı bölgelerde halk arasında sedef ve

egzema gibi kronik deri hastalıklarında, atlet ayağında, yaralarda, yanıkta, ülserli cilt hastalıklarında, akne ve çıban gibi iltihaplı cilt hastalıklarında, öksürük ve boğmacada ekspektoran olarak kullanılmaktadır (38, 45, 48, 96). *T. pratense* çiçeklerinden hazırlanan infüzyonlar, Bulgaristan ve İtalya'da halk arasında dahilen, antitusif, diüretik ve mukoza sekresyonu düzenleyici olarak, haricen ise antienflamatuvar olarak kullanılır (79). Katalonya'da halk arasında, *T. pratense*'nin toprak üstü kısımları anne sütünü artırıcı amaçla doğrudan yenilerek kullanıldığında, midede şişkinliğe yol açtığı bildirilmiştir. *T. pratense* Akdeniz ve Kızıldeniz ülkelerinde toprağı iyileştirmek için dönemler halinde ekilir. Ayrıca bu bölgelerde kanser, meme iltihabı, eklem bozuklukları, sarılık, bronşit ve astım gibi rahatsızlıklarda halk ilacı olarak kullanılır (48). *T. pratense*'nin batılı ülkelerde menopozal semptomlarda ve premenstrüel sendromda kullanıldığı bildirilmiştir (77, 82, 97). Yunanistan'da halk arasında kullanılan bitkilerin satıldığı bir markette yapılan araştırmada, *T. pratense*'nin toprak üstü kısımlarından infüzyon veya haricen kullanılmak üzere kompres hazırlanarak diyabet, anemi, öksürük, bronşit, egzema, sedef gibi hastalıklarda önerildiği, kan temizleyici, iştah açıcı, stimulan, antikonvülsan olarak kullanıldığı yapılan literatür çalışmalarında tespit edilmiştir (61).

Nepal'de yapılan bir etnobotanik çalışmada, *T. repens*'ten ezilerek ve taşlanarak hazırlanan hamurun antiseptik olarak kesiklere ve yaralara uygulandığı belirtilmiştir (116). Güney İspanya'da *T. repens*'in yapraklarından hazırlanan infüzyon halk arasında böbrek işlev bozukluklarında ve ayrıca diüretik amaçla kullanılmaktadır (18). *T. repens* Cezayir'de cilt hastalıklarında kullanılmaktadır (59). Portekiz'in kuzeyinde *T. repens* çiçekleri kanserde, gutta, romatizmada ve tonik olarak kullanılmaktadır (95). *T. repens* Hindistan'ın Naga kabilelerinde kurt düşürücü olarak kullanılmaktadır (139).

Bosna Hersek'te, *T. pratense* ile *T. repens*'in toprak üstü kısımları ve çiçeklerinin çayı hazırlanarak kadın hastalıklarında dahilen kullanılır. Aynı bitki *Lotus corniculatus* ile birlikte çayı hazırlanarak kadın hastalıklarında haricen kullanılır. Servikal yaralarda ve artmış vajinal sekresyonda *Frangula alnus*, *Salvia grandiflora*, *T. pratense* ve *T. repens* karıştırılarak çay hazırlanır

ve haricen kullanılır (127). *T. repens* ve *T. pratense* türlerinin çiçekli kısımlarının İtalya'nın kuzeydoğusunda halk ilacı olarak değişik amaçlar için kullanıldığı bildirilmiştir (31). *T. pratense* ve *T. repens*'in çiçek başları Lübnan'da halk arasında *Medicago sativa* çiçekleriyle karıştırılarak dekoksion hazırlanmakta; romatizma, artrit ve kas ağrılarında kompres yapılarak kullanılmaktadır (46).

Katalonya bölgesinde *T. alpinum*'un köklerinden hazırlanan çay, antiastmatik, antiseptik, bukkofaringeal antiseptik, nezlede görülen burun akıntısını dindirici ve hipotansif amaçla oral olarak kullanılır. Köklerden hazırlanan losyon ise topikal olarak antiseptik olarak kullanılır. *T. alpinum*'un toprak üstü kısımları anne sütünü artırıcı olarak kullanılır (5).

T. alexandrianum Mısır'da antidiyabetik ajan olarak kullanılmaktadır (89).

Kongo'da romatizma tedavisi için *T. baccarini*'nin ezilen yaprakları ile hazırlanan maserasyon günde 2 defa 1 bardak içilmek suretiyle kullanılmaktadır (34).

T. campestre çiçeklerinden hazırlanan dekoksion İtalya'da halk arasında öksürükte ve dermatitte kullanılmaktadır (85). 2000 yılında Portekiz'de yapılan bir etnobotanik çalışmada *T. angustifolium*'un çiçek durumlarından hazırlanan dekoksionun diyarede kullanıldığı tespit edilmiştir (30).

T. incarnatum'un çiçeklerinden hazırlanan dekoksion Katalonya'da dahilen diüretik olarak kullanılmaktadır (113).

T. stellatum da Kıbrıs'ta kas iskelet sistemi hastalıklarında kullanılır (59).

Trifolium türlerinin yaprakları ve çiçekleri Amerika yerlileri tarafından, diğer kullanımlarının yanı sıra, jinekolojik problemlerin tedavisinde de kullanılmaktadır (96).

Trifolium türlerinin feromon etkileri de vardır ve bu yolla böcekleri çektikleri düşünülmektedir (25, 28).

Trifolium türleri dünyanın birçok bölgesinde hayvan yemi olarak kullanılmak üzere ekilir (59, 107, 114). *Trifolium* türlerinin hayvan yemi olarak besleyici olduğu ve sütü artırdığı ileri sürülmüştür (116). Örneğin *T. nigrescens* Türkiye’de hayvan yemi olarak kullanılmaktadır. *T. ambiguum*’un çiçekleri Erzurum bölgesinde çiğ olarak yenir (14). Arnavutluk’ta ise *Trifolium* türleri çiçekleri çerez olarak tüketilmektedir (108).

2.2.2.2 Biyolojik Etkiler

Östrojenik Etkiler ve Menopoz

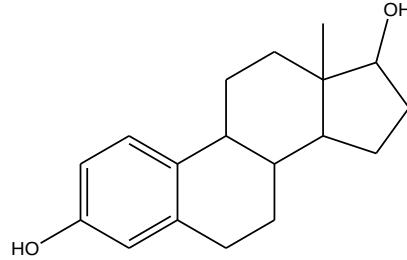
Trifolium türleriyle beslenen hayvanların doğurganlığının azalması ve süt seviyelerindeki değişiklik bu türler üzerinde araştırmalar yapılmasına neden olmuştur. “Clover disease” adı verilen bu durumda, koyunlardaki infertiliteye serviks ve uterustaki kistik glandular hiperplazi eşlik eder. Yapılan araştırmalar sonucunda bu hastalığa *Trifolium* türlerindeki östrojenik izoflavonların sebep olduğu bulunmuştur (156).

İzoflavonla beslenen Uzakdoğu ülkelerinde, Batılı ülkelere oranla kalp hastalıkları, osteoporoz, meme kanseri, prostat kanseri ve menopoz semptomları daha az görülür. Bu hastalıkların riskinin az olduğu toplumlardaki idrar örneklerinde yüksek fitoöstrojen seviyeleri tespit edilmiştir (20).

Fitoöstrojenler, östrojen replasman tedavisine alternatif olarak sunulmuştur. Fitoöstrojenik izoflavonlar difenolik östrojenlere yapısal olarak benzeyen bitki kaynaklı moleküllerdir. Bu benzerliğin sebebinin 17β -östradiol’ün steroid çekirdeği ile izoflavonların polifenolik halkasının yapısal benzerliği olduğu ileri sürülmüştür. Bu benzerlik nedeniyle doğrudan östrojen reseptörlerine bağlanarak, östrojenden sorumlu gen ekspresyon cevabını düzenlerler. Fitoöstrojenler östrojen reseptör β ’ya ($ER\beta$), östrojen reseptör α ’dan ($ER\alpha$) daha fazla bağlanma afinitesi gösterirler. Kuvvetli $ER\beta$ agonisti ve zayıf $ER\alpha$ agonisti oldukları için pozitif östrojenik etkilerini, kemik ve kardiyovasküler sistem gibi $ER\beta$ içeren dokularda daha çok gösterirler (17, 77, 134).

Standardize bir izoflavon preparatı olan Menoflavon[®],un içeriği YBSK ile incelenmiş, izoflavon içeriğinin % 9 (kuru ağırlık) olduğu saptanmıştır. Östrojenik aktivitesi maya 2 plazmit sistemi ile $ER\alpha$ ve $ER\beta$ kullanılarak değerlendirilmiştir. $ER\alpha$ ile $ER\beta$ arasında farklılık saptanmış ve bu farklılığın $ER\beta$ ’nın izoflavonlara daha yüksek afinite göstermesi nedeniyle olduğu açıklanmıştır. $ER\beta$ ’nın $ER\alpha$ ’dan daha yüksek transaktivasyonel etkisi ve

yüksek izoflavon içeriği nedeniyle bu tip ekstrelerin hormon replasman tedavisi için alternatif terapötik ajan olarak potansiyeli ile ilgili daha fazla çalışma yapılması gerekmektedir (42).



17β-Östradiol

Fitoöstrojenlerin zayıf östrojenik aktiviteleri nedeniyle, endojen östrojenlerle yarışmalarının yanı sıra, *5-α-redüktaz* enzim inhibisyonu ve aromataz enzim inhibisyonu yaptıkları, tirozin-spesifik protein kinazı inhibe ettikleri, anjiogenezi inhibe ettikleri öne sürülmüştür. Bazı fitoöstrojenlerin topoizomeraza etki ettiği, birçok fitoöstrojenin de deneysel tümörlerin büyümesini inhibe ettiği bildirilmiştir (23).

4' ve 7 numaralı konumlarında hidroksil bulunan flavonoidlerin östrojenik etkili olduğu, 5 numaralı konumunda hidroksil sübstitüenti olan flavonoidlerde bu etkinin arttığı belirlenmiştir. Buna ek olarak; 4'ten fazla bulunan hidroksil sübstitüentinin veya 4' konumundaki metoksillenmiş sübstitüentin flavonoidin östrojenik aktivitesini yok ettiği bildirilmiştir. Ayrıca metilasyon ve glukozidasyonun izoflavonların fitoöstrojenik aktivitesini azalttığı belirtilmiştir (17, 134).

Östrojen reseptörleri üzerinde flavon ve izoflavonoidlerle yapılan bir çalışmada, östrojenik aktivite açısından sıralama şu şekildedir; genistein > kemferol > naringenin > apigenin > daidzein > biokanin A > formononetin > luteolin > fisetin > kateşin/taksifolin > hesperetin (21).

Östrojen benzerlikleri nedeniyle östrojen reseptörlerine bağlanan, östrojen agonisti gibi davranan ve zayıf östrojenik aktivite gösteren izoflavonoidler, bu etkilerine bağlı olarak menopozla ilişkilendirilen sıcak basması gibi şikayetleri azaltır, meme tümörlerine ve diğer bazı kanser

türlerine karşı koruyucu olarak kullanılabilirler. *Trifolium pratense* bitkisinin ekstre, progestin aktivitesinde son ürün olan alkalın fosfatazın progesteron indüksiyonunu *in vitro* olarak inhibe ettiği için antiprogestin olarak tanımlanmıştır. Bu yüzden koyunlarda uterin ağırlığını ve meme ucu çevresini arttırdığı ayrıca servikal mukoza viskoelastisitesini azalttığı gözlenmiştir (41, 60, 77, 105).

Sıcak basması gibi östrojenin düşmesiyle alakalı menopoz semptomlarının görülme sıklığı ülkeler arasında değişmektedir. Avrupa ve Kuzey Amerika'daki kadınlarda sıcak basması sıklığı % 70-80 oranında görülürken, Japonya, Çin ve Güneydoğu Asya ülkelerinde sırasıyla % 25, % 18, % 14 oranında görülmektedir. Araştırmacılar bu oran farkını ülkelerin diyetlerinde östrojenik madde bulunduran bitkileri içermesine bağlamaktadırlar (3, 20, 149).

Menopoz dönemindeki sıcak basması gibi yakınmalara karşı izoflavonoit içeren tamamlayıcı ve alternatif tedavi konusunda birçok araştırma vardır. Avustralya'da 2007 yılında 15 hasta üzerinde yapılan bir çalışmada hastaların menopoz döneminde tamamlayıcı ve alternatif tedavi konusundaki düşünceleri alınmıştır. Bu konudaki kararlarında en büyük etkinin doktorlarının konuya bakışı olduğu belirlenmiştir (58).

Standardize izoflavon preparatı kullanan postmenopozal kadınlarda sıcak basma sıklığının azalmasını araştıran bir çalışmada; 12 aydan uzun süredir amenoreik, günde 5 defa sıcak basması yaşayan 30 kadın seçilmiştir. Katılımcılar 4 hafta boyunca legümen ve izoflavon desteği içermeyen diyetle beslenmiş, günde ortalama 5'ten fazla sıcak basması yaşayan kadınların yarısına günde 2 tane daidzein, genistein, biokanin-A ve formononetin izoflavonlarını içeren (Promensil® 40 mg) tablet, diğer yarısına da plasebo verilmiştir. 12 haftalık tedavinin sonunda 80 mg izoflavon desteği alan grupta sıcak basması % 44 oranında azalırken, plasebo grubunda değişiklik olmamıştır (149).

T. pratense izoflavonlarının menopozal sıcak basmalarına karşı etkileri konusunda 2006 yılına kadar yapılan çalışmalar incelendiğinde *T. pratense* izoflavonlarının etkinliği son derece anlamlı bulunmuştur. Günde 5-9 sıcak basması yaşayan kadınların 12-16 hafta boyunca *T. pratense* izoflavonları desteği almaları sonucunda, yaşadıkları sıcak basması sayısının günde ortalama 1'e indiği bildirilmiştir (38).

Menopozlu kadınların en önemli yakınması olan sıcak basmalarının, endojen opiyatlar ve katekolaminlerden etkilenen hipotalamik termoregülatör merkezin hatalı bir fonksiyonu sonucu ortaya çıktığı düşüncesinden hareketle, opiyat aktiviteye sahip bitkilerin menopozal semptomları azaltmada etkili olacağı düşünülmüştür. *T. pratense* ekstresinin fitoöstrojenik içeriği nedeniyle etkisini seks hormon reseptörleri üzerinden gösterdiği düşüncesinden hareketle yapılan bir çalışmada ekstrenin opiyat reseptörlere afinitesi olduğu ve aktivitesini bu yolla gösterdiği bulunmuştur (96).

Randomize çift körlü yapılan, günde 3 kereden fazla sıcak basması yaşayan 51 kadının seçildiği bir çalışmada, bireyler 3 ay süreyle günde 1 tablet Promensil® veya plasebo alan 2 gruba bölünmüştür. Sıcak basması, vajinal kuruluk veya ultrason teknikleri açısından istatistiksel bir farklılık gözlemlenmemiştir (11).

Sıcak basmaları ile ilgili yapılan bir başka çalışmada, günde en az 3 defa sıcak basması yaşayan 37 kadın hasta 3 ay izlenmiştir. Denekler 3 gruba ayrılmış, plasebo, 40 mg *T. pratense* ekstresi ve 160 mg *T. pratense* ekstresi tablet formunda verilmiştir. 3 aylık çalışma süresinin sonunda gruplar arasında sıcak basması insidansı açısından belirgin farklılık gözlenmemiştir. Aynı zamanda vajinal pH veya FSH ya da seks hormon bağlayıcı globulin (SHBG)'in serum düzeyleri de değişmemiştir (74).

Periyodik meme ağrısı batı toplumlarında çok yaygındır ve hormonal kaynaklı olduğu düşünülür. Çift körlü randomize bir çalışmada hastalara 40 mg ve 80 mg dozlarında izoflavon verilerek karşılaştırma yapılmıştır. Ağrıdaki

azalma; plaseboda %13, günde 40 mg izoflavon kullanımında %44, günde 80 mg izoflavon kullanımında %31 olarak bildirilmiştir (67).

Yumurtalıkları alınmış dişi fareler üzerinde yapılan bir çalışmada farelere insanlarda kullanılan doz olan 120 mg izoflavon içeren 400 mg *T. pratense* ekstresine karşılık gelen %15 ve %30 *T. pratense* içeren ekstre verilmiştir. Östrojenik etkiler uterus, vücut ağırlığı ve vajinal doku değişikliği ölçülerek değerlendirilmiştir. Çalışma sonucunda, % 15 izoflavon içeren *T. pratense* ekstresinin zayıf östrojenik olduğu ve bu etkisinin vajinal hücre karnifikasyonuna (doku değişikliği) dayandığını, % 30 izoflavon içeren *T. pratense* ekstresinin fareler üzerinde uterotrofik etkisinin olmadığını veya menopozlu kadınlarda endometrial kanser riskini artırma şansının olmadığını göstermişlerdir (100).

Selektif östrojen reseptör modulator benzeri aktivite gösteren ve reseptör pozitif meme kanserinde kullanılan Tamoksifen veya Raloksifen gibi maddelerin östrojen reseptörleri üzerine doku spesifik etkileri vardır. Kemik mineral dansitesi üzerinde ve kardiyovasküler sistemde faydalı etkiler gösterirler fakat sıcak basmalarını azaltmayıp aksine arttırdıkları için menopozal semptomların tedavisinde kullanılmazlar. Tamoksifen alan kadınlarda endometrial kanser riski artmıştır fakat Tamoksifen'e benzer etkisi olan fitoöstrojenleri alan kadınlarda böyle bir risk artışı bildirilmemiştir (17, 20).

2001 yılında yapılan bir çalışmada, menopoz semptomları için kullanılan 8 bitkisel preparatın östrojenik aktiviteleri incelenmiştir. Bu çalışmada araştırılan bitkilerden biri olan *T. pratense*'nin metanollü ekstresinin östrojen reseptörlerine bağlanma kabiliyetinin yüksek olduğu tespit edilmiştir. *T. pratense* izoflavonoidlerinden genisteinin diğer yonca izoflavonları arasında en etkilisi olduğu gösterilmiştir. *Trifolium*'un östrojenik aktivitesi, alkalın fosfataz aktivitesinin indüksiyonu ve progesteron reseptör aktivitesinin düzenlenmesi yoluyla açıklanmıştır (82).

Biokanin-A ve formononetin, genistein ve daidzeinden farklı olarak metil grubu taşıdıkları için östrojen reseptörlerine bağlanamazlar. Bu moleküller sindirilirken kolondaki intestinal bakteriler metil gruplarını uzaklaştırırlar. Böylece biokanin-A genisteine; formononetin de daidzeine dönüşmüş olur. Daidzein daha sonra equol ve *o*-desmetilangolensine metabolize olur. Genistein de inaktif bir bileşik olan *p*-etilfenol'e dönüşür. Fakat insanlarda idrarda genistein tespit edilmiştir (4, 20, 45).

Bir çalışmada bakteriyel metabolizma ürünleri olan equol ve *o*-desmetilangolensin'in (*O*-DMA) idrardaki varlığı ve yokluğundan hareketle plazma hormon konsantrasyonları değerlendirilmiştir. Equol üreten bakteri bulunduran kadınlarda bulunmayanlara göre plazma hormon konsantrasyonlarının daha düşük olacağı ileri sürülmüştür. 89 postmenopozal kadın üzerinde yapılan çalışmanın sonucunda serum hormon, seks hormon bağlayıcı globulin, üriner 2-hidroksiestron ve 16 α -hidroksiestron seviyeleri değerlendirilmiştir. *O*-DMA üreten bakteri bulunduranlarda, folikül stimüle edici hormon (FSH) % 23 daha fazla bulunmuştur. Araştırmacılar postmenopozal kadınlardaki hormon metabolizmasındaki çeşitliliğin intestinal bakterilerdeki farklılıklarla ilgili olabileceğini öne sürmüşlerdir (53).

T. pratense ekstresi ve bitkiden izole edilen bileşikler, endometriyal karsinoma hücrelerinde alkalın fosfatazı inhibe etmeleri ve α ve β rekombinant insan östrojen reseptörlerine bağlanarak antioksidan gibi hareket etme kabiliyetleri açısından incelenmiştir. Alkalın fosfataz yolağı için % 50 etkili konsantrasyonları 2,0-2,2 $\mu\text{g/mL}$ olarak; % 50 inhibitör konsantrasyonları ise östrojen reseptörleri α ve β için sırasıyla 18,4-32,6 $\mu\text{g/mL}$ ve 1,9-3,4 $\mu\text{g/mL}$ olarak bulunmuştur. Daidzein, genistein, formononetin, biokanin A, kumestrol ve naringenin alkalın fosfataz yolağında östrojenik etkili olduğu ve formononetin dışındakilerin bir veya iki östrojen reseptörüne bağlandığı bildirilmiştir (22).

Postmenopozal kadınlarda fitoöstrojenlerin değişik dozlarının kemik ve lipit metabolizmasına etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada, bir izoflavon

preparatı olan ve genistein, formononetin, daidzein ve biokanin A içeren Rimostil® kullanılmıştır. 46 postmenopozal kadın üzerinde yapılan çift körlü bir çalışmada denekler rastgele ayrılarak 6 aylık süre boyunca günlük 28,5 mg, 57 mg, 85,5 mg fitoöstrojen almışlardır. Sürenin sonunda serum HDL değerleri doza bağlı olmaksızın % 15,7 ile % 28 oranında artmıştır. Serum apolipoprotein B değerleri belirgin şekilde % 11,5-% 17 oranında düşmüştür. Proksimal radyal ve dirsek kemiklerinde kemik mineral yoğunluğu ise 57mg/gün dozda % 4,1 oranında; 85,5 mg/gün dozda % 3 oranında artmıştır. 28,5 mg/gün dozundaki izoflavona cevap çok belirgin olmamıştır. Tüm dozlarda endometriyal kalınlığın arttığı tespit edilmiştir (36).

T. pratense ekstresindeki izoflavonların menopozal semptomlar, lipitler ve vajinal sitoloji üzerindeki etkisini incelemek için 2005 yılında yapılan çift körlü randomize bir çalışmada, hormon tedavisi almayan, kupperman skoru ≥ 15 olan, 40 yaş üzerinde 60 kadın ile çalışılmıştır. 90 gün boyunca bir gruba *T. pratense* izoflavonoiti içeren ticari preparat (günde 80 mg) verilirken diğer gruba plasebo verilmiştir. 7 günlük ilaç almama döneminin ardından gruplar değiştirilmiştir. Sitolojik inceleme 90. ve 180. günlerde yapılmıştır. 53 kadının tamamladığı deneyde, izoflavonoit tedavisinden sonra kupperman skorunda azalma olmuştur. *T. pratense* izoflavonoit desteği menopozal semptomları anlamlı oranda azaltmış, karyopiknotik gelişme, karnifikasyon ve bazal hücre maturasyon indeksi ile belirlenen vajinal sitoloji üzerinde olumlu etkisi olmuş, total kolesterol, LDL kolesterol ve trigliserit seviyeleri azalmıştır (63).

Geleneksel östrojen hormon tedavisinin kardiyovasküler riski arttırdığı yönündeki klinik kanıtlar, östrojene alternatif tedavi arayışlarını gündeme getirmiştir. Bu nedenle *T. pratense* kaynaklı izoflavon besin desteğinin, yüksek vücut kitle indeksine sahip postmenopozal kadınların lipit profili üzerine etkisi incelenmiştir. Bu araştırmada 40 yaş üzeri, hormon tedavisi almayan 60 postmenopozal kadın çalışmaya katılmıştır. Rastgele iki grup oluşturulmuş ve bir gruba 90 gün boyunca günde 2 defa 80 mg *T. pratense* izoflavon kapsülü diğer gruba ise plasebo verilmiştir. 7 günlük kullanmama süresinin ardından gruplar ek 90 gün boyunca çaprazlanmıştır. 90. ve 180.

günlerde deneklerin total kolesterol, trigliserit, HDL, LDL ve lipoprotein A (LpA) seviyeleri ölçülmüştür. Çalışma sonucunda *T. pratense* kaynaklı izoflavon besin desteğinin özellikle yüksek vücut kitle indeksine sahip postmenopozal kadınlar üzerinde olumlu etkisinin olduğu, total kolesterol, LDL ve LpA seviyelerini düşürdüğü bulunmuştur (32).

İzoflavonların LDL kolesterol üzerine etkilerinin incelendiği bir başka çalışmaya 46 orta yaşlı erkek ve 34 postmenopozal kadın katılmıştır. 6 hafta boyunca katılımcılara, formononetin veya biokanin A bakımından zengin yonca izoflavonlarından oluşan 2 karışım verilmiştir. Biokanin A içeriği zengin olan karışımı kullanan erkeklerde LDL kolesterol değerinde anlamlı bir düşüş gözlenmiştir (60).

14 sağlıklı premenopoz hastasına 2 menstrual siklus boyunca 86 mg izoflavon, takip eden 2 menstrual siklus boyunca da plasebo verilmiştir. Çalışmanın sonucunda LDL oksidasyonu, total kolesterol veya trigliserit seviyelerinde herhangi bir değişikliğe rastlanmamıştır. Ancak HDL seviyelerinde artış gözlenmiştir (125).

Menopozla ilişkili olarak yükselmiş olan kardiyovasküler riskin, diyetle izoflavon alınmasıyla azalabileceğini araştıran bir çalışmada menopoz dönemindeki 17 kadına 40 mg ve 80 mg dozlarında *Trifolium* izoflavonları verilmiştir. Plasebo kontrollü çalışmanın sonucunda arter basıncı ve plazma lipoprotein seviyeleri değişmemiş, arteriyel kompliance artmıştır. Arteriyel kompliance'nin 80 mg dozunda, 40 mg doza oranla daha fazla arttığı belirtilmiştir (94).

T. pratense'den elde edilen izoflavonların, besin desteği olarak tüketildiklerinde, tip II diyabetli postmenopozal kadınlardaki kan basıncı ve önkol vasküler endotelial fonksiyonlar üzerindeki etkisinin incelendiği bir çalışmada; 16 menopoz sonrası dönemdeki diyet ve oral hipoglisemik tedavi görmekte olan tip II diyabet hastası kadın, rastgele, çift kör, çapraz çalışmaya katılarak 4 hafta boyunca günde 50 mg *T. pratense* izoflavonu almışlardır. Her tedavi dönemi sonunda 24 saat kan basıncı kayıtları alınmış ve

asetilkolin, nitroprusit ve L-nitromonometilarginin'e (L-NMMA) önkol vasküler cevap ölçülmüştür. Plasebo ile karşılaştırıldığında günlük ortalama sistolik ve diastolik kan basıncı belirgin şekilde daha düşük bulunmuştur. Ayrıca L-NMMA'yı takiben önkol vasküler cevabındaki artışın da belirgin oranda olduğu saptanmış böylece bazal endotelyal fonksiyonların daha iyi duruma geldiği gösterilmiştir. Plazma lipoproteinleri, şekere bağlı hemoglobin, asetilkolin ve nitroprusite yanıt, plaseboyla karşılaştırıldığında belirgin bir farklılık görülmemiştir. Sonuç olarak menopoz sonrası tip II diyabetli kadınlarda *T. pratense* kaynaklı izoflavon takviyesinin, kan basıncını ve endotelyal fonksiyonu olumlu yönde etkileyebileceği sonucuna varılmıştır (64).

Menopozda hormon replasman tedavisine alternatif olarak kullanılan *T. pratense* ve soya ticari ürünleri karşılaştırılmıştır. Tüm ürünler α ve β östrojen reseptörlerine karşı östrojenik aktivite, progesteron ve androjen reseptörlerine karşı afinite göstermiştir. Yonca preparatlarının progesteron ve androjen reseptörlerine ilgisi soya preparatlarına göre daha fazla bulunmuştur. Bu durum yonca preparatlarındaki izoflavonoit miktarının fazlalığı ile ilişkilendirilmiştir. Aynı zamanda fitoöstrojenlerin α ve β östrojen reseptörlerine ve androjen reseptörlerine karşı ilgisinin, prostat kanserine karşı koruyucu etkisinin sebebi olabileceği belirtilmiştir (16).

İzoflavon içeren yonca ve soya ekstralarının östrojen reseptörleri α ve β 'ya, progesteron ve androjen reseptörlerine yüksek afinitesi vardır. Bu yüksek afinite nedeniyle yonca ekstraları menopozal bozuklukların tedavisi ve meme kanseri riskinin azaltılması için besin desteği olarak kullanılır. Biyokimyasal analizler, seçici östrojen reseptör modülatör etkisinin yanı sıra çok sayıda aktivite mekanizmasının olduğunu göstermiştir. Örnek olarak, selektif östrojen enzim modülatörü (SEEMs) şeklinde hareket ederler, antioksidan aktiviteleri ve transkripsiyon faktörleri ile etkileşimleri vardır (17).

Fitoöstrojenlerin reseptör afiniteleri östradiolle de karşılaştırılmıştır. Kumestrol en yüksek afiniteye sahiptir. Kumestrol'ün afinitesi östradiolden 10-20 kat az iken genistein'in 100 kat, daidzein ve equol'ün ise 1000 kat

daha azdır. Kumestrol östrojen resptörlerine yüksek oranda bağlandğı için antiöstrojenik özelliğinden çok östrojenik özelliği vardır (20).

32 yetişkin fare üzerinde yapılan deneyde farelere insanlarda kullanılan dozlara eşdeğer dozda *T. pratense* izoflavonları ve plasebo verilmiştir. Sonuçlar endometriyal histoloji ve α -östrojen reseptörü ile Ki67 proteininin ekspresyonu ile incelenmiştir. *T. pratense*, endometriyumda, hücre proliferasyonunda artış yapmadan, α -östrojen reseptör stimülasyonunu sağlamıştır (6).

Yonca ekstresinin postmenopozal kadınlarda seks hormonları ve endometriyum üzerine etkilerinin incelendiğı bir çalışmaya 40 yaş üstü 109 kadın katılmıştır. Katılımcılar randomize olarak iki gruba ayrılmış; 90 günlük çalışma süresi boyunca grupların birine 80 mg izoflavon taşıyan *Trifolium* ekstresi verilirken diğerine plasebo verilmiştir. Plaseboyla karşılaştırıldığında yonca ekstresinin plazma testosteron seviyesini arttırdığı, endometriyal kalınlığı azalttığı bildirilmiştir (60).

Prostat Üzerindeki Etkileri

Prostat kanseri erkeklerde en yaygın görülen hormon ilişkili kanser türüdür. A. B. D.'de görülme sıklığı her yıl % 3-4 oranında artmaktadır. Meme kanseri gibi prostat kanserinde de yağ oranı fazla, et ağırlıklı beslenme tarzı hastalığın riskini artırır (20).

Asya'da prostat kanseri ve iyi huylu prostat büyümesinin az sıklıkta görülmesinin nedeni dünyanın bu bölgesinde fitoöstrojen tüketiminin fazla olmasıdır. Çoğu Asyalı erkeğin Avrupalılarla karşılaştırıldığında fitoöstrojen seviyeleri yüksek bulunmuştur. Avustralya'nın 3 farklı bölgesinde yaşayan erkeklerin prostat fitoöstrojen doku seviyeleri karşılaştırılmıştır. Ayrıca kırsal kesimde ve şehirde yaşayanlar da karşılaştırılmıştır. İyi huylu (benign) prostat hiperplazisi veya prostat kanseri olan 103 hastanın prostatik doku örnekleri alınmış, dokulardaki enterolakton ve genistein seviyeleri monoklonal antikor tabanlı immünoassay yöntemi ile bakılmıştır. Enterolakton seviyeleri kırsalda

ve şehirde yaşayanlar arasında farklılık göstermemiştir. Enterolakton ve genistein seviyeleri Avusturya'nın üç bölgesinde de benzer çıkmıştır (24).

Benzer bir araştırmada benign prostat hiperplazisi olan Kore'li hastalarla Batılı ülkelerdeki hastalar karşılaştırılmıştır. Genistein seviyesinin Kore'li hastaların doku örneklerinde diğerlerine göre 3-4 kat daha fazla olduğu tespit edilmiştir. Genistein doku seviyesinin prostat kanseri olan hastalarda iyi huylu prostat büyümesi olanlara göre daha düşük olduğu; genistein doku seviyesinin büyük hacimli prostat büyümesi olanlara kıyasla küçük hacimli prostat büyümesi olanlarda anlamlı şekilde fazla olduğu bulunmuştur (23).

Portekizli, Çinli ve İngiliz hastaların plazma ve prostat sıvılarında GC-MS yöntemiyle lignan ve izoflavon fitoöstrojenlerinin konsantrasyonları incelenmiştir. Portekizli hastaların prostat sıvılarında çok yüksek seviyede enterolakton bulunmuştur. Daidzein seviyesi ise hem plazmada hem de prostat sıvısında Hong Kong'lu hastalarda diğerlerine oranla çok yüksek seviyededir. Asyalı erkeklerin prostat sıvılarında yüksek konsantrasyonda bulunan izoflavonoidlerin prostat hastalıklarına karşı koruyucu olabilecekleri belirtilmiştir (91).

Standardize izoflavon ekstrelerinin, prostat, idrara çıkma, cinsel fonksiyon, yaşam kalitesi ve karaciğer fonksiyonlarına etkisinin incelendiği bir çalışmaya, prostat biyopsisinde yüksek PSA seviyesi ve prostatik intraepitelyal neoplazma (PIN) seviyesi saptanan 12 hasta katılmıştır. Hastalara günde 160 mg izoflavon ekstresi verilmiştir. Başlangıçta, 3. ve 6. aylarda PSA, total testosteron, östrojen, LH, FSH, DHEA-S, karaciğer transaminaz enzimleri, transrektal prostat volumetrisi uluslararası prostat semptom skoru (IPSS) ile incelenmiştir. Ortalama PSA seviyeleri başlangıçta, 3. ve 6. aylarda sırasıyla 7,7 ng/mL, 6,9 ng/mL ve 6,5 ng/mL olarak bulunmuştur. Prostat hacminde ve tüm seks hormonlarında 6 aydan sonra küçük bir azalma görülmüştür. Tüm transaminaz enzimler 3 ve 6 aydan sonra artmıştır. IPSS 6 aydan sonra %15 gerilemiştir. Cinsel fonksiyonlarda bir

değişiklik görülmezken, ortalama hayat kalitesinin 6 aydan sonra daha iyiye gittiği bildirilmiştir (47).

Avustralya'da yapılan bir çalışma, benign prostat hiperplazisi ve prostat kanseri hastalarında serum fitoöstrojen seviyelerini belirleyerek, PSA ve diğer endokrin parametrelerle olan korelasyonlarını değerlendirmeyi hedeflemiştir. 97 benign prostat hiperplazisi (BPH) ve 97 prostat kanseri hastası olan 194 erkek üzerinde yapılan bir çalışmada serumdaki daidzein, genistein ve enterolakton seviyeleri florooimmünoassay yöntemi ile ölçülmüştür. Değerler BPH hastalarında daha yüksek bulunmuştur. Daidzein, genistein ve tüm fitoöstrojenlerin toplamı, folikül stimüle edici hormon (FSH) ile pozitif ilişkili bulunmuştur. Bu bulgular, fitoöstrojenlerin, prostat kanseri patogeneğinde etkili olduğunu göstermiştir (86).

Genistein, bir D vitamini metaboliti olan 1,25-dihidroksivitamin D₃'ün dekompozisyonundan sorumlu enzim olan CYP24'ün aktivitesini artırır. 1,25-dihidroksivitamin D₃ prostat ve kolorektal kanser hücrelerinde antimitotik etki gösterir. CYP24'ün yüksek dozda alınması prostat kanser hücrelerindeki 1,25-dihidroksivitamin D₃ miktarını artırır. Bu yüzden genisteince zengin diyetin prostat kanserinden korunmada etkili olabileceği düşünülmektedir (17).

Kemik Erimesine Karşı Etkileri

Osteoporoz birim ünitadaki kemik miktarının azaldığı fakat kompozisyonunun değişmediği durum olarak tanımlanır. Kemik hücrelerinin oluşumundaki dengesizlik nedeniyle kemik poröz hale gelir. Bu da kırığa yatkınlığa neden olur. Kırığa neden olabilecek kemik yetersizliğinin, genç yetişkinlik döneminde kazanılan kemik kütlesine, kemik kaybının başladığı yaşa, kayıp oranına ve hepsini etkileyen hormonal, mekanik, genetik faktörler ile beslenme faktörlerine bağlı olduğu; kalça kırığı oranlarının Asya ve Afrika toplumlarında, Kuzey Amerika ve Avrupa'ya göre daha az olduğu belirtilmiştir. Kadınlarda görülen osteoporoz kısmen menopoza da ilişkilidir. Çünkü östrojen eksikliği kemik kaybını hızlandırır. Hormon replasman

tedavisinin, 75 yaşından önce alınıp, uzun dönem kullanılması halinde bu kaybın önlenmesine katkı yapabileceği belirtilmektedir. (20). Menopozda görülen kemik kaybının önlenmesi için hormon replasman tedavisi % 8-10 oranında tercih edilmektedir. Bu oranın düşük olmasının sebebi, hormon replasman tedavisi ile artan meme kanseri riskidir. Fitoöstrojenler osteoporozu önlemek için hormon replasman tedavisine alternatif olarak önerilirler (12). Hayvan deneyleri, fitoöstrojenlerin, kemik oluşumunu arttırıp yıkımın önüne geçirecek kemik kaybını önlediğini göstermiştir (20).

İzoflavonların kemik üzerindeki etkileri de incelenmiştir. Özellikle genistein ve daidzeinin uygun dozda alındığında, kemik dokusu üzerinde kemik kütlesini geliştirmek gibi olumlu etkileri olduğu fakat uygun doz aralığı dışında alınmaları durumunda kemik üzerinde daha az olumlu etki gösterdikleri bildirilmiştir. Yüksek dozda genistein, normal hücre fonksiyonu kaybına neden olur. Tam tersine, aynı konsantrasyondaki daidzeinin, osteoblast benzeri hücreler üzerinde olumlu etkileri vardır. Genistein ve daidzein'in kemik üzerindeki etki mekanizması incelendiğinde, östrojen reseptörleri üzerinde etki göstererek osteoblast ve osteoklastları etkilediği bildirilmiştir. Örnek olarak, *topoizomeraaz II*'yi inhibe ederek hücresel döngüdeki ilerlemeyi etkilediği; membran bağlı peptid reseptörlerini aktive ederek östrojenle ilgili olmayan etkileri başlattığı ileri sürülmüştür (8).

Bir günlük dozunda 16 mg formononetin, 1 mg genistein, 0,5 mg daidzein ve 26 mg biokanin A bulunan *T. pratense* kaynaklı besin desteğinin kemik dansitesine etkisi araştırılmıştır. 1 yıl süren çift körlü, randomize, plasebo kontrollü çalışmada, 49-65 yaşlarındaki 177 kadının kemik dansitesi değerleri incelenmiştir. Plasebo grubundaki kadınlarla karşılaştırıldığında, izoflavonoit kullanan kadınlarda lomber omurga kemiğinin mineral içeriğindeki ve kemik mineral dansitesindeki kayıp daha az olduğu, kemik yapım belirteçlerinde ise artış olduğu gözlenmiştir. Çalışma sonucunda araştırmacılar, izoflavonoitlerin kadınlarda lomber omur kemiği üzerinde potansiyel koruyucu olabileceğini ileri sürmüşlerdir (9).

Aynı konuda yapılan bir başka çalışmada Promensil® (82 mg izoflavon) ve Rimostil® (57,2 mg izoflavon) isimli iki besin desteği ile plasebonun, lipid ve kemik yapım yıkım döngüsü belirteçleri üzerine olan etkileri karşılaştırılmıştır. 12 hafta süren çift körlü deneye 45-60 yaşlarında 252 kadın katılmıştır. Promensil® veya Rimostil® kullananların ortalama HDL değerleri diğerlerine göre daha fazla artmıştır ve trigliserit değerlerinde önemli bir azalma görülmüştür (130).

Antikanser Etki

Non-steroit antienflamatuvar ilaçların uzun süre kullanımının kanser görülme sıklığında azalmaya neden olduğu ve bunun mekanizmasının COX inhibisyonu ile ilgili olduğu bildirilmiştir. Pek çok kanser dokusunda prostaglandin sentezi ve COX-2 salınımının arttığı saptanmıştır. Legümenler gibi izoflavon bakımından zengin yiyeceklerle beslenen toplumlarda kanser insidansındaki azalma, araştırmacıları izoflavonların COX inhibitör aktivitelerini incelemeye itmiştir. *T. pratense* içeren besin destekleri, legümen zengin diyetlerde genelde bulunan 4 izoflavonu taşımaktadır. 2 ayrı hücre deneyi yapılarak *T. pratense*'de bulunan izoflavonların, COX enzim aktivitesini inhibe etme yetenekleri incelenmiştir. Hem fare makrofaj hücrelerinde hem de insan monositlerinde izoflavonların prostaglandin E₂ ve/veya tromboksan B₂ sentezini belirgin bir şekilde inhibe ettiğini, bunun da COX inhibisyonunu belirlediğini göstermişlerdir. Sonuç olarak bazı kanserlerin toplumda düşük oranda görülmesi, diyetle alınan izoflavonların COX-aktivite inhibisyonu yapmaları ile ilişkilendirilmiştir (78).

İzoflavonların antiöstrojenik özellikleriyle ilgisi olmayan birçok antikanser etkileri vardır. Genisteinin tirozinkinazı inhibe ettiği bilinmektedir. Tirozinkinaz, hücre fonksiyonları ve hücre bölünmesini düzenlemek için gerekli olan fosforlayıcı proteinlerden sorumludur. Bu nedenle birçok hücrede büyümeyi inhibe ettiği gösterilmiştir. Genistein ayrıca DNA onarıcı enzim olan topoizomerazı inhibe eder, antioksidan olarak hareket eder böylece oksidatif DNA hasarından hücreyi korur. Genistein, malign tümörlerin yayılmasına neden olan anjiogenezi de inhibe eder (20).

T. pratense izoflavonoitlerinden biri olan biokanin A'nın karsinojen bir bileşik olan benzo(α)piren'in hücre kültüründeki aktivasyonunu inhibe ettiği bildirilmiştir. Bu kemoprotektif etkinin, biokanin A'nın karsinogenez metabolizmasını inhibe ederek DNA'ya bağlanmasını engellemesi ile gelişmiş olabileceği ileri sürülmüştür (60).

T. pratense'nin göğüs kanserindeki koruyucu veya tedavi edici rolünü değerlendirmek için hiperöstrojenik semptomlar gösteren göğüs kanserli veya kistik mastitli 8 vaka üzerinde çalışılmıştır. 8 hastaya değişen süreler boyunca *T. pratense* verilmiş ve *T. pratense*'nin daha önceden bildirilmiş endikasyonlarının yanında, hiperöstrojenemi, amenore, ovaryum kisti, pozitif östrojen reseptörlü meme kanseri durumlarında da endike olduğu bulunmuştur (103).

Erken dönem meme kanseri tanısı yeni konulmuş 30 ile 84 yaşları arasındaki kadın hastalar üzerinde yapılan bir çalışmada, herhangi bir tedavi uygulanmadan önce idrar ve kan örnekleri alınmıştır. İdrar örnekleri, izoflavonik fitoöstrojenler; daidzein, genistein, equol ve lignanlar; enterodiol, enterolakton, matairezanol için analiz edilmiştir. Menarş yaşı, doğum sayısı, alkol alımı, total yağ alımı gibi faktörler ayarlandıktan sonra yüksek miktarda equol ve enterolakton salınımı, meme kanseri riskinde potansiyel azalmayla ilişkilendirilmiştir. Diğer fitoöstrojenlerin meme kanseri riskinde anlamlı azalmaya sebep olmadıkları bildirilmiştir (66).

Farklı *T. pratense* ekstreleri, osteoblastik osteosarkom hücrelerini (HOS58) uyarma yeteneği açısından incelenmiştir. Osteoblastisiteyi işaretleyici olarak alkalın fosfataz (ALP) aktivitesi seçilmiştir. *T. pratense*'nin *n*-hekzan, kloroform, *n*-butanol, metanol ve sulu ekstreleri hazırlanmıştır. Butanol ve metanol ekstrelerinin ALP veya hücresel protein üretimi üzerine hiçbir etkileri olmazken, kloroform ekstresinin inkübasyonda enzim aktivitesini belirgin olarak arttırdığı bulunmuştur. Çalışma sonucunda elde edilen bulgular, *T. pratense* izoflavonoitlerinin osteoblastik hücre aktivitesini uyarmada rolü olduğunu göstermiştir (155).

Birçok laboratuvar çalışması fitoöstrojenlerin insan meme kanser hücreleri üzerinde antiproliferatif etkisi olduğunu göstermiştir. Bununla ilgili birçok mekanizma ileri sürülmüştür. Bu konudaki bir görüşte fitoöstrojenlerin seks hormonlarının metabolizmasını değiştirerek meme kanserinin gelişimine etki ettiğini ileri sürülmektedir. Bu düşünceye göre izoflavonik fitoöstrojenlerin difenolik yapısı, sentetik östrojenlere benzemektedir ve hepsi zayıf östrojenik etki gösterirler. Bir başka düşünceye göre de izoflavonik fitoöstrojenler, antiöstrojen gibi davranarak, östradiol ile çekirdek üzerindeki östrojen bağlanma bölgeleri için yarışmaya girerler ve böylece hormon bağımlı hücrelerin büyümesini ve proliferasyonunu inhibe ederler. Lignanların ve izoflavonik fitoöstrojenlerin karaciğerdeki seks hormon bağlayıcı globulinleri stimule ettiğine dair bazı kanıtlar bulunmaktadır. Buna bağlı olarak plazmada bulunan serbest ve biyolojik olarak aktif östradiolün seviyesi düşer. Bütün bunların yanında bir başka düşünceye göre de birçok lignan ve izoflavonik fitoöstrojen androstenedionu östrojene çeviren enzim olan aromataz enzimini inhibe ederek vücutta dolaşan östrojen miktarını azaltır (66).

Genistein, hesperetin, galangin, naringenin, kesretin ve baikalein flavonoidlerinin östrojen reseptör pozitif MCF-7 insan meme kanseri hücrelerinin proliferasyonu üzerine etkilerinin ölçüldüğü bir çalışmada, fazla östrojen ilavesinin flavonoidlerin inhibe ettiği hücre proliferasyonu üzerine etkileri incelenmiştir. Flavonoidlerin zayıf östrojenler olarak hareket ettikleri düşünüldüğünden, eklenen 17β -östradiolün hücre proliferasyonunda meydana gelen inhibisyonu tersine çevirmesi beklenmiştir. Sadece genistein'in hücre proliferasyonunu neredeyse % 100 oranında inhibe ettiği görülmüştür. Genistein *in vitro* olarak östrojen reseptörlerine bağlanırken diğer flavonoidler etkilerini farklı şekilde göstermektedir (134).

İzoflavonların, insan meme karsinom hücre serileri, MDA-468 (östrojen reseptöre negatif), MCF-7, MCF-7-D-40 (östrojen reseptörü pozitif) gelişimi üzerine etkileri incelenmiştir. Genisteinin tüm hücre serilerinde güçlü inhibitör etkisi görülürken biokanin A ve daidzeinin daha zayıf inhibitör etki gösterdiği bulunmuştur. İzoflavon β -glukozitleri genistein ve daidzeinin ise çok az etkili

oldukları gözlenmiştir. İzoflavonların MDA-468 ve MCF-7 hücreleri karşılaştırılarak tümör hücresi oluşumunu inhibe etmeleri için östrojen reseptörü varlığı gerekmediği saptanmıştır (106).

Bir hücre dizisinde genisteinin zararlı mutasyonlar ve muhtemelen kanser proliferasyonuna neden olacak hasarı önlemek için hücrelerde bulunan koruyucu bir mekanizma olan programlanmış hücre ölümünde değişikliklere sebep olduğu gösterilmiştir. Aynı zamanda bir sıçan feokromastoma hücre dizisinde *K-ras* geni ekspresyonunu inhibe ettiği gösterilmiştir (20).

Batı yarımkürede çoğunlukla hormon bağımlı kanserler görüldüğü ve bunun diyetle ilişkisinin araştırıldığı bir yayında, diyetle alınan difenolik fitoöstrojenler ile lignan ve izoflavonoitlerin kanserden koruyucu etkileri üzerinde yoğunlaşmıştır. Lignanlar ve izoflavonoitler bağırsak bakterileri tarafından düşük östrojenik ve aynı zamanda antioksidatif etkiye sahip hormon benzeri bileşiklere dönüştürülerek, hücrelerarası enzimlere, protein sentezine, büyüme faktörünün çalışmasına, anjiogeneze malign hücreproliferasyonuna ve farklılaşmasına, etki ederek doğal kanser koruyucu bileşik görevi görürler. Prostat kanseri üzerinde yapılan çalışmalarda fitoöstrojenlerin lösemi ve diğer malign hücre kanserleri gibi prostat kanser hücre büyümesini geçiş fazında inhibe ettiğini düşündürmüştür (4).

Vejeteryan diyeti ile seks hormonları bağlayıcı proteinin (SHBG) yüksek plazma seviyeleri arasında kurulan ilişki araştırmacıları vejeteryan diyetin seks hormonlarının yıkımını azalttığı ve buna bağlı olarak meme ve prostat kanseri riskini düşürdüğünü düşünmeye yönlendirmiştir. Bu konuda yapılan bir çalışmada, genisteinin insan hepatokarsinom hücrelerinin SHBG oluşturmaya *in vitro* etkisi ile hücre proliferasyonu üzerindeki etkisi araştırılmıştır. Araştırmanın sonucunda, genistein'in hepatokarsinoma hücrelerinin SHBG yapımını arttırdığı, ayrıca SHBG üretiminin yüksek seviyede devam ettiği bu süre boyunca kanser hücrelerinin proliferasyonunu da baskıladığı bulunmuştur (92).

Kolon kanseri Amerika'da en yaygın görülen 2. kanser türüdür. Kadınlarda 1. sırada meme kanseri, erkeklerde ise akciğer kanseri yer alır. Hormon düzeyinin kolon kanseriyle kuvvetli ilişkisi yoktur, fakat başka muhtemel mekanizmalarla etiyolojisinde rol oynar. Örneğin, indüklenabilir nitritoksit sentezinin genistein tarafından bastırılması, etin sindirilmesi sırasında oluşan endojen N-nitrozasyonunun izoflavonlarca inhibe edileceğinin göstergesi olabilir (20).

Kanserin önlenmesindeki mekanizmaları anlamada, konakçının immün fonksiyonunun rolü gittikçe artmaktadır. Konakçının immün fonksiyonunun diyetteki antioksidanlarla artırılması, kanserin önlenmesinde etkilidir. İzoflavonların bağışıklık üzerindeki etkisinin incelendiği bir çalışmada, 20-40 mg/kg dozunda alınan daidzein'in, humoral ve hücrel bağışıklığı arttırdığı görülmüştür. Buna ek olarak, daidzein, genistein ve bunların kombinasyonlarının murin splenositlerin proliferasyonuna, IL-2 (interlökin) ve IL-3 salgılanmasına etkisi de incelenmiştir. Daidzeinin lenfosit aktivasyonunu arttırdığı görülmüştür. Bundan yola çıkarak daidzeinin kanser kemoprotektif etkisinin olabileceği ortaya konulmuştur (21).

Antifungal Etki

Değişik zamanlarda toplanan *T. pratense* örneklerinin yaprak, gövde ve köklerinden hazırlanan ekstrelerin antifungal aktiviteleri karşılaştırılmıştır. Kök ekstralarının antifungal özelliği yüksek bulunmuştur. Nutrasötik destek olarak yaprakların çiçeklerden daha güçlü bir izoflavon kaynağı olduğu belirlenmiş; test edilen yonca ekstralarının çoğunun fitopatojenik bir mantar olan *Drechslera teres*'e karşı etkili olduğu ve en yüksek aktiviteyi kök ekstresinin gösterdiği bulunmuştur (128).

Antioksidan Etki

T. pratense ekstresinde, soya ekstresinde ve standardize bir *T. pratense* preparatındaki total polifenol içeriğini belirlemek ve radikal süpürücü kapasitelerini ile antioksidan aktivitelerini değerlendirmeyi hedefleyen bir çalışmanın sonucunda, total polifenol konsantrasyonu *T.*

pratense ekstresinde 153 mg/g, *T. pratense* kaynaklı besin desteğinde 114 mg/g, soya ekstresinde 18 mg/g olarak bulunmuştur. Toplam polifenol içerikleriyle orantılı olarak, DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) radikal süpürücü kapasiteleri sırasıyla *T. pratense* ekstresinde EC_{50} :0,32 mg/ML, ARP:7; *T. pratense* preparatında EC_{50} :0,50 mg/ML, ARP:5; soya ekstresinde EC_{50} :1,09 mg/ML, ARP:2 olarak bulunmuştur. İzoflavonların ve polifenollerin etkileri göz önüne alındığında, *T. pratense* ekstresinin potansiyel bir antioksidan ve radikal süpürücü ajan olarak değerlendirilebileceği bildirilmiştir (76).

Formononetinin ovaryumu alınmış fareler üzerindeki östrojenik ve antioksidan etkisinin incelendiği çalışmada, östrojenik etki, uterus ağırlığındaki değişimle, antioksidan etki ise süperoksit dismutaz, katalaz, glutatyon peroksidaz ve malonaldehit içeriğindeki değişimle değerlendirilmiştir. Çalışma sonucunda formononetin'in güçlü serbest radikal süpürücü ve östrojenik etkisi olduğu ve östrojenik etkisinin doza bağlı olmadığı bulunmuştur (93).

Sırbistan ve Karadağ'da yetişen 9 Fabaceae bitkisi üzerinde yapılan bir antioksidan aktivite çalışmasında, *T. pannonicum*'un oldukça güçlü bir antioksidan etkiye sahip olduğu gösterilmiştir (57).

Parkinson Hastalığı Üzerindeki Etkileri

Occhiuto ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada, glutamat toksisitesine karşı yoncadaki doğal fitoöstrojenik izoflavon karışımının nöroprotektif etkinliği araştırılmıştır. Alzheimer, Parkinson gibi glutamat toksisitesi ile ilişkilendirilen nörodejeneratif hastalıklara karşı yonca ekstresinin nöroprotektif etkisinin konsantrasyona bağlı olduğu ve bu etkinin östrojenik etkiyle de bağlantılı olduğu gösterilmiştir (97).

T. pratense izoflavonlarının Parkinson hastalığı üzerindeki etkisi ile ilgili bir başka çalışmada, Parkinson hastalığındaki en önemli patolojik değişimin dopaminerjik nöronların dejenerasyonu olduğundan hareketle izoflavonların etkisi araştırılmıştır. İzoflavonların dopamin geri alımındaki lipopolisakkaritlerle indüklenmiş düşüşü azalttığı belirlenmiştir. İzoflavonların

dopaminerjik nöronlar üzerindeki koruyucu etki potansiyelleri karşılaştırıldığında daidzein formononetinden etkili bulunmuştur (33).

Oksidatif stresle indüklenmiş nöronal hücre ölümü, Alzheimer ve Parkinson gibi değişik nörodejeneratif bozuklukları kapsar. Alzheimer hastalığı ile ilişkilendirilen hidrojen peroksit (H_2O_2) kullanılarak, *T. pratense*'den elde edilen fitoöstrojenik izoflavonların nöroprotektif etkisi incelenmiştir. Çalışma sonucunda izoflavon ekstralarının H_2O_2 ile indüklenen hücre ölümüne karşı nöroprotektif olduğu, bu etkilerinin antioksidan aktiviteleriyle ilgili olabileceği bildirilmiştir (98).

Dermatolojik Etki

T. balansae üzerinde yapılan bir çalışmada, bitkiden izole edilen stigmast-5-en-3 β ,26-diol, stigmast-5-en-3 β -ol ve kemfesterol bileşiklerinin, bitkilerde ve hayvanlarda melanin biyosentezinde rol oynayan *tirozinaz* enzimini inhibe ettiği gösterilmiştir (117).

Diğer Etkileri

Bazı *Trifolium* türlerindeki kumarin içeriği nedeniyle, bu türlerin pıhtılaşma faktörleri açısından araştırılması gerektiği ileri sürülmüştür (54).

T. repens'in *anticestodal* aktivitesinin incelenmesi için albino farelerde deneysel *Hymenolepis diminuta* Rudolphi enfeksiyonu kullanılmıştır. *T. repens*'in sürgün ekstralarının 200 mg/kg ve 500 mg/kg'lık dozları *H. diminuta*'nın fekal yumurta sayısını sırasıyla %47,72 ve %54,59 oranında azaltmış; kurttan kurtulma oranı ise %60 ve %40 olarak bildirilmiştir. Bu oranlar standart kurt düşürücü ilaçlardan biri olan praziquantel ile karşılaştırıldığında praziquantel'in fekal yumurta sayısı düşürme oranının % 65,90, kurttan kurtarma oranının da % 26,67 olduğu belirlenmiştir (139).

T. arvense'nin antienflamatuvar aktivitesi incelendiğinde, karagen ile oluşturulan pençe ödemi % 58 oranında inhibe ettiği bulunmuştur (31).

T. pannonicum susp. *elongatum*'un antitüberküloz etkisi araştırılmıştır. Bitkinin toprak üstü kısımlarında etanollü ekstresinin *Mycobacterium tuberculosis* bakterisi üzerinde inhibitör etkisi bulunamamıştır (145).

İzoflavonların alkol metabolizmasından ve asetaldehit detoksifikasyonundan sorumlu insan aldehit ve alkol dehidrogenaz izoenzimlerini inhibe ettikleri; bu nedenle de alkol yoksunluk sendromlarının tedavisinde ilaç olarak kullanılabilecekleri ifade edilmiştir (20).

2.2.2.3. Biyoyararlanımı

Biyoyararlanım, oral olarak alınan bileşiğin gastrointestinal kanalda emilimine bağlıdır ve alınan bileşiğin metabolitlerinin feçes veya idrardaki miktarına bakılarak değerlendirilir. Fakat yağda çözünen bileşikler idrarla doğrudan atılmadıkları için bunların suda çözünen metabolitleri ölçülür. Flavonoit ve izoflavonoitler su veya organik çözücülerde iyi çözünmezler. Etanol, metanol, asetonitril gibi iyi çözündükleri kabul edilen çözücülerde bile kısmen çözünürler. Gıdalarda, ana bileşiklerine nazaran suda daha çok çözünebilen glikozit konjugatları halinde bulunurlar. Bu konjugatların şeker kısımları emilmeden önce memeli veya mikrobiyal glikozidaz enzimleri tarafından enzimatik parçalanmaya uğrar. Bu nedenle izoflavonoit glikozitlerinin insan plazması ve idrarında saptanması mümkün değildir. Endojen ve eksojen biyotransformasyona bağlı olarak oluşan metabolik ürünler ile diyetteki diğer bileşiklerle olan etkileşimler izoflavon ve flavonoitlerin biyoyararlanımlarını belirler (21).

İzoflavonların enterohepatik dolaşıma alınması için gerekli en önemli basamak olan glukuronidasyon mukozal hücrelerdeki bağırsak bakterileri tarafından yapılır. Bu yüzden izoflavonların emilimi bireyin bağırsak kanalındaki bakteri popülasyonundan etkilenir. Bitkideki izoflavonların önemli bir kısmı β -glikozit bağı ile ozlara bağlanmıştır. Bu glikozitlere asetil ve malonil grupları bağlıdır. *Trifolium* türlerinde bulunan 4 ana izoflavon bileşiği daidzein, genistein, formononetin ve biokanin A'dır. Biokanin A ve formononetin, sırasıyla genistien ve daidzeinin metilenmiş prekürsörleridir.

Bağırsak florasındaki bakteriler, konjuge izoflavonları aglikonlarına, metillenmiş izoflavonları ise demetil türevleri haline çevirirler. Bu nedenle izoflavonoit aglikonlarınca zengin olan besin desteklerinin glikozitlerce zengin besin desteklerine oranla daha etkili olduğu bildirilmiştir (17).

İzoflavon emiliminin soya ve yonca kaynağına göre değişip değişmediğini bulmayı hedefleyen bir çalışmada katılımcılar tarafından soya ve yonca izoflavonlarını içeren 14 ürün kullanılmıştır. Katılımcılar 2 hafta boyunca kahvaltıda izoflavon aglikonları almıştır. 2 haftalık kontrol ve kullanmama süresinin ardından 24 saatlik idrarda izoflavon miktarı ölçülmüş, her izoflavonun yaklaşık % 25'i idrarda tespit edilmiştir. Bulunan oranların hemen hemen aynı olması emilimin glikozit/aglikon kaynağına göre değişmediğini düşündürmüştür. Soya fasulyesinde genistein, daidzein, glisetin yüksek oranda bulunurken, yoncada biokanin-A ve formononetin fazladır. Soya ile karşılaştırıldığında yoncada genisteine oranla daha fazla daidzein atılmıştır. Her iki örnekte de en fazla atılan izoflavon daidzeindir. Çalışma, her iki izoflavon kaynağındaki izoflavonların da aynı biyoyararlanılabilirlikte olduğunu, benzer miktarda absorbe edildiklerini göstermiştir (147).

2.2.2.4. Kullanım Dozu

Trifolium türlerinin sıvı ekstresinin dahilen veya haricen kullanılabileceği bildirilmiştir. 1:1 oranındaki sıvı ekstresinin % 25 etanolde hazırlanabileceği, 4 g drogdan hazırlanan infüzyonun günde 3 defa içilebileceği ve bunların yanı sıra 1,5 veya 3 ml sıvı ekstresinin dönüşümlü olarak günde 3 defa alınabileceği belirtilmiştir (60).

Osteoporozda izoflavon kullanımını ve güvenli doz aralığını belirlemek için yapılan bir çalışmada; günlük 50 mg izoflavon dozunun uygun olacağı bildirilmiştir. Bu doz sınırının vücut ağırlığına göre 2 mg/kg'a kadar çıkarılabileceği de belirtilmiştir (12).

2.2.2.5. Yan Etkileri

Trifolium türleri bakımından zengin otlaklarda beslenen koyunlarda infertilite gözlenmiştir. İnfertilitenin servikal mukus viskoelastikiyetinde gelişen azalmanın spermatozoaların serviks içine girmesine engel olması şeklinde geliştiği kabul edilmektedir. (2, 60).

T. repens'in, siyanogenetik glikozit içeriği nedeniyle nadiren öldürücü olabileceği; *Trifolium* türlerinin çiftlik hayvanlarında zaman zaman toksik etkiler ortaya çıkarabileceği kayıtlıdır (81, 141). Örneğin, Ürdün'ün güneyinde yapılan bir halk ilacı araştırmasında, *T. arvense*'nin sığırlarda abortif ve spazmodik etkilere neden olabileceği, *T. boissieri*'nin ise sığırlarda iç kanamaya neden olabileceği bildirilmiştir (7).

T. pratense izoflavonları üzerinde yapılan araştırmalarda sedef (40 mg *T. pratense* izoflavonları) ve aft (80 mg *T. pratense* izoflavonları) gibi yan etkiler görülmüştür (67). Yonca içeren bir bitkisel formülasyonu birkaç gün boyunca oral olarak kullanan bir hastada gözlerde, ağızda ve peniste su toplanması ve enflamasyon bildirilmiştir (60).

Bir diğer çalışmada da, soğuk algınlığı, baş ağrısı, myalji, artralji, diyare ve mide bulantısı görüldüğü bildirilmiştir (143).

Tek seferde 16 mg/kg dozunda alınan genistein'in 2. derece lökopeniye sebep olabileceği belirtilmiştir. Yapılan bir başka çalışmada ise aynı bileşiğin kan lipaz değerleri üzerinde çeşitli etkilere ve hipofosfatemiye de sebep olabileceği bildirilmiştir (12).

Bazı çalışmalarda hiçbir yan etki gözlenmediği de bildirilmiştir (38, 149). Başka bir çalışmada da buna paralel şekilde göğüs dansitesinde hiçbir değişiklik olmadığı belirtilmiştir (9).

2.2.2.6. Etkileşimleri

Trifolium pratense ile terapötik indeksi dar olan varfarin'in etkileşimi incelenmiştir. Bitki kumarin ve kumarin türevleri içerdiği için varfarinle birlikte

kullanıldığında varfarinin etkisini arttıracak ve buna bağlı olarak da kanama riskinin artacağı ifade edilmiştir. Fakat bu durumla ilgili olarak bildirilmiş bir vaka örneği yoktur (62). Ayrıca *Trifolium* taşıyan bitkisel ürünler antikoagülanlar, trombolitik ajanlar ve düşük molekül ağırlıklı heparinler ile beraber kullanıldığında kanama riski artacağı için bu tip ürünlerin eşzamanlı kullanımından kaçınılması gerektiği, eğer birlikte alınmış ise hastanın aşırı kanama belirtileri açısından takip edilmesi gerektiği bildirilmiştir (60).

Trifolium bitkisinin eşzamanlı kullanımının tamoksifenin ve progesteronun etkinliğini de azalttığı bildirilmiştir (60).

Kontraseptiflerle birlikte kullanıldığında kontraseptif etkinliği azalttığı, yan etkilerde artma gözlenebileceği, eğer birlikte alınmış ise hastada östrojen fazlalığı ve etkinliğin azalması semptomlarının takip edilmesi gerektiği belirtilmiştir (60).

T. pratense izoflavonlarıyla bitki-ilaç etkileşimleri arasında doğrudan bir bağlantı bulunamamıştır (38).

2.2.2.7. Kontrendikasyonları

Bugüne kadar izoflavonların fetüse etkisiyle ilgili çalışma yapılmamıştır. Günlük diyetlerinde yüksek miktarda izoflavon alan toplumlarda bu konuya bağlı fetüs anomalileri ile ilgili bildirilen bir vaka çalışması yoktur. Sadece genistein'in hamile farelerdeki etkisi incelenmiştir. Hamile farelere gebeliğin 16-20 günlerinde yüksek doz genistein verilmiştir. Çalışma sonucunda farelerde, düşük doğum kilosu, anogenital mesafenin açılması, ergenliğin başlamasının gecikmesi gibi bazı olumsuz etkiler görülmüştür. Genistein'in yeni doğanlar üzerindeki etkileri de dietilstilbestrole benzer bulunmuştur. Gerek gebelikte gerekse yenidoğanda genistein'in etkisi yorumlanırken alınacak dozun ve maruz kalma süresinin önemli olduğu vurgulanmıştır. Bu nedenlerle bitkinin hamilelikte ve laktasyonda kullanılması önerilmemektedir (60, 80). Östrojen reseptör pozitif neoplazili hastalarda da kullanılması önerilmemektedir (60).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Fitokimyasal Çalışmalar

3.1.1. Bitkisel Materyal

Kimyasal çalışmalarda kullanılmak üzere 14 *Trifolium* türü çiçeklenme zamanlarında toplanmıştır. Açık havada ve gölgede kurutulmuş bitkilerin toprak üstü kısımları kullanılmıştır. Toplanan bitkisel materyallere ait örnekler H. Ü. Eczacılık Fakültesi Herbaryumunda saklanmaktadır. *

Trifolium ambiguum: A8 Rize: İkizdere, Cibil vadisi, yol kenarları, 1200 m, 20.06.2009, G. Renda, (HÜEF 09891).

Trifolium arvense var. *arvense*: A4 Ankara: Soğuksu Milli Parkı, 1000 m, 14.06.2009, G. Renda, (HÜEF 09336).

Trifolium campestre: A8 Rize: İkizdere, Cibil yaylası yol kenarları, 1200 m, 20.06.2009, G. Renda, (HÜEF 09341).

Trifolium canescens: A8 Rize: İkizdere, Cibil vadisi, 1200 m, 20.06.2009, G. Renda, (HÜEF 09340).

Trifolium hybridum var. *anatolicum*: A4 Ankara: Soğuksu Milli Parkı, 1000 m, 14.06.2009, G. Renda, (HÜEF 09333).

Trifolium hybridum var. *hybridum*: A7 Trabzon: Yomra, Şana mevkii, 100 m, 30.04.2009, G. Renda, (HÜEF 09337).

Trifolium pannonicum: A4 Ankara: Soğuksu Milli Parkı girişten 5 km sonra yol kenarları, 1000 m, 14.06.2009, G. Renda, (HÜEF 09338).

Trifolium pratense var. *pratense*: A4 Ankara: Soğuksu Milli Parkı, 1000 m, 14.06.2009, G. Renda, (HÜEF 09332).

Trifolium pratense var. *pratense*: A7 Gümüşhane: Torul karayolu kenarı, 23.06.2009, G. Renda, (HÜEF 09893).

Trifolium purpureum var. *purpureum*: A5 Amasya, Borabay gölü, piknik alanı girişi, 15.06.2009, D. Şöhretoğlu, (HÜEF 09890).

Trifolium repens var. *repens*: A4 Ankara: Hacettepe Üniversitesi Sıhhiye Kampüsü İlaç Fabrikası yanları, 800 m, 13.06.2009, G. Renda, (HÜEF 09331).

* *Trifolium ambiguum*, *Trifolium arvense* var. *arvense*, *Trifolium resupinatum* var. *microcephalum*, *Trifolium purpureum* var. *purpureum* türlerinin tayini Yrd. Doç. Dr. Erkan Uzunhisarcıklı (Gazi Üniversitesi, Biyoloji Bölümü) tarafından yapılmış, diğer türlerin tayini ise G. Renda tarafından yapılmış ve E. Uzunhisarcıklı tarafından onaylanmıştır.

Trifolium resupinatum var. *microcephalum*: A6 Tokat: Niksar, Hamidiye köprüsünden 300 m ileride, yolun sol tarafındaki tarla kenarları. 15.06.2009, D. Şöhretoğlu, (HÜEF 09892).

Trifolium spadiceum: A8 Rize: İkizdere, Cimil Vadisi, yol kenarındaki yamaçlar, 1200 m, 20.06.2009, G. Renda, (HÜEF 09339).

Trifolium trichocephalum: A8 Rize: İkizdere, Cimil Yaylası, 1200 m, 20.06.2009, G. Renda, (HÜEF 09335).

3.1.2. Kromatografik Yöntemler

Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi (YBSK)

YBSK sistemi

Cihaz	: Dionex P680
Enjektör	: Dionex ASI-100 Automated Sample Injector
Kolon	: ACE 5 C18 250x4,6 mm
Dedektör	: Dionex UVD 340U UV/VIS Dedektör

3.1.3. Kullanılan Aletler

Rotavapor	: Büchi R-210
pH metre	: Sartorius Professional Meter PP-20
Terazi	: Ohaus Adventurer Pro AV264C
Ultrasonik banyo	: Elma Transsonic 570

3.1.4. Kimyasal Maddeler ve Standartlar

Solvanlar:

Metanol	: Merck
DMSO	: Merck
Trifloroasetikasit	: Carlo Erba
der. H ₂ SO ₄	: Merck
Asetonitril	: Sigma-Aldrich

YBSK'da kullanılan solvan sistemi:

- A: Distile su (ph 2,7)
- B: Asetonitril

Standartlar:

Biokanin A	: Sigma
Daidzein	: Fujicco
Genistein	: Wako
Formononetin	: Calbiochem
Kemferol	: Sigma
Kersetin	: Sigma

3.1.5. Ticari Numuneler

TN-1: Türkiye’de satılmaktadır. İçeriğinde; *Chlorella pyrenoidosa* (yeşil alg) tozu (200 mg), Burdock (dul avrat otu) *Arctium majus* kök ekstrakt tozu (12,5 mg), Dandelion (karahindiba, *Taraxacum officinale*) kök ekstraktı tozu (12,5 mg), Red clover (kırmızı yonca, *Trifolium pratense*) çiçek durumu ekstraktı tozu (12,5 mg), Garlic (sarımsak, *Allium sativum*) soğan tozu (1 mg), Pectin (elma pektin tozu) (50 mg), Milk Thistle (meryem ana diken, *Silybum marianum*) tohum ekstrakt tozu (50 mg) ve Vitamin C (200 mg) bulunmaktadır. Çek Cumhuriyeti’nden ithal edilmektedir.

TN-2: Türkiye’de satılmaktadır. İçeriğinde; *Linum usitatissimum* standart ekstresi (62,5 mg) ve *Trifolium pratense* standart ekstresi (500 mg) bulunmaktadır. Çek Cumhuriyeti’nden ithal edilmektedir.

TN-3: Almanya’da satılmaktadır. İçeriğinde; Kırmızı yonca izoflavonları (50 mg), Nachtkerzenöl (300 mg), biotin (300 mg), çinko (5 mg), pantotenik asit (2 mg), folik asit (200 µg), Vitamin B6 (2 mg), Vitamin B1 (1,4 mg), Vitamin E (10 mg) ve magnezyum (60 mg) bulunmaktadır.

TN-4: Almanya’da satılmaktadır. İçeriğinde; Kırmızı yonca ekstraktı izoflavonları (40 mg) bulunmaktadır.

3.1.6. Ekstraksiyon ve Hidroliz Çalışmaları

Tüm örneklerde aşağıdaki gibi çalışılmıştır.

Numune Hazırlanması:

a. Bitki numunesi:

Açık havada ve gölgede kurutulan bitki örneklerinin toprak üstü kısımları değirmende toz edildikten sonra, 200 mg toz numune tartılmıştır. Numune trifloroasetik asitle pH'sı 3'e ayarlanmış 30 mL MeOH ile geri çeviren soğutucu altında 85°C'de ekstre edilmiştir. Süzgeç kağıdı yardımıyla süzülüp 20 mL %80 metanolle yıkanan ekstrakt alçak basınç altında uçurulmuştur. Ekstrakt 2 mL dimetilsülfoksit'te (DMSO) çözülerek stok çözelti hazırlanmış, stok çözeltinin içine 50'şer µL kersetin ve kemferol (25 ppm) standartları eklenmiştir. Numune çözeltisi filtreden süzülerek YBSK kolona enjekte edilmiştir.

b. Ticari numune:

Her bir kapsül (veya tablet) örneğinin içeriği 200 mg olacak şekilde ayarlanmış numune üzerinde yukarıdaki işlemler aynı şekilde uygulanmıştır.

Standart Çözeltilerinin Hazırlanması:

Daidzein, genistein, formononetin ve biokanin A stok çözeltileri 0,5 mg /mL derişiminde hazırlanmıştır. Çözücü olarak DMSO kullanılmıştır. İç standart olarak kullanılan kersetin ve kemferol de aynı derişimde hazırlanmıştır.

3.1.7. YBSK Çalışmaları

Standartların Kalibrasyonu:

500 ppm olarak hazırlanmış stok çözeltilerden gereken miktarlardan alınıp DMSO ile seyreltilerek 50, 40, 30, 20, 10, 5, 1, 0,5, 0,25 ppm'lik çözelti karışımları hazırlanmış ve içlerine kemferol ile kersetin (25 ppm) iç standartları eklenmiştir. Bu çözeltilerin 20 µL'lik hacimleri ikişer kez YBSK'da analiz edilmiştir.

Kromatografik Analiz Koşulları:

Numunelerden hazırlanan ekstreler aşağıda belirtilen koşullarda kantitatif olarak incelenmiştir. Bu koşullar Krenn ve arkadaşlarının *Trifolium*'un YBSK analizi için geliştirdiği yöntemden alınmıştır (75).

Kolon Sıcaklığı: 27 °C

Mobil Faz:

A: Distile su (pH 2.7)

B: Asetonitril

Dedektör: UV 254 nm

Enjeksiyon Hacmi: 20 µL

Analiz Süresi: 61 dk

Akış Hızı: 1mL/dk

Tablo 6. Gradient elüsyon basamakları (75)

Mobil Faz (A)	Mobil Faz (B)	Zaman (dk)
%80	%20	0
%63	%37	35
%0	%100	45
%0	%100	50
%80	%20	51
%80	%20	61

Yöntem Validasyonu:

Kromatografik yöntem koşulları optimize edildikten sonra yöntemin kısmi validasyon çalışmaları ICH'ye göre yapılmıştır (65).

Tez çalışmasında kersetin ve kemferol iç standart olarak denenmiştir. Kersetin ile yapılan değerlendirmede daha iyi tekrarlanabilirlik elde edildiği için Kersetin iç standart olarak seçilmiştir.

3.2. Aktivite Çalışmaları

3.2.1. Yara İyileştirici Aktivite Tayini

Yara iyileştirici aktivitenin araştırılması amacıyla fare ve sıçanlarda dairesel eksizyon ve çizgisel insizyon yöntemleri uygulanmıştır. Ekstreler yukarıda anlatılan yöntemle hazırlanmıştır.

Deney Hayvanları: Deneylerde T.C. Sağlık Bakanlığı Merkez Hıfzısıhha Enstitüsü Serum Çiftliğinden temin edilen 20 ± 5 g ağırlığında erkek Swiss Albino fareler ve temin edilen 200-250 g ağırlığında Wistar sıçanlar kullanılmıştır. Hayvanların ortama adapte olabilmesi için deneye başlamadan önce laboratuvar şartlarında en az üç gün beklenmiştir. Bu bekleme süresince hayvanlar standart pellet yem ve su ile beslenmiş, deneylerde her grupta en az altı hayvan kullanılmıştır.

Test Numunelerinin Hazırlanması: Test numuneleri %1 oranında ekstre içerek şekilde Madecassol® pomatin bazı olan glikol stearat, 1,2 propilen glikol, sıvı parafin (3:6:1) kullanılarak hazırlanmış ve sırtlarında yara oluşturulan hayvanlara 0,5 g uygulanmıştır.

Negatif Kontrol: Negatif kontrol grubundaki hayvanlara herhangi bir madde uygulanmamıştır.

Pozitif Kontrol: Madecassol® pomatin bazı olan glikol stearat, 1,2 propilen glikol, sıvı parafin (3:6:1) pozitif kontrol olarak uygulanmıştır.

Referans Madde: Deney sonuçlarının karşılaştırılması amacıyla, standart yara iyileştirici madde olarak hayvanların yara oluşturulmuş bölgelerine 0,5 g Madecassol ® uygulanmıştır.

Çizgisel insizyon yara modeli

160-180 g ağırlığında erkek Wistar sıçanlar deneye başlamadan önce laboratuvar şartlarında en az üç gün bekletilmiştir. Bekleme ve deney süresince hayvanlar standart pellet yem ve su ile beslenmiştir. 12 saat aydınlık 12 saat karanlık uygulaması yapılan laboratuvaroda oda sıcaklığında barındırılan hayvanlara zayıf eter anestezisinde intraperitoneal olarak 0,15 cc Ketalar® enjeksiyonu ile genel anestezi yapılarak, sırt kısımlarının orta hattından 2 cm uzaklıkta bistüri ile iki adet 5 cm'lik çizgisel insizyon yarası oluşturulmuştur. Cerrahi ipek iplikle eşit aralıklarla 3 adet dikiş atılmış, 9 gün boyunca günde bir defa 500' er mg % 1 ekstre içeren merhem formülasyonları haricen yaralara uygulanmıştır. 9. gün sonunda dikişler alınmış, 10. gün hayvanlar eter anestezisi ile öldürülmüştür. Yara oluşturulan bölgeler yara kenarlarının 1' er cm uzağından cerrahi makasla kesilmiş ve yaralardan biri histopatolojik incelemeler için ayrılmıştır. Diğer yaranın tensiometre ile gerilim kuvveti ölçülmüştür (84, 138).

Dairesel eksizyon yara modeli

25-30 g ağırlığında erkek Swiss Albino fareler deneye başlamadan önce laboratuvar şartlarında en az üç gün bekletilmiş, bekleme ve deney süresince hayvanlar standart pellet yem ve su ile beslenmiştir. 12 saat aydınlık 12 saat karanlık uygulaması yapılan laboratuvaroda oda sıcaklığında barındırılan farelere zayıf eter anestezisinde intraperitoneal 0,01 cc Ketalar® enjeksiyonu ile genel anestezi yapılmıştır. Biopsi punch ile 5 mm çapında dairesel eksizyon yarası oluşturulmuş ve 12 gün boyunca 500'er mg %1 ekstre içeren merhem formülasyonları haricen yaralara uygulanmıştır. Yara

alanları her gün dijital fotoğraf makinesi ile fotoğraflanmış ve AutoCAD programı kullanılarak yara alanlarındaki küçülme hesaplanmıştır (123).

Histopatolojik Yöntemler

Histopatolojik değerlendirmeler için, deneyin sonunda her gruptan alınan tam kesi deri örnekleri % 10'luk formaldehit içerisinde bekletilmiş ve parafinde bloklanmıştır. Parafin bloklardan alınan 5 µm kalınlığındaki kesitler lama transfer edilerek Hematoksilen Eozin (HE) ve Van Gieson (VG) boyaları ile boyanarak ışık mikroskobu ile incelenmiştir.

Işık mikroskobu altında incelenen dokularda epidermal ve dermal re-modelleme hafif (+), orta (++) ve şiddetli (+++) olmak üzere derecelendirilmiştir. Epidermis re-epitelizasyon veya ülser; dermis ise fibroblast proliferasyonu, mononükleer ve/veya polimorfonükleer hücreler, neovaskülarizasyon ve kollajen birikimi yönünden incelendikten sonra epidermal ve/veya dermal re-modelleme evrelendirilmiştir. Van Gieson boyanmış kesitlerde kollajen birikimi ortaya konmuş, tüm gruplarda yara iyileşmesi ile ilgili bulgular birleştirilmiştir.

3.2.2. Aromataz Enzim İnhibitör Etki Tayini

Aromataz enzim inhibisyonunun değerlendirilmesi için *Western Blot* yöntemi kullanılmıştır.

Her bir örneğin total protein miktarları eşit olacak şekilde yükleme yapılmış, sıçan over ekstresi aromataz için pozitif kontrol olarak kullanılmıştır. Her bir ekstreye 6x örnek tamponu ilave edilerek 100°C'de 5 dakika kaynatılmış, %10'luk akrilamid-bisakrilamid jellere yükleme yapılmış ve elektroforez uygulanmıştır. Sürüklenme tamponu varlığında 3 saat içinde 100 V ve 250 mA akımın etkisiyle jel üzerindeki proteinler molekül ağırlıklarına göre sıralanmıştır.

PVDF (polivinilidenfluorid) membran jel boyutlarında kesilmiş, metanolde 5 dakika bekletilmiş, soğuk transfer tamponuyla 5 dakika yıkanmıştır. Transfer tepsisinde membran ve jel transfer tamponu varlığında

5 dakika yıkanmıştır. Sünger ve Wattmann kağıtları arasına yerleştirilen PVDF membran ve jel 1 saat süreyle 300V ve 250mA akıma maruz bırakılmıştır. Böylece jeldeki proteinler transfer tamponu yardımıyla PVDF membrana ıslak elektroforez yöntemiyle transfer olmuştur. Isınmaya karşı transfer tankı buz kalıplarıyla desteklenmiştir. Her kuyucuğa eşit miktarda yükleme yapıldığı transferden sonra membranlara Ponceau S çözeltisi (%0.1 (a/h) Ponceau S'in %5'lik asetik asitteki çözeltisi) ile boyama yapılarak doğrulanmıştır. Bu boya membrandan transfer tamponuyla yıkanarak uzaklaştırılmıştır.

Proteinlerin görünür hale getirilmesi

PVDF membranlar blok çözeltisinde 2 saat bloklandıktan sonra 15 dakika boyunca 3 defa TBS-T (tris tampon çözeltisi ve tween-20) ile yıkanmıştır. Membranlar 1^o antikor çözeltisinde seyreltilen 1^o antikora 1 saat maruz bırakılmış ve süre sonunda 15 dakika boyunca 3 defa TBS-T ile yıkanmıştır. Son olarak membranlar 2^o antikor çözeltisinde seyreltilen 2^o HRP-GAM veya HRP-GAR antikora 1 saat süreyle maruz bırakılmış ve süre sonunda 15 dakika boyunca 3 defa TBS-T ile yıkanmıştır. Tüm bloklama veya antikor çözeltilerinde yağsız granüle süt tozu ve BSA (sığır serum albumini) kullanılmıştır. Bloklama ve antikor maruziyetleri orbital çalkalayıcı üzerinde ve oda sıcaklığında gerçekleştirilmiştir. Membran, güçlendirilmiş kimyasal ışımaya reaktifleri (enhanced chemiluminiscent) ile 5 dakika bekletildikten sonra streç filmle sarılmış ve fotoğraf filmi ile immünoreaktif bantlar görünür hale gelinceye kadar karanlık bir ortamda bekletilmiştir. Filmler, tab edici çözeltilere maruz bırakılmış ve suyla yıkanarak kurumaya bırakılmıştır.

4. BULGULAR

4.1. Fitokimyasal Çalışmalara Ait Bulgular

4.1.1. Sistem Uygunluk Çalışması

Sistem uygunluk çalışması, izoflavonların 10 µg/mL standart çözeltisinin on tekrarlı enjeksiyonu ile gerçekleştirilmiştir. İzoflavonlara ait alıkonma zamanı, enjeksiyon tekrarlanabilirliği, kapasite faktörü, ayırıcılık, teorik tabaka sayısı ve pik asimetri oranı Tablo 7’de verilmiştir.

Tablo 7. İzoflavonoitler için elde edilen sistem uygunluk parametreleri.

	Daidzein	İç standart	Genistein	Formononetin	Biokanin A
Alıkonma zamanı (dak)	16,93	19,99	26,62	35,33	42,58
Enjeksiyon tekrarlanabilirliği	0,10	0,06	0,05	0,06	0,01
Kapasite Faktörü	5,56	6,85	9,31	12,23	14,27
Ayırıcılık	-	7,38	13,88	16,09	14,41
Teorik tabaka sayısı	22500	32229	53083	83311	373118
Pik asimetri oranı	1,12	1,19	1,08	1,10	1,13

^aAlıkonma zamanlarının BSS değeri verilmiştir (n=10), ^bÖlü hacim, aynı koşullarda urasil enjeksiyonu yapılarak bulunmuştur: $t_0 = 1.00$ dak. ^cKomşu pikler arasındaki değerlerdir.

4.1.2. Duyarlılık

Sinyal gürültü oranının 3 ve 10 olduğu derişim değerleri sırasıyla LOD ve LOQ olarak seçilmiş ve sonuçlar Tablo 8’de verilmiştir.

Tablo 8. İzoflavonoitlerin LOD ve LOQ değerleri

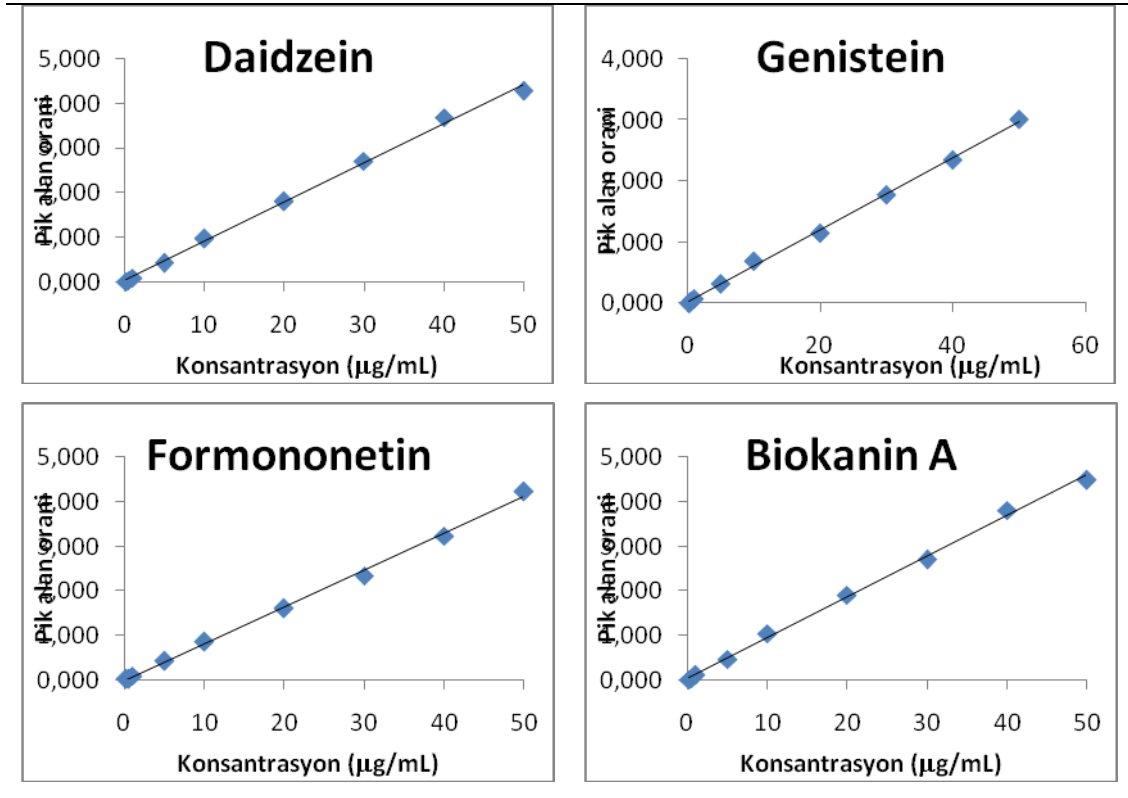
İzoflavonoitler	LOD(µg/mL)	LOQ(µg/mL)
Daidzein	0,038	0,129
Genistein	0,521	1,724
Formononetin	0,069	0,232
Biokanin A	0,033	0,108

4.1.3. Doğrusallık

Kalibrasyon eğrileri her bir izoflavonoit için 0,25, 0,5, 1, 5, 10, 20, 30, 40 ve 50 µg/mL derişimlerinde standart çözeltisi hazırlanarak oluşturulmuştur. Kalibrasyon eğrileri her bir izoflavonoit standart alanının iç standardın (kersetin) alanına bölünmesiyle elde edilen değerin, izoflavonoit standartının derişimine karşı grafiğe geçirilmesiyle oluşturulmuştur. Standartlara ait YBSK kromatogramları ve UV spektrumları Şekil 1a ve 1b'de gösterilmiştir. Elde edilen kalibrasyon eğrileri ve analiz sonuçları Tablo 9 ve Tablo 10'da verilmiştir.

Tablo 9. Standartların kalibrasyon eğrilerine ait veriler

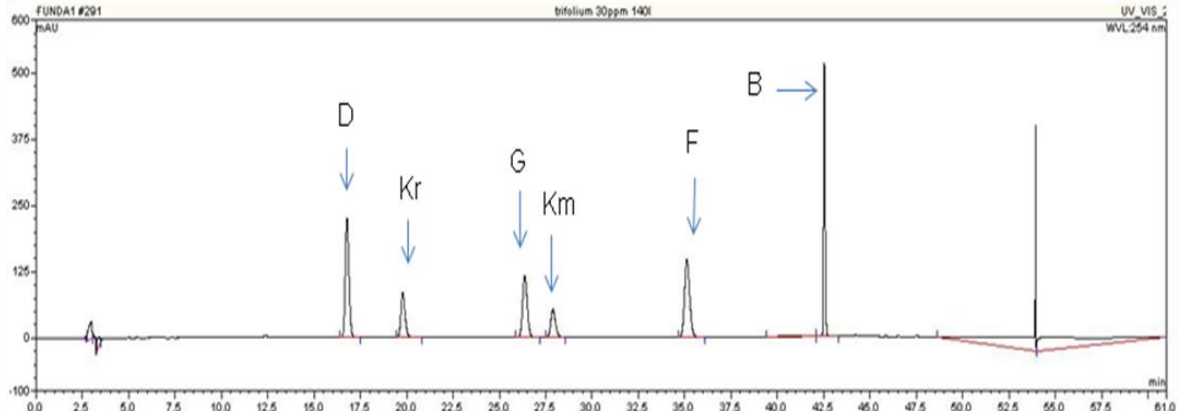
Konsantrasyon (µg/mL)	Daidzein (pik alanı oranı)	Genistein (pik alanı oranı)	Formononetin (pik alanı oranı)	Biokanin A (pik alanı oranı)
0.25	0,015428	0,001661	0,030462	0,015165
0.5	0,049856	0,051893	0,042103	0,061796
1	0,094149	0,083386	0,087397	0,103811
5	0,433066	0,325168	0,430882	0,471019
10	0,957718	0,696204	0,872350	0,973604
20	1,808297	1,181797	1,603135	1,907878
30	2,707239	1,777772	2,332171	2,681838
40	3,703398	2,393541	3,281595	3,736691
50	4,209864	2,992457	4,181375	4,450131



Tablo 10. İzoflavonoitlerin DMSO'ya eklenmiş numunelerdeki kalibrasyon eğrilerine ait veriler

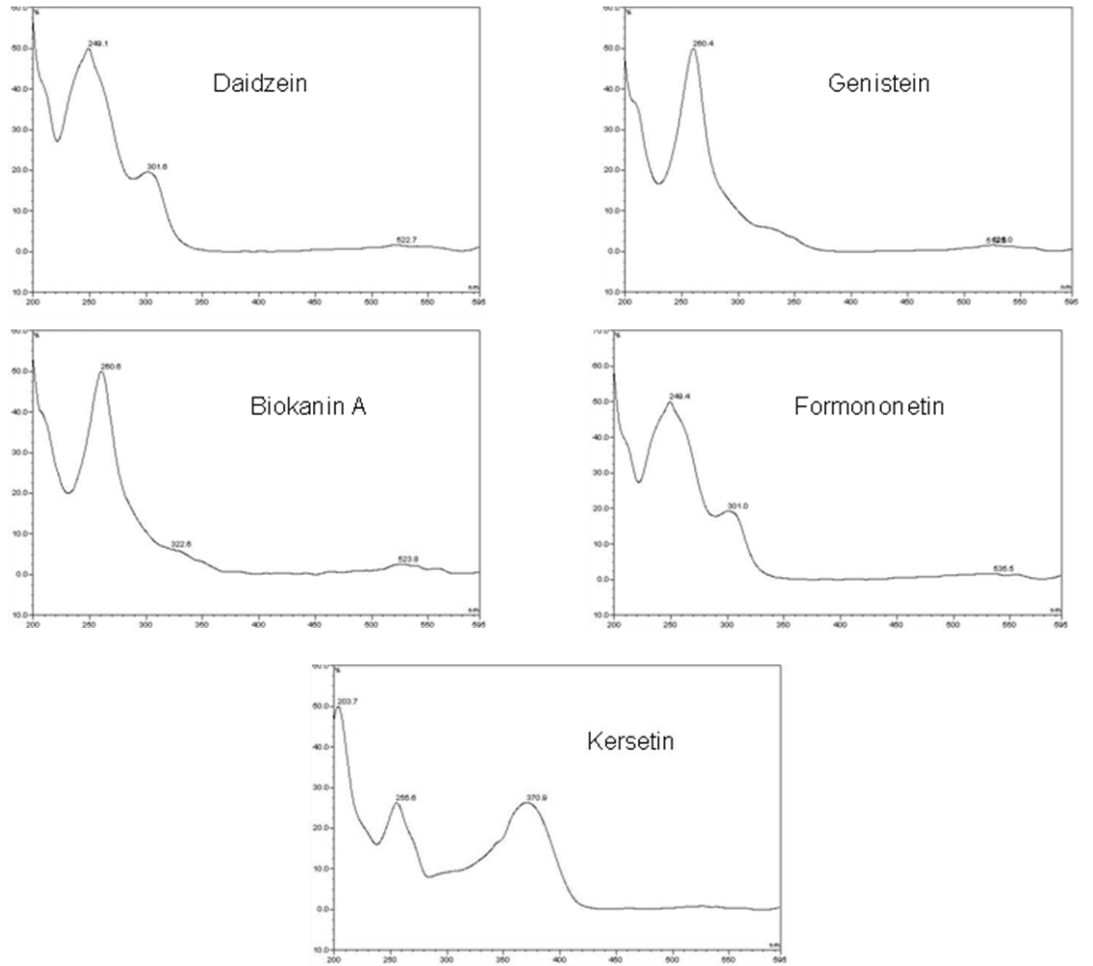
	b	a	R²	p^a
Daidzein	0,0882 (0,0850-0,0916)	0,0308 (-0,0531-0,0916)	0,9954	0,446
Genistein	0,0593 (0,0581-0,0844)	0,0128 (0,0201-0,0456)	0,9986	0,418
Formononetin	0,0823 (0,0802-0,0844)	-0,0036 (-0,0571-0,0499)	0,9979	0,888
Biokanin A	0,0911 (0,0884-0,0937)	0,0399 (-0,0284-0,1084)	0,9971	0,232

Kalibrasyon eğrileri 0,25 ile 50 µg/mL aralığında oluşturulmuştur. ^a Kesişimin p değeri, eğimin p değeri bütün numuneler için 0,0000<p'dir. $y = b \times C + a$ (y= numune alanı /IS' nin alanı; C = numune derişimi; b= eğim; a= kesişim).



Şekil 1a. İzoflavonoit standartlarının YBSK kromatogramı

D: Daidzein, Kr: Kersetin, G: Genistein, Km: Kemferol, F: Formononetin, B: Biokanin A



Şekil 1b. İzoflavonoit standartlarının UV spektrumları

4.1.4. Tekrarlanabilirlik

Üç farklı derişim (1,10 ve 40 µg/mL) aynı günde (gün içi tekrarlanabilirlik) altı farklı seride hazırlanarak analiz edilmiş ve bu işlem üç farklı günde yinelenerek (günler arası tekrarlanabilirlik) alıkonma zamanları hesaplanmış, ortalama ve BSS değerleri Tablo 11 ve Tablo 12’de verilmiştir.

Tablo 11. Gün içi alıkonma zamanı verileri (n=6)

		Daidzein	Kersetin	Genistein	Formononetin	Biokanin A
1 µg/mL						
	Ortalama	16,51	19,39	25,86	34,78	42,44
	SH	0,04	0,05	0,05	0,06	0,02
	BSS (%)	0,22	0,25	0,21	0,18	0,04
10 µg/mL						
	Ortalama	16,51	19,40	25,90	34,78	42,45
	SH	0,03	0,04	0,05	0,04	0,01
	BSS (%)	0,17	0,21	0,21	0,13	0,03
40 µg/mL						
	Ortalama	16,49	19,38	27,38	34,77	42,44
	SH	0,03	0,06	0,08	0,06	0,01
	BSS (%)	0,21	0,33	0,28	0,17	0,03

Tablo 12. Günler arası alıkonma zamanı verileri (n=3)

		Daidzein	Kersetin	Genistein	Formononetin	Biokanin A
1 µg/mL						
	Ortalama	16,53	19,43	25,92	34,78	42,44
	SH	0,09	0,10	0,11	0,15	0,03
	BSS (%)	0,55	0,50	0,43	0,42	0,07
10 µg/mL						
	Ortalama	16,54	19,46	25,97	34,81	42,46
	SH	0,10	0,11	0,13	0,15	0,03
	BSS (%)	0,61	0,59	0,50	0,42	0,07
40 µg/mL						
	Ortalama	16,59	19,51	26,87	34,89	42,47
	SH	0,13	0,18	0,61	0,16	0,04
	BSS (%)	0,80	0,91	2,26	0,46	0,09

4.1.5. Seçicilik

İzoflavonoidlerin YBSK analizlerinden elde edilen kromatogramlarda pik saflık indeksleri hesaplanmıştır. Farklı matrislerdeki pik saflık indekslerinin en küçük değerden büyük (>900) olduğu bulunmuştur.

4.1.6. Numune analizi

Kullanılan yöntem bitki ve preparat numunelerinden belirtilen yöntemlerle hazırlanan ekstrelelere uygulanmış ve elde edilen kromatogramlardan yararlanarak miktar tayini yapılmıştır. Numunelere ait kromatogramlar ve izoflavon (daidzein, genistein, formononetin, biokanin A) miktarları Tablo 13 ve Tablo 14'te verilmiştir.

Tablo 13. Bitki numune ekstrelerindeki izoflavon miktarları (%)

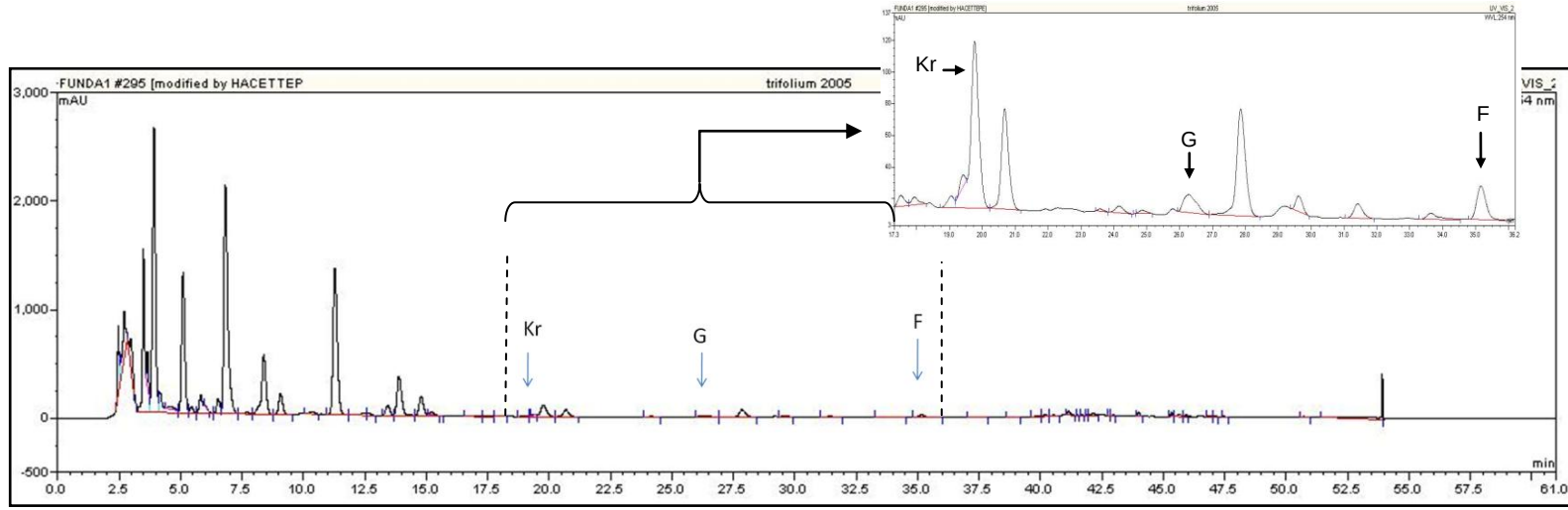
Ekstreler	Daidzein (Ortalama±SS)	Genistein (Ortalama±SS)	Formononetin (Ortalama±SS)	Biokanin A (Ortalama±SS)
<i>T. ambiguum</i>	*	0,00097±0,000256	0,00253±0,000365	*
<i>T. arvense</i> var. <i>arvense</i>	*	0,02311±0,000597	*	0,00006±0,000005
<i>T. campestre</i>	0,00511±0,000129	*	*	*
<i>T. canescens</i>	0,00217±0,000004	0,12532±0,002358	0,01005±0,000129	0,04603±0,000770
<i>T. hybridum</i> var. <i>anatolicum</i>	*	0,00104±0,000008	*	*
<i>T. hybridum</i> var. <i>hybridum</i>	*	*	0,00258±0,000125	*
<i>T. pannonicum</i>	*	0,00647±0,001494	0,00065±0,000072	0,00093±0,000062
<i>T. pratense</i> var. <i>pratense</i> -(A)	0,00484±0,000337	0,00850±0,000551	0,06088±0,003391	0,01072±0,000815
<i>T. pratense</i> var. <i>pratense</i> -(G)	0,00147±0,000008	0,03742±0,000131	0,01125±0,000507	0,00711±0,000005
<i>T. purpureum</i> var. <i>purpureum</i>	*	0,01150±0,001964	*	0,00093±0,000157
<i>T. repens</i> var. <i>repens</i>	*	0,00100±0,000148	0,00118±0,000187	*
<i>T. resupinatum</i> var. <i>microcephalum</i>	*	0,02526±0,000169	0,00224±0,000025	0,00013±0,000026
<i>T. spadiceum</i>	*	0,00156±0,000003	0,00584±0,000028	0,00091±0,000087
<i>T. trichocephalum</i>	0,01974±0,001302	*	0,00010±0,000072	*

*LOD nin altında, A: Ankara'dan toplanan örnek, G: Gümüşhane'den toplanan örnek

Tablo 14. Preparat numune ekstrelerindeki izoflavon miktarları (%)

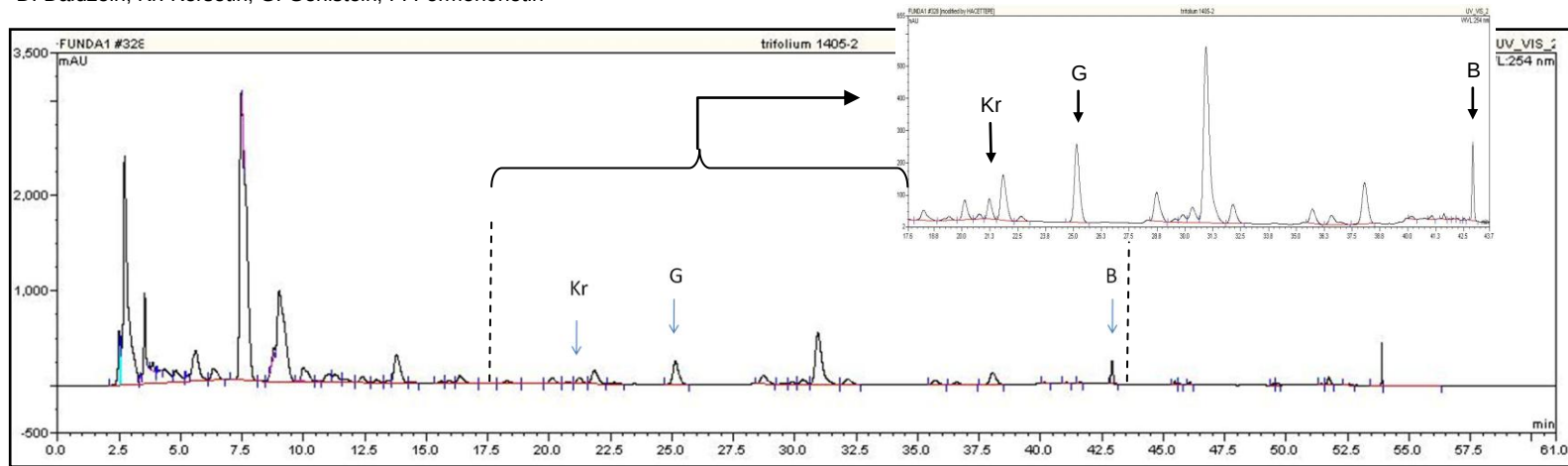
Ekstreler	Daidzein (Ortalama±SS)	Genistein (Ortalama±SS)	Formononetin (Ortalama±SS)	Biokanin A (Ortalama±SS)
TN-1	*	*	*	*
TN-2	0,00870±0,000521	0,01929±0,000085	0,13244±0,002628	*
TN-3	0,40214±0,089148	0,36230±0,076799	0,35674±0,053863	*
TN-4	0,00511±0,000099	0,03701±0,000850	0,01463±0,00044	0,03411±0,028464

*LOD nin altında



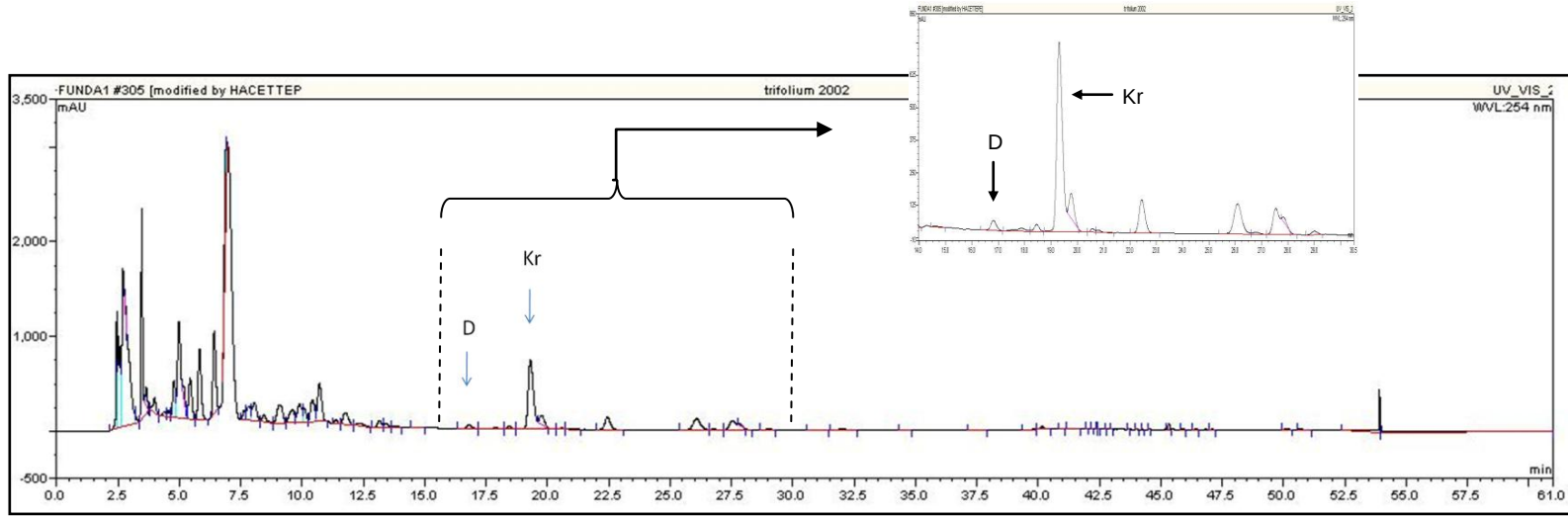
Şekil 2. *T. ambiguum* ekstresinin YBSK kromatogramı

D: Daidzein, Kr: Kersetin, G: Genistein, F: Formononetin



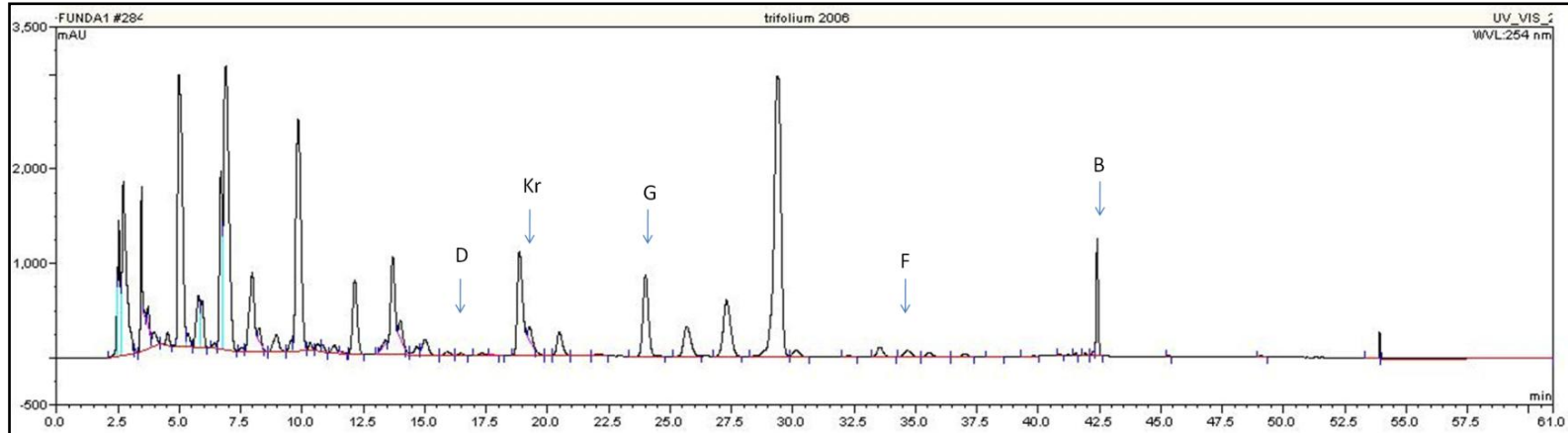
Şekil 3. *T. arvense* var. *arvense* ekstresinin YBSK kromatogramı

Kr: Kersetin, G: Genistein, B: Biokanin A



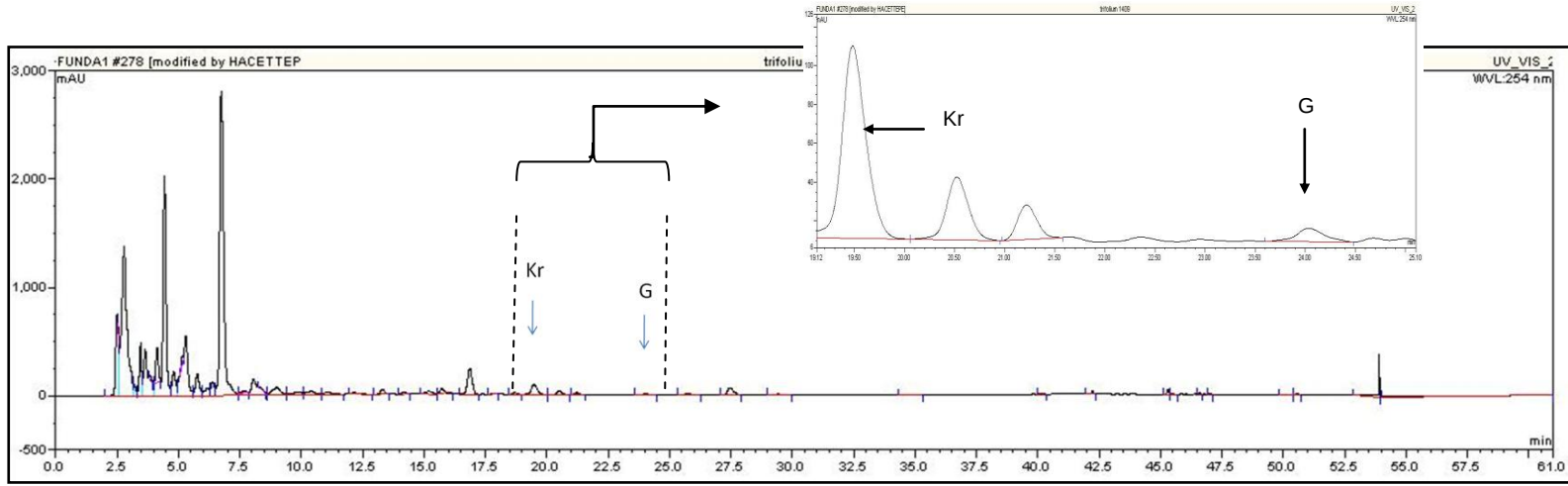
Şekil 4. *T. campestre* ekstresinin YBSK kromatogramı.

D: Daidzein, Kr: Kersetin



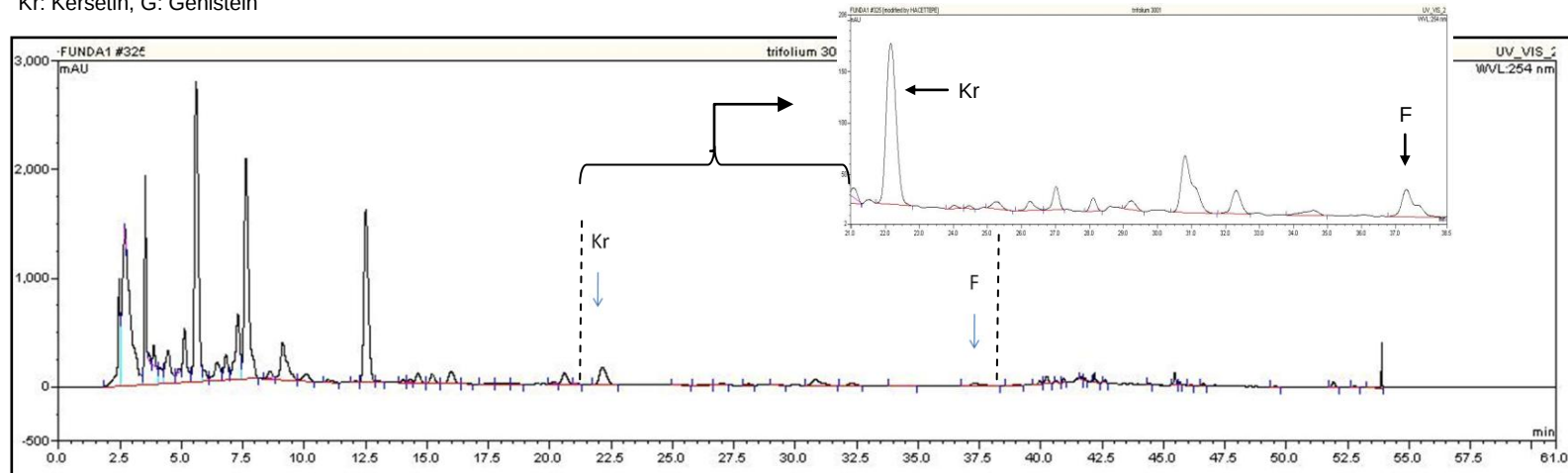
Şekil 5. *T. canescens* ekstresinin YBSK kromatogramı.

D: Daidzein, Kr: Kersetin, G: Genistein, F: Formononetin, B: Biokanin A



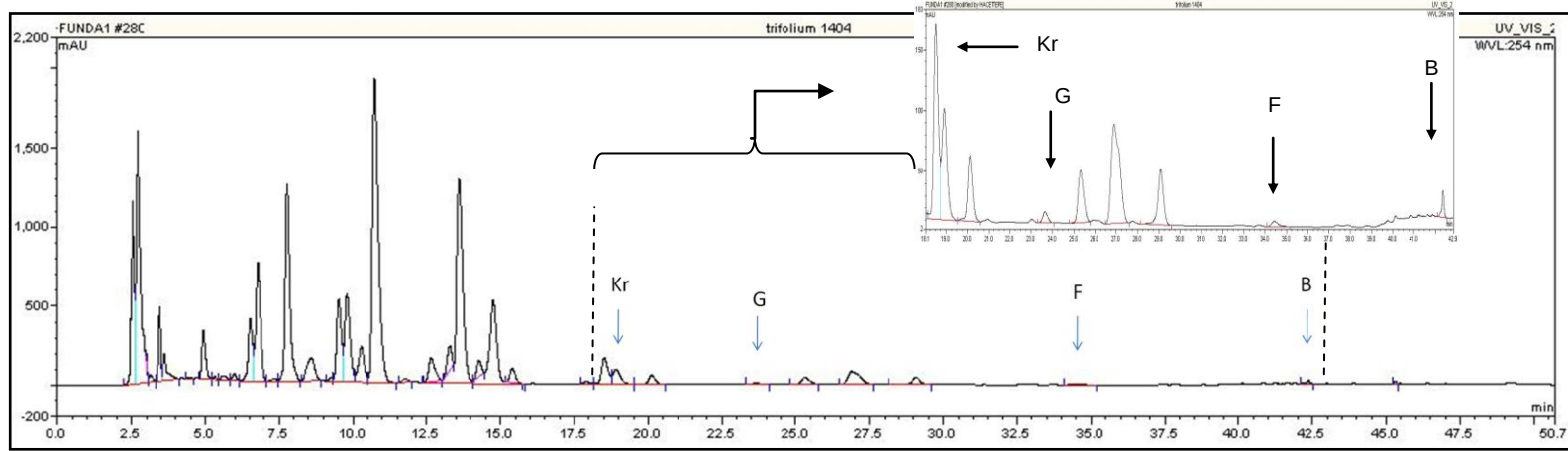
Şekil 6. *T. hybridum* var. *anatolicum* ekstresinin YBSK kromatogramı.

Kr: Kerasetin, G: Genistein



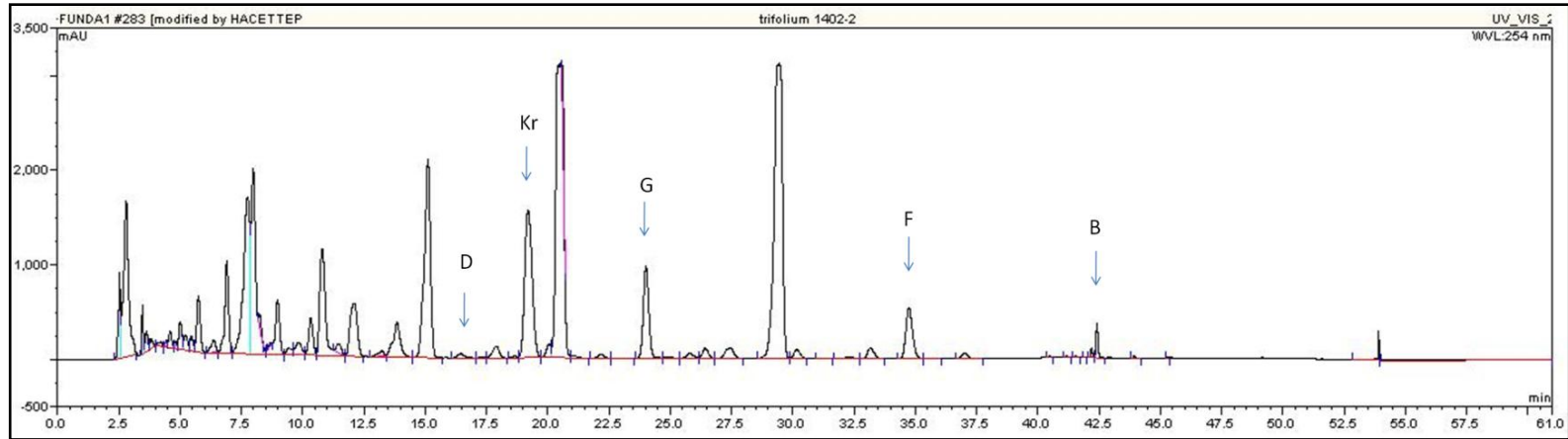
Şekil 7. *T. hybridum* var. *hybridum* ekstresinin YBSK kromatogramı.

Kr: Kerasetin, F: Formononetin



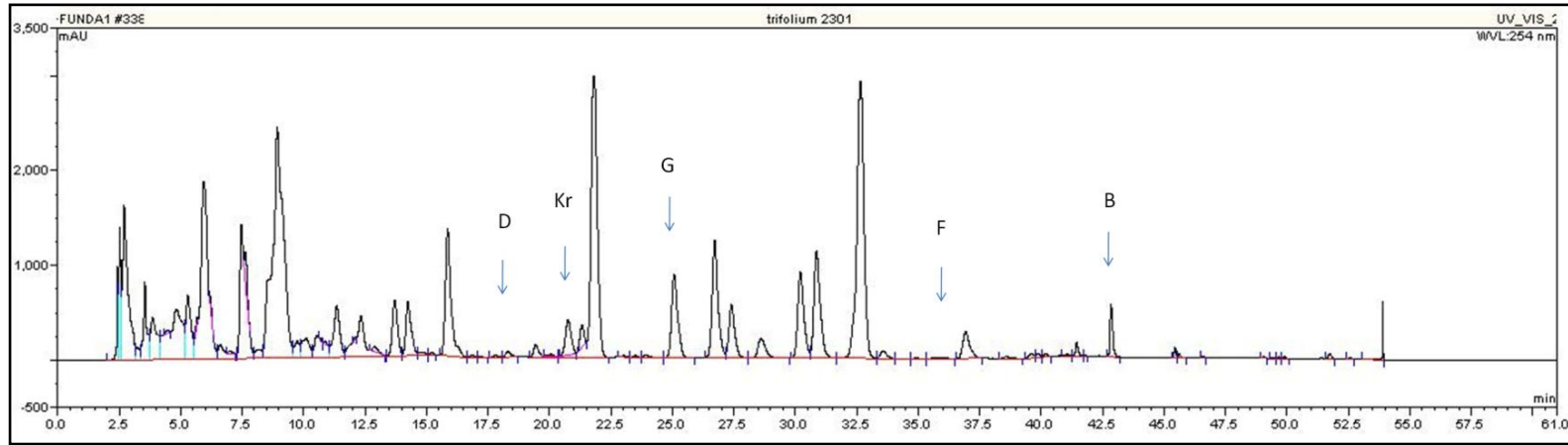
Şekil 8. *T. pannonicum* ekstresinin YBSK kromatogramı.

Kr: Kersetin, G: Genistein, F: Formononetin, B: Biokanin A



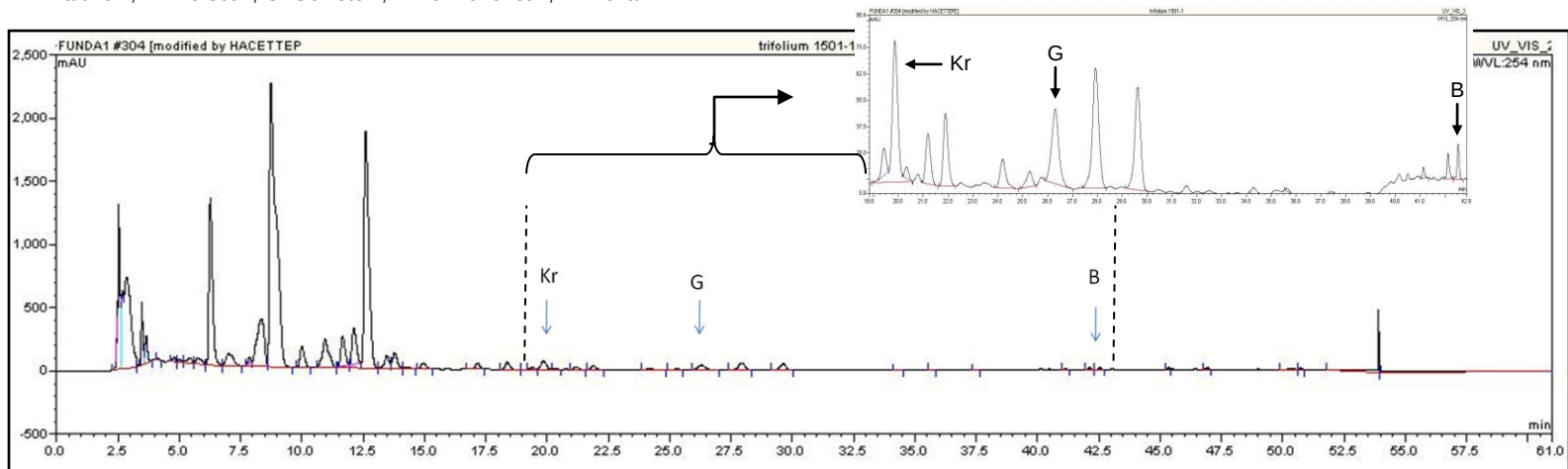
Şekil 9. *T. pratense* var. *pratense* (A) ekstresinin YBSK kromatogramı.

D: Daidzein, Kr: Kersetin, G: Genistein, F: Formononetin, B: Biokanin A



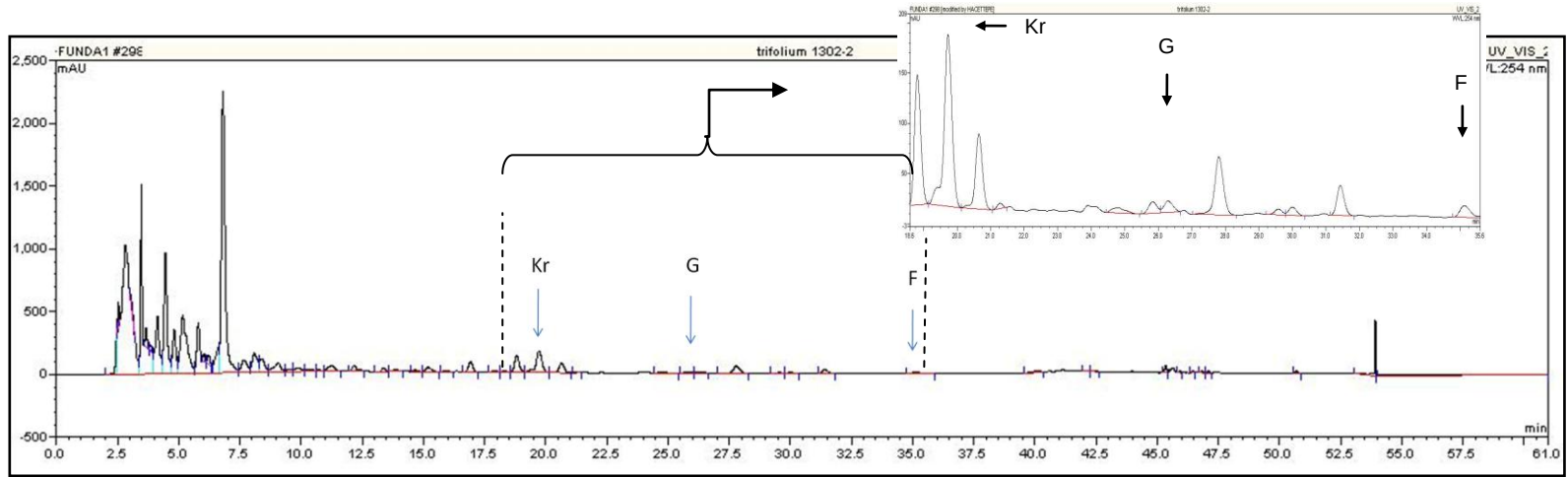
Şekil 10. *T. pratense* var. *pratense* (G) ekstresinin YBSK kromatogramı.

D: Daidzein, Kr: Kerstin, G: Genistein, F: Formononetin, B: Biokinin A



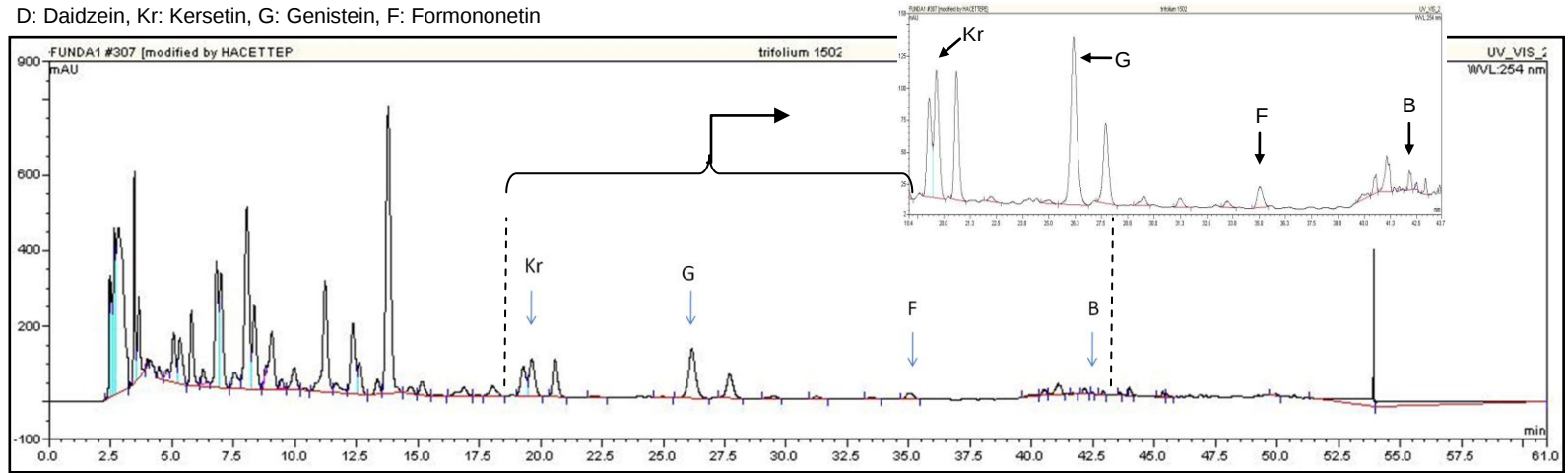
Şekil 11. *T. purpureum* var. *purpureum* ekstresinin YBSK kromatogramı.

Kr: Kerstin, G: Genistein, B: Biokinin A



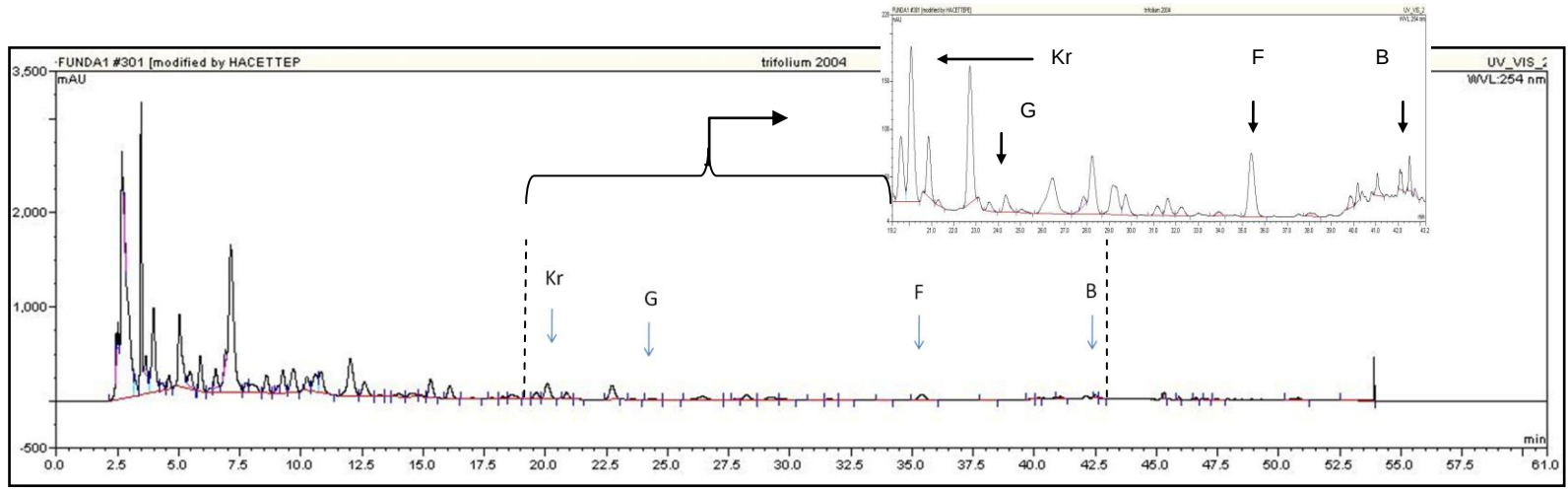
Şekil 12. *T. repens* var. *repens* ekstresinin YBSK kromatogramı.

D: Daidzein, Kr: Kersetin, G: Genistein, F: Formononetin



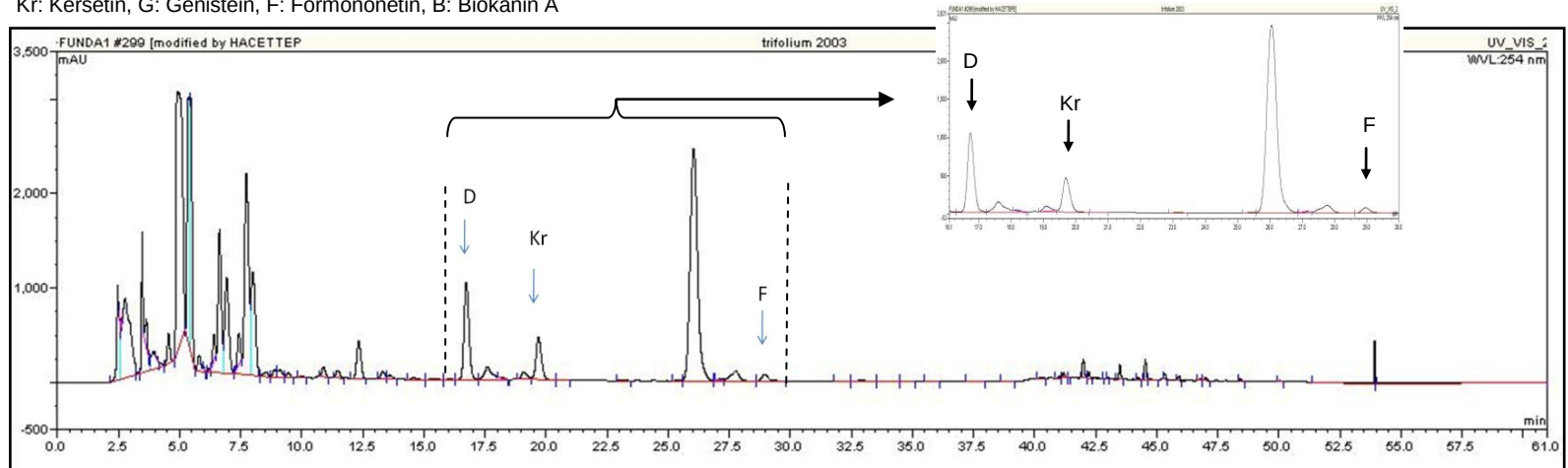
Şekil 13. *T. resupinatum* var. *microcephalum* ekstresinin YBSK kromatogramı.

Kr: Kersetin, G: Genistein, F: Formononetin, B: Biokinin A



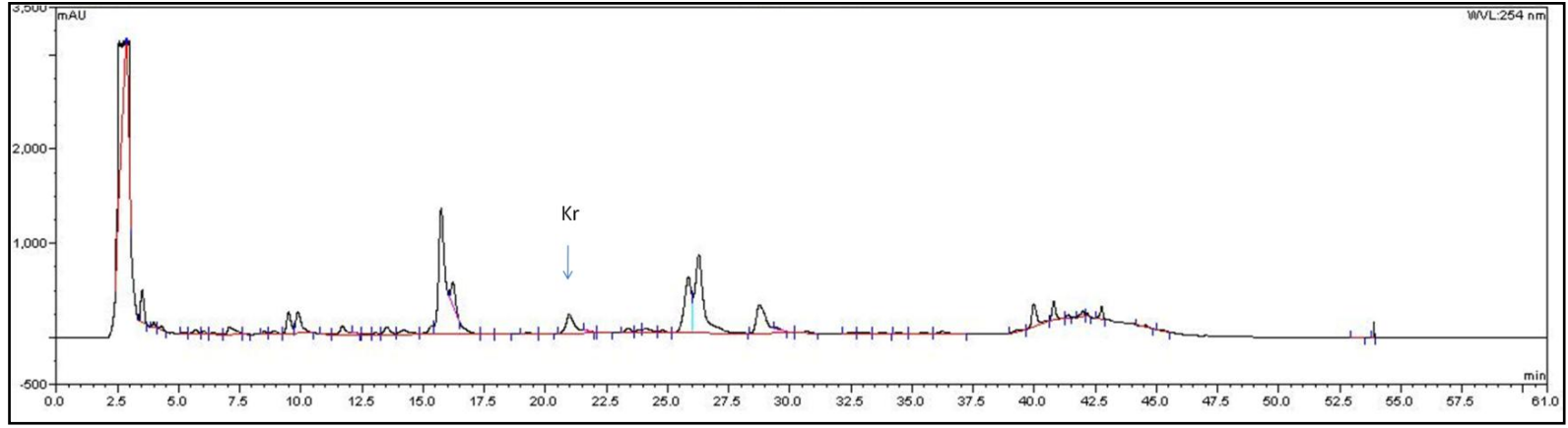
Şekil 14. *T. spadiceum* ekstresinin YBSK kromatogramı.

Kr: Kersetin, G: Genistein, F: Formononetin, B: Biochanin A



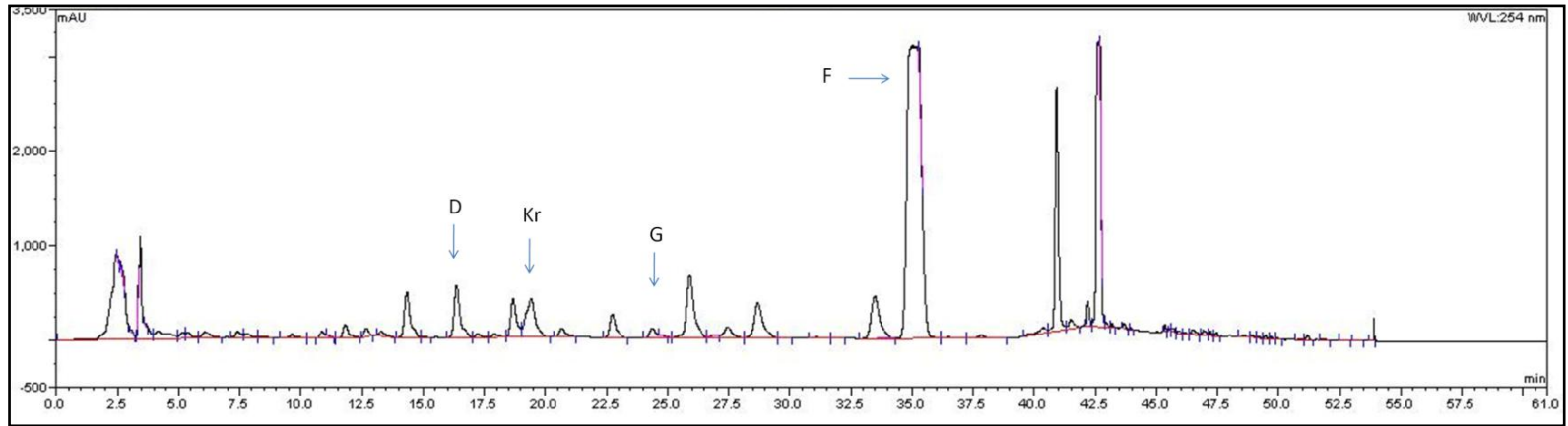
Şekil 15. *T. trichocephalum* ekstresinin YBSK kromatogramı.

D: Daidzein, Kr: Kersetin, F: Formononetin



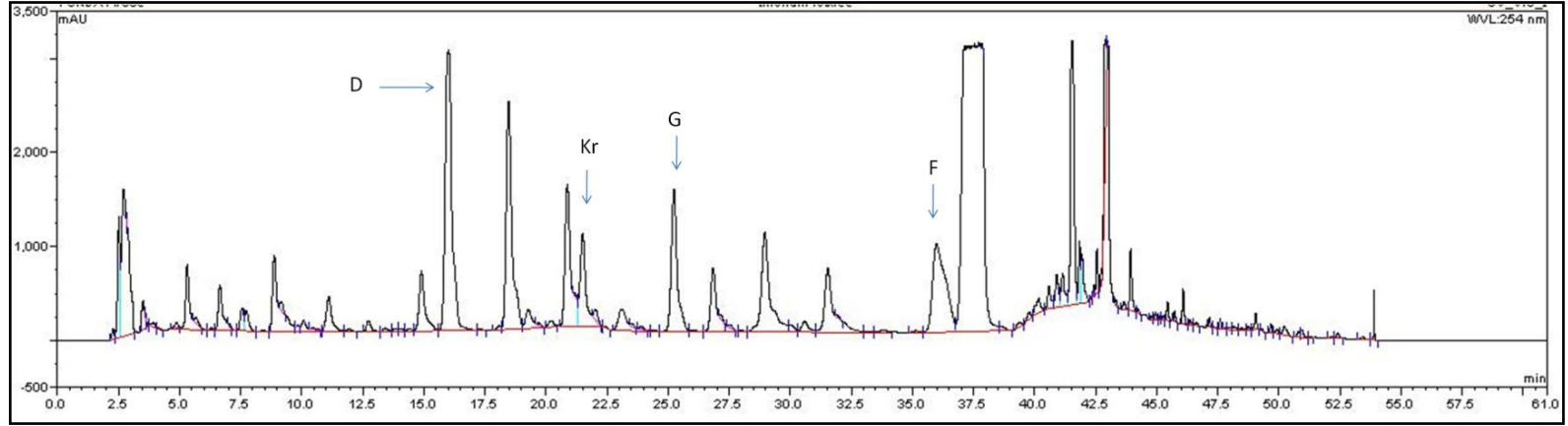
Şekil 16. TN-1 ekstresinin YBSK kromatogramı.

Kr: Kersetin



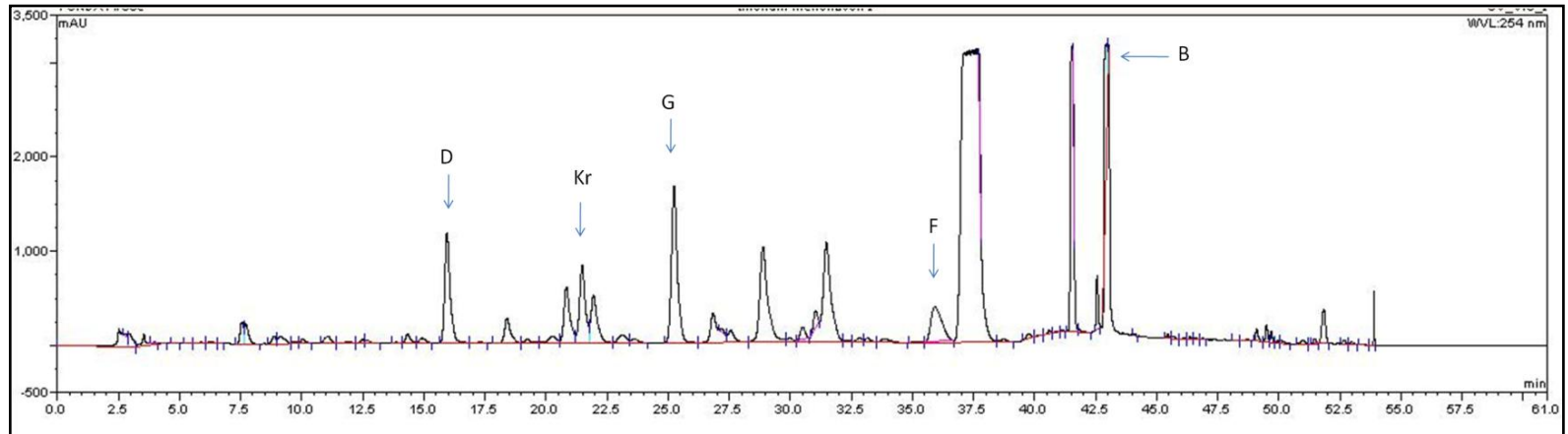
Şekil 17. TN-2 ekstresinin YBSK kromatogramı.

D: Daidzein, Kr: Kersetin, G: Genistein, F: Formononetin, B: Biokanin A



Şekil 18. TN-3 ekstresinin YBSK kromatogramı.

D: Daidzein, Kr: Kersetin, G: Genistein, F: Formononetin



Şekil 19. TN-4 ekstresinin YBSK kromatogramı.

D: Daidzein, Kr: Kersetin, G: Genistein, F: Formononetin, B: Biokanin A

4.2. Aktivite Çalışmalarına Ait Bulgular

4.2.1.Yara İyileştirici Aktivite

Tablo 15. Türkiye’de yetişen Bazı *Trifolium* L. Türlerinden Hazırlanan Ekstrelerin Çizgisel İnsizyon Yara Modeli Üzerindeki Etkileri

Materyal	İstatistik Ortalama $\pm$ O.S.H.	% Yara gerilimi
Pozitif Kontrol	9,21 $\pm$ 2,41	8,4
Negatif Kontrol	8,44 $\pm$ 2,53	-
<i>T. repens</i> var. <i>repens</i>	9,15 $\pm$ 1,98	-
<i>T. pratense</i> var. <i>pratense</i>	11,17 $\pm$ 1,61	21,3*
<i>T. pannonicum</i>	10,85 $\pm$ 2,37	17,8
<i>T. hybridum</i> var. <i>anatolicum</i>	9,73 $\pm$ 2,23	5,6
<i>T. purpureum</i> var. <i>purpureum</i>	11,02 $\pm$ 1,90	19,7
<i>T. resupinatum</i> var. <i>microcephalum</i>	9,90 $\pm$ 2,02	7,5
<i>T. trichocephalum</i>	10,11 $\pm$ 2,59	9,8
<i>T. spadiceum</i>	9,19 $\pm$ 2,42	-
<i>T. ambiguum</i>	9,42 $\pm$ 2,59	2,3
<i>T. canescens</i>	12,49 $\pm$ 1,20	35,6**
<i>T. hybridum</i> var. <i>hybridum</i>	8,85 $\pm$ 2,19	-
Madecassol [®]	14,40 $\pm$ 0,88	56,4***

Yüzde kontraksiyon oranları: Pozitif Kontrol Grubu, Negatif Kontrol Grubuna; Ekstre ve Referans grubu Pozitif Kontrol Grubuna oranla hesaplanmıştır. Yara gerilimi birimi Newton'dur.

*p < 0.05; ** : p < 0.01; *** : p < 0.001; O.S.H.: Ortalama Standart Hata

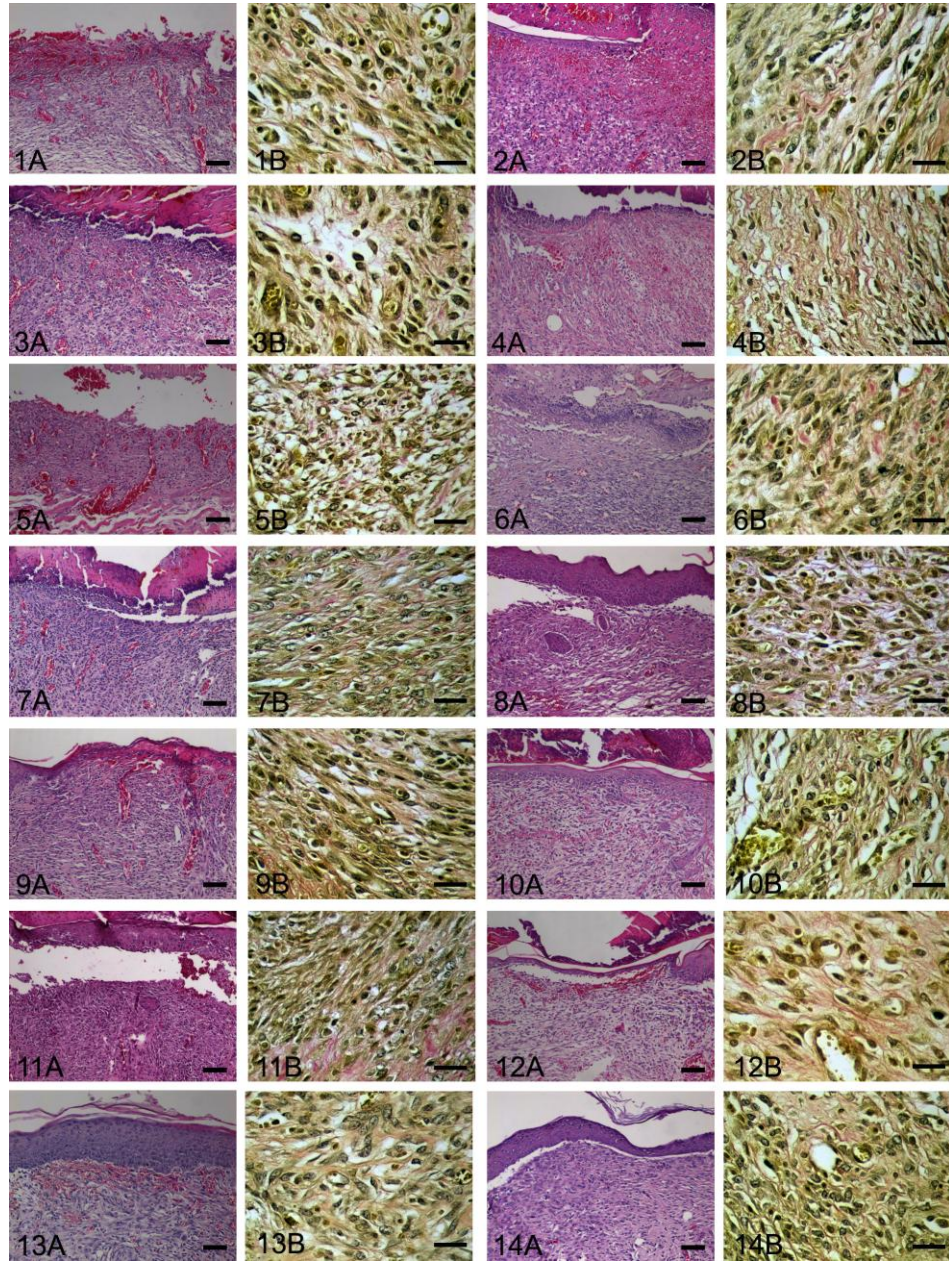
Tablo 16. Türkiye'de yetişen Bazı *Trifolium* L. Türlerinden Hazırlanan Ekstrelerin Dairesel Eksizyon Yara Modeli Üzerindeki Etkileri

Materyal Gün	Yara alanı ± O.S.H. (% Kontraksiyon)						
	0	2	4	6	8	10	12
Pozitif Kontrol	19,49 ± 2,13	16,49 ± 1,95 (3,79)	13,83 ± 1,93 (8,41)	12,36 ± 1,84 (4,99)	9,32 ± 1,19 (5,90)	6,04 ± 0,64 (3,21)	2,88 ± 0,29 (9,15)
Negatif Kontrol	19,02 ± 2,01	17,14 ± 2,03	15,10 ± 1,89	13,01 ± 1,82	9,87 ± 1,51	6,24 ± 1,16	3,17 ± 0,64
<i>T. repens</i> var. <i>repens</i>	19,70 ± 2,05	16,23 ± 2,09 (1,58)	13,35 ± 2,02 (3,47)	11,62 ± 1,80 (5,99)	8,80 ± 1,14 (5,58)	6,47 ± 0,88 -	3,03 ± 0,47 -
<i>T. pratense</i> var. <i>pratense</i>	20,02 ± 2,23	15,80 ± 1,79 (4,18)	12,97 ± 1,86 (6,22)	11,08 ± 2,05 (10,36)	7,90 ± 0,98 (15,24)	4,94 ± 0,89 (18,21)	2,01 ± 0,12 (30,21)*
<i>T. pannonicum</i>	19,42 ± 1,99	15,93 ± 1,86 (3,39)	13,12 ± 1,66 (5,13)	11,44 ± 1,69 (7,44)	8,46 ± 1,30 (9,23)	5,22 ± 0,58 (13,58)	2,51 ± 0,25 (12,85)
<i>T. hybridum</i> var. <i>anatolicum</i>	19,36 ± 1,88	15,51 ± 1,94 (5,94)	13,31 ± 1,79 (3,76)	11,58 ± 1,77 (6,31)	9,22 ± 0,95 (1,07)	6,11 ± 0,67 -	2,66 ± 0,38 (7,64)
<i>T. purpureum</i> var. <i>purpureum</i>	20,15 ± 2,29	15,37 ± 1,99 (6,79)	12,78 ± 1,84 (7,59)	11,18 ± 1,76 (9,55)	8,28 ± 1,32 (11,16)	5,59 ± 0,79 (7,45)	2,58 ± 0,35 (10,42)
<i>T. resupinatum</i> var. <i>microcephalum</i>	19,41 ± 1,89	15,85 ± 1,81 (3,88)	12,90 ± 1,78 (6,72)	12,22 ± 1,95 (1,13)	9,12 ± 1,25 (2,15)	5,85 ± 0,48 (3,15)	2,72 ± 0,30 (5,56)
<i>T. trichocephalum</i>	19,35 ± 2,11	15,59 ± 1,71 (5,46)	12,56 ± 1,95 (9,18)	11,31 ± 1,63 (8,49)	8,38 ± 0,88 (10,09)	5,31 ± 0,87 (12,09)	2,56 ± 0,51 (11,11)
<i>T. spadiceum</i>	19,55 ± 1,96	15,83 ± 1,85 (4,00)	12,84 ± 2,09 (7,16)	11,24 ± 1,78 (9,06)	9,50 ± 1,15 -	6,21 ± 0,24 -	3,04 ± 0,08 -
<i>T. ambiguum</i>	19,27 ± 1,91	16,11 ± 2,12 (2,30)	14,14 ± 2,03 -	11,83 ± 1,85 (4,29)	9,02 ± 1,10 (3,22)	5,72 ± 0,71 (5,29)	2,69 ± 0,40 (6,59)
<i>T. canescens</i>	19,24 ± 1,69	15,04 ± 1,83 (8,79)	12,79 ± 1,83 (7,49)	11,14 ± 1,99 (9,87)	7,48 ± 1,01 (19,74)	4,26 ± 0,20 (29,47)*	1,47 ± 0,42 (48,96)**
<i>T. hybridum</i> var. <i>hybridum</i>	20,06 ± 2,10	15,96 ± 1,92 (3,21)	13,59 ± 1,75 (1,74)	12,03 ± 1,88 (2,67)	8,77 ± 1,07 (5,90)	5,90 ± 0,72 (2,32)	2,76 ± 0,22 (4,17)
Madecassol®	19,70 ± 1,90	14,69 ± 1,80 (10,92)	11,19 ± 1,91 (19,09)	8,35 ± 1,12 (32,44)*	4,65 ± 0,36 (50,11)**	1,19 ± 0,12 (80,29)**	0,00 ± 0,00 (100,00)***

Yüzde kontraksiyon oranları: Pozitif Kontrol Grubu, Negatif Kontrol Grubuna; Ekstre ve Referans grubu Pozitif Kontrol Grubuna oranla hesaplanmıştır.

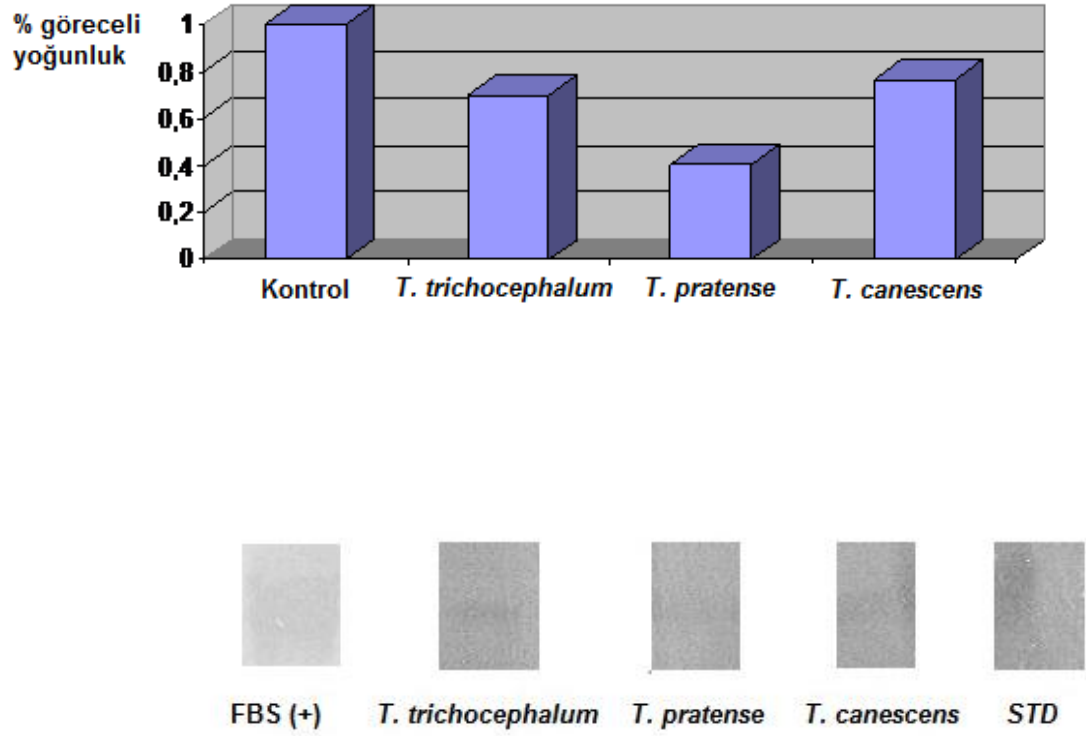
*p < 0.05; ** : p < 0.01; *** : p < 0.001; O.S.H.: Ortalama Standart Hata

Histopatoloji Bulguları



Resim 14. *Trifolium* türlerinden hazırlanan ekstratler uygulanan hayvanlarda yara iyileşmesi ve epidermal/dermal remodelling'in histopatolojik görünümü. A kodlu şekillerde hematoksislen & eosin (HE) ile boyanmış epidermis ve dermis; B kodlu şekillerde ise Van Gieson (VG) ile boyanmış dermis izlenmekte. A kodlu resimlerin original büyütmesi x 100 olup büyütme çubuğu 120 µm; B kodlu resimlerin original büyütmesi x 400 olup büyütme çubuğu 40 µm'dir. Bilgiler her gruptaki 6'şar hayvanın ortalamasını yansıtmaktadır. 1) Madecassol grubu, Madecassol uygulanmış 10 günlük yara 2) *T.canescens* grubu, *T.canescens* uygulanmış 10 günlük yara 3) *T. pratense* var. *pratense* grubu, *T. pratense* var. *pratense* uygulanmış 10 günlük yara 4) *T. pannonicum* grubu, *T. pannonicum* uygulanmış 10 günlük yara 5) *T.hybridum* var. *anatolicum* grubu, *T.hybridum* var. *anatolicum* uygulanmış 10 günlük yara 6) *T.purpureum* var. *purpureum* grubu, *T.purpureum* var. *purpureum* uygulanmış 10 günlük yara 7) *T. resupinatum* var. *microcephalum* grubu, *T. resupinatum* var. *microcephalum* uygulanmış 10 günlük yara 8) *T. trichocephalum* grubu, *T. trichocephalum* uygulanmış 10 günlük yara 9) *T. hybridum* var. *hybridum* grubu, *T. hybridum* var. *hybridum* uygulanmış 10 günlük yara 10) *T. ambiguum* grubu, *T. ambiguum* uygulanmış 10 günlük yara 11) *T. spadiceum* grubu, *T. spadiceum* uygulanmış 10 günlük yara 12) *T. repens* var. *repens* grubu, *T. repens* var. *repens* uygulanmış 10 günlük yara 13) Negatif kontrol grubu 14) Pozitif kontrol grubu

4.2.2.Aromataz Enzim İnhibitör Etki



Grafik 1. *Trifolium* L. türlerinden hazırlanan ekstrelerin aromataz enzimi üzerine etkileri

Tablo 17. *Trifolium* L. türlerinden hazırlanan ekstrelerin aromataz enzimi üzerine etkileri

Numuneler	% göreceli yoğunluk
Kontrol	1
<i>T. trichocephalum</i>	0,699
<i>T. pratense</i>	0,407
<i>T. canescens</i>	0,764

5. TARTIŞMA

Trifolium türlerinde etkili ana bileşikler olarak daidzein, genistein, formononetin ve biokanin A izoflavonoitleri bulunmaktadır. Tüm dünyada özellikle *T. pratense* türünün ekstrelerinden hazırlanan preparatlar özellikle içeriklerindeki zayıf östrojenik aktivite gösteren izoflavonoitler nedeniyle menopozla ilişkilendirilen sıcak basması gibi şikayetleri azaltmak amacıyla kullanılmaktadır. Bu tez çalışması kapsamında *T. pratense* türüne alternatif olarak kullanılabilecek *Trifolium* türlerini belirlemek için, Türkiye'nin çeşitli bölgelerinden toplanan 13 *Trifolium* türünün toprak üstü kısımlarında bulunan daidzein, genistein, formononetin ve biokanin A izoflavonoitlerinin YBSK ile miktar tayinleri yapılmıştır (Tablo 13). Ayrıca Avrupa'da ve Türkiye'de kullanılan, *Trifolium* türlerinden hazırlanan ekstreleri içeren bazı preparatlarda bulunan daidzein, genistein, formononetin ve biokanin A miktarları YBSK ile tespit edilmiştir (Tablo 14).

YBSK ile *Trifolium* türlerinde bulunan izoflavonoitler üzerinde yapılan çok sayıda miktar tayini çalışması bulunmaktadır (52, 73, 75, 109, 111, 114, 128, 150, 157). Bu nedenle ilk aşamada söz konusu çalışmaların teknikleri karşılaştırılarak kullanılacak yöntemde karar kılınmıştır.

Kullanılan yöntemin sistem uygunluğu; enjeksiyon tekrarlanabilirliği, kapasite faktörü, ayırıcılık, teorik tabaka sayısı ve pik asimetri oranına göre değerlendirilmiştir. Elde edilen değerler (Tablo 7) sınır değerler ($k' > 1$, $N > 2000$, $R_s > 1,5$, $BSS < \%1$, $As < 1,5$) içinde bulunmuştur. İzoflavonoitlerin LOD ve LOQ değerleri sırasıyla 0,002-0,521 µg/mL ve 0,006-1,724 µg/mL aralığında bulunmuştur (Tablo 8). Bitkisel numunelerin analizleri sonucu elde edilen veriler yöntemin yeterli duyarlılıkta olduğunu göstermiştir. Her bir izoflavonoit için kalibrasyon eğrileri 0,25-50 µg/mL aralığında oluşturulmuştur. Elde edilen kalibrasyon eğrilerinin korelasyon katsayılarının (R^2) 0,9954'den büyük bulunması kalibrasyon eğrilerinin doğrusallığının göstergesidir. Cihaz tekrarlanabilirliğinin test edilebilmesi için 1 µg/mL, 10 µg/mL, 40 µg/mL standart çözeltilerinden gün içinde 6'şar enjeksiyon, günler

arasında 3'er enjeksiyon yapılmıştır. Alıkonma zamanı için BSS' nin % 1'in altında (Tablo 11-12) bulunması cihaz tekrarlanabilirliğinin göstergesidir.

Seçilen yöntem ile yapılan YBSK miktar tayinlerine göre daidzein en fazla oranda *T. trichocephalum*'da, genistein en fazla oranda *T. canescens*'de, formononetin en fazla oranda *T. pratense* var. *pratense*'de; biokanın A ise en fazla oranda *T. canescens*'de bulunmuştur. Toplam izoflavonoit miktarı göz önüne alındığında *T. canescens* en zengin tür olarak değerlendirilmiş; dolayısıyla da *T. pratense*'ye alternatif olabilecek tür olarak belirlenmiştir.

Trifolium türleri üzerinde yapılmış olan miktar tayini çalışmalarında asit hidroliz yapılarak hazırlanan bitki ekstralarında bulunan formononetin ve biokanın A izoflavonoitlerinin miktarının daidzein ve genisteine oranla daha fazla olduğu görülmektedir (75, 111). Wu ve arkadaşlarının *T. repens*, *T. pratense*, *T. campestre* ve *T. hybridum* türleri üzerinde yaptıkları miktar tayini çalışmasında, *T. campestre*'nin genistein, formononetin ve biokanın A içermediği; tespit edilen daidzein oranının ise %0,00004 olduğu bildirilmiştir (157). Bizim çalışmamızda *T. campestre*'de daidzein oranı %0,00511 olarak bulunmuş ancak genistein, formononetin ve biokanın A bileşiklerine rastlanmamıştır. Yukarıdaki çalışmada *T. hybridum*'da formononetin ve biokanın A izoflavonoitleri tespit edilememiştir. Bizim çalışmamızda ise *T. hybridum*'da formononetin olduğu bulunmuştur. Aynı türler üzerinde varılan bu farklı sonuçlar gerek uygulanan yöntemlerin farklılığı ile ve gerekse bitkilerin yetiştirme bölgesindeki farklar (toprak yapısı, iklim koşulları) ile açıklanabilir.

Bu çalışma kapsamında Türkiye'de yetişen bazı *Trifolium* L. türlerinden hazırlanan ekstraların yara iyileştirici etkileri, fare ve sıçanlarda çizgisel insizyon ve dairesel eksizyon yara modelleri kullanılarak değerlendirilmiştir. Bunlara ek olarak yara iyileşme sürecinde oldukça önemli bir faktör olan histopatolojik değerlendirmeler sıçanlardan alınan doku örnekleri üzerinde yapılmıştır.

Tablo 15'te görüldüğü gibi, çizgisel insizyon yara modelinde *T. pratense* var. *pratense* ve *T. canescens*'in metanollü ekstreleri ile hazırlanan merhemin haricen uygulanması durumunda sırasıyla %21,3 ve %35,6'lık yara gerilimi ile en yüksek aktiviteye sahip oldukları belirlenmiştir. İncelenen diğer türlerden hazırlanan ekstrelerin ise bu deney modelinde herhangi bir aktiviteye sahip olmadığı görülmüştür.

Diğer bir yara modeli olan dairesel eksizyon yara modelinde ise, Tablo 2'de görüldüğü gibi *T. pratense* var. *pratense* ekstresinin deneyin 12. gününde %30,21; *T. canescens* ekstresinin ise 10. günde %29,47 ve 12. günde %48,96'lık yara kontraksiyonu ile en yüksek aktiviteye sahip olduğu belirlenmiştir. Bu sonuçlar çizgisel insizyon yara modeli sonuçları ile paralellik göstermektedir. Sonuç olarak *T. canescens* ve *T. pratense* var. *pratense* türleri yara iyileştirici etki göstermiştir. Ancak bu etki preparatın etkisi ile karşılaştırıldığında Madecassol®'ün etkisinden daha düşük bulunmuştur. Kendi içlerinde karşılaştırıldıklarında *T. canescens*, *T. pratense*'ye göre daha etkili bulunmuştur. Bu etki farkının *T. canescens*'in *T. pratense*'den daha yüksek oranda genistein ve biokanin A taşıması ile açıklanabileceği düşünülmektedir.

Histopatolojik incelemede, iyileşme sırası fazlardan enflamasyon, proliferasyon ve remodelleme göz önünde tutulduğunda en iyiden en kötüye doğru Madecassol®, *T. canescens*, *T. pratense* var. *pratense*, *T. pannonicum*, *T. hybridum* var. *anatolicum*, *T. purpureum* var. *purpureum*, *T. resupinatum* var. *microcephalum*, *T. trichocephalum*, *T. hybridum* var. *hybridum*, *T. ambiguum*, *T. spadiceum*, *T. repens* var. *repens*, negatif kontrol ve pozitif kontrol olarak sıralanmıştır. Diğer gruplara kıyasla belirgin iyileşme gözlenen *T. canescens* grubunda ayrıca epitelin iyileşme hızının dermisin iyileşmesinden daha önde olduğu gözlenmiştir. *T. pratense* var. *pratense* grubunda ise damarlaşma diğer gruplara oranla belirgin derecede fazla bulunmuştur.

İnsanlarda aromataz enzimi over granüloza hücreleri, plasenta, testislerde Leydig hücreleri ayrıca beyin ve ciltteki fibroblastlar gibi çeşitli

ekstraglandular hücreler dahil olmak üzere pek çok hücrede sentezlenir (27). Aromataz enzim kompleksi ovaryum, testis, plasenta, beyin ve adipoz doku dahil olmak üzere pek çok dokuda androjenlerin östrojenlere dönüşümünü katalizler (13, 55). Östrojen sentezindeki artış endometriyozis, meme kanserinde tümör büyümesi, jinekomasti gibi çeşitli hastalıklarda rol oynamaktadır (26, 27, 126). Bu nedenle aromataz enzimi hastalıkların mekanizmasının anlaşılması ve tedavisinde önemlidir.

Daha önce fitoöstrojenlerin olası etki mekanizmalarından birisi olarak aromataz inhibisyonunun olabileceği ileri sürülmüştür (66). 2006 yılında yapılan bir çalışmada da genisteinin potansiyel aromataz inhibitör etkisi tespit edilmiştir (112).

In vitro aromataz inhibisyonu testleri için 13 bitki örneği içinde tez için esas alınan izoflavonoit bileşikler bakımından en yüksek değerlere sahip olan *T. trichocephalum*, *T. pratense* var. *pratense* ve *T. canescens* seçilmiştir. Söz konusu bitki ekstrelerinin kontrol grubuna göre bazal aromataz inhibisyonu yaptıkları görülmüştür (Grafik 1).

Bu test çalışmasında 2 tanesi Almanya'dan getirilmiş, 2 tanesi de Türkiye bitkisel ürün pazarından temin edilmiş (Çek Cumhuriyeti'nden ithal) 4 ticari numunenin (TN1-4) analizleri de yapılmıştır. Denenen ticari numunelerin birinde (TN1) tespit edilebilecek miktarda izoflavonoit bulunamamıştır. Diğer ticari numunelerin (TN2-4) ürün kutularında belirtilen izoflavonoit miktarları ile bizim çalışma modelimizde bulunan izoflavonoit miktarları örtüşmemektedir. Bu miktarlar sırasıyla; TN-2 için etikette belirtilen %8, bizim çalışmamızda bulunan izoflavonoit oranı %0,16; TN-3 için etikette belirtilen %4,56, bizim çalışmamızda bulunan izoflavonoit oranı %1,12; TN-4 için etikette belirtilen %7,08, bizim çalışmamızda bulunan izoflavonoit oranı % 0,09 olarak tespit edilmiştir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Trifolium türleri üzerinde yapılan çalışmalar derlendiğinde ağırlıklı olarak *T. pratense* türünün öne çıktığı görülmektedir. Buna paralel olarak *Trifolium* ekstrelerinden hazırlanan preparatların hemen hepsinde *T. pratense* türü kullanılmaktadır. *T. pratense* üzerinde yapılan çalışmalarda herhangi bir alttür veya varyete belirtilmesi bulunmamaktadır. Bununla birlikte çeşitli kaynaklarda *T. pratense* var. *pratense*'nin çok yaygın biçimde yetiştiği vurgulanmaktadır. *T. pratense* türü Türkiye bitki örtüsünde 3 varyete ile (*T. pratense* var. *pratense*, *T. pratense* var. *sativum*, *T. pratense* var. *americanum*) temsil edilmektedir. Bu nedenle *T. pratense* var. *pratense* türü karşılaştırma için seçilen örnek olmuştur. Bu arada yapılan deneylerde varılan sonuçlar iki farklı bölgeden (Ankara ve Gümüşhane) toplanan *T. pratense* var. *pratense* örneklerinin kimyasal içeriklerinin –incelenen 4 izoflavonoit bileşiği açısından- birbirlerinden farklı olduğunu göstermiştir. Farklılıklar bileşikden bileşiğe değişkenlik gösterdiğinden (Tablo 14) 4 izoflavonoitin toplam değeri üzerinden en yüksek içeriğe sahip olduğu görülen Ankara örneği çalışmamızda esas alınmıştır.

Tez kapsamında yapılan çalışmalar sonucunda kullanılan YBSK yönteminin *Trifolium* türlerine uygulanabilir olduğu görülmüştür. Varılan sonuçlar, Rize, İkizdere, Cimil Vadisi'nde yetişen *T. canescens* türünün incelenen izoflavonoitler açısından Türkiye'de yetişen *T. pratense* var. *pratense* türünden daha yüksek oranda izoflavonoit içeriğine sahip olduğunu, dolayısıyla alternatif bir tür olarak değerlendirilebileceğini göstermiştir.

Trifolium ekstrelerinin yara iyileştirici etki yönünden değerlendirilmesi yapıldığında tez kapsamındaki bitki örneklerinden *T. canescens* ve *T. pratense* var. *pratense* türleri anlamlı düzeyde yara iyileştirici etki göstermiştir. Bununla birlikte türlerin bu etkileri, referans madde olarak kullanılan preparatın (Madecassol®) etkisinden daha düşük bulunmuştur. Histopatolojik çalışmaların sonuçları da bu öngörüğü desteklemektedir. Çalışılan diğer türlerin yara iyileştirici etkileri anlamlı düzeyde yüksek bulunmamıştır.

Çalışılan *Trifolium* türlerinin aromataz enzim inhibisyonu testleri sonucunda elde edilen inhibisyon oranları; *T. pratense* var. *Pratense* > *T. trichocephalum* > *T. canescens* şeklinde gözlenmiştir. Bu etki istatistiksel olarak değerlendirilememiş, ancak gözlemsel olarak belirlenmiştir. İstatistiksel değerlendirmeler için daha kapsamlı deneylere gerek bulunmaktadır. Nitekim çalışılan izoflavonoit bileşikleri açısından bir sıralama yapıldığında *T. canescens* > *T. pratense* var. *pratense* > *T. trichocephalum* sıralaması gözlenmekle birlikte aromataz inhibisyonunda varılan ön sonuçlar bu konuda daha farklı bir sıralama ortaya koymuştur. Bu durum çalışılan *Trifolium* türlerinin tüm izoflavonoit içeriğinin incelenmemiş olmasıyla açıklanabilir.

Trifolium türlerinin ortaya koyduğu östrojenik etkiler dikkate alındığında bundan sonraki aşamada aromataz inhibisyonu konusunda daha ayrıntılı ve daha ileri çalışmalara gerek olduğu anlaşılmaktadır.

Piyasa ürünleri üzerinde yürütülen çalışmalar sonucunda ürünlerin ambalajlarında belirtilen izoflavonoit oranlarını taşımadıkları anlaşılmıştır. Ürünlerin bir tanesinde de var olduğu belirtilen *T. pratense* türünün varlığından şüphe edilecek sonuçlara ulaşılmıştır. Bu durumda gerek yurtdışında satışı yapılan ve gerekse Türkiye bitkisel ürün pazarında yer alan ve *Trifolium* ekstresi taşıyan ürünler, güvenilir ve kaliteli ürünler olarak kabul edilememiştir. Türkiye’de satışı yapılacak bu (ve benzeri) ürünlerin çok daha ciddi analizler sonucunda piyasaya sürülmeleri, insan sağlığı ve ortaya konacak yararlar açısından gerekli görülmüştür.

KAYNAKLAR

1. Adam, M., Dobias, P., Eisner, A. ve Ventura K. (2008). Headspace single-drop microextraction of herbal essential oils. *Journal of Separation Science*, 31, 356-363.
2. Adams, N. R. (1995). Organizational and activational effects of phytoestrogens on the reproductive tract of the ewe. *Society for Experimental Biology and Medicine*, 208, 87-91.
3. Adlercreutz, H., Honjo, H., Higashi, A., Fotsis, T., Hamalainen, E. ve diğeri. (1991). Urinary excretion of lignans and isoflavonoid phytoestrogens in Japanese men and women consuming a traditional Japanese diet. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 54, 1093-1100.
4. Adlercreutz, H. (1995). Phytoestrogens: epidemiology and a possible role in cancer protection. *Environmental Health Perspectives*, 103(7), 103-112.
5. Agelet, A. ve Valles, J. (2003). Studies on pharmaceutical ethnobotany in the region of Pallars (Pyrenees, Catalonia, Iberian Peninsula) Part II. New or very rare uses of previously known medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology*, 84, 211-227.
6. Alves, D. L., Lima, S. M. R. R., Silva, C. R., Galvao, M. A. L., Shanaider, A., Prado, R. A. A. ve Aoki, T. (2008). Effects of *Trifolium pratense* and *Cimicifuga racemosa* on the endometrium of wistar rats. *Maturitas*, 61, 364-370.
7. Al-Qura'n, S. (2005). Ethnobotanical survey of folk toxic plants in southern part of Jordan. *Toxicon*, 46, 119-129.
8. Anderson, J. J. B. ve Garner, S. C. (1997). The effects of phytoestrogens on bone. *Nutrition Research*, 17(10), 1617-1632.

9. Atkinson, C., Compston, J. E., Day, N. E., Dowsett, M. ve Bingham, S. A. (2004). The effects of phytoestrogen isoflavones on bone density in women: a double blind, randomized, placebo-controlled trial. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 79, 326-333.
10. Ayres, J. F., Murison, R. D., Turner, A. D. ve Harden, S. (2001). A rapid semi-quantitative procedure for screening hydrocyanic acid in white clover (*Trifolium repens* L.). *Australian Journal of Experimental Agriculture*, 41, 515-521.
11. Baber, R. J., Templeman, C., Morton, T., Kelly, G. E. ve West, L. (1999). Randomized placebo-controlled trial of an isoflavone supplement and menopausal symptoms in women. *Climacteric*, 2, 85-92.
12. Barnes, S. (2003). Phyto-oestrogens and osteoporosis: what is a safe dose. *British Journal of Nutrition*, 89, Supplement 1, 101-108.
13. Barry, M. ve Kell, M. R. (2009). Enhancing the adjuvant treatment of hormone receptor positive breast cancer. *The Breast Journal*, 15(2), 194-198.
14. Baytop, T. (1997). Türkçe Bitki Adları Sözlüğü 2. Baskı, Ankara: Atatürk Kültür Dil ve Tarih Yüksek Kurumu, Türk Dil Kurumu Yayınları, No:578.
15. Baytop, T. (1999). Türkiye’de Bitkilerle Tedavi 2. Baskı, İstanbul: Nobel Tıp Kitabevi.
16. Beck, V., Unterrieder, E., Krenn, L., Kubelka, W. and Jungbauer, A. (2003). Comparison of hormonal activity (estrogen, androgen and progestin) of standardized plant extracts for large scale use in hormone replacement therapy. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 84, 259-268.
17. Beck, V., Rohr, U. ve Jungbauer, A. (2005). Phytoestrogens derived from red clover: An alternative to estrogen replacement therapy. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 94, 499-518.

18. Benitez, G., Gonzalez-Tejero, M. R. ve Molero-Mesa, J. (2010). Pharmaceutical ethnobotany in the western part of Granada province (southern Spain): ethnopharmacological synthesis. *Journal of Ethnopharmacology*, 129, 87-105.
19. Bickoff, E. M., Lyman, R. L., Livingston, A. L. ve Booth A. N. (1957). Characterization of coumestrol, a naturally occurring plant estrogen. *Journal of the American Chemical Society*, 80, 3969-3971.
20. Bingham, S. A., Atkinson, C., Liggins, J., Bluck, L. ve Coward, A. (1998). Phyto-oestrogens: where are we now? *British Journal of Nutrition*, 79, 393-406.
21. Birt, D. F., Hendrich, S. ve Wang, W. (2001). Dietary agents in cancer prevention: flavonoids and isoflavonoids. *Pharmacology and Therapeutics*, 90, 157-177.
22. Booth, N. L., Overk, C. R., Yao, P., Burdette, J. E., Nikolic, D., Chen, S. ve diğeri. (2006). The chemical and biologic profile of a red clover (*Trifolium pratense* L.) phase II clinical extract. *The Journal of Alternative and Complementary Medicine*, 12(2), 133-139.
23. Brössner, C., Petritsch, K., Fink, K., Auپرich, M., Madersbacher, S., Adlercreutz, H. ve diğeri (2004). Phyto-oestrogen tissue levels in benign prostatic hyperplasia and prostate cancer and their association to prostatic diseases. *Urology*, 64(4), 707-711.
24. Brössner, C., Petritsch, K., Fink, K., Auپرich, M., Ponholzer, A., Madersbacher, S. ve diğeri (2006). Prostatic phyto-oestrogen tissue levels in different Austrian regions. *Urologia Internationalis*, 76, 327-331.
25. Buchbauer, G., Jirovetz, L. ve Nikiforov, A. (1996). Comparative investigation of essential clover flower oils from Austria using gas chromatography-flame ionization detection, gas chromatography-mass spectrometry, and gas chromatography-olfactometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44, 1827-1828.

26. Bulun, S. E., Zeitoun, K., Takayama, K., Noble, L., Michael, D., Simpson, A. ve diğerleri (1999). Estrogen production in endometriosis and use of aromatase inhibitors to treat endometriosis. *Endocrine-Related Cancer*, 6, 293-301.
27. Bulun, S. E., Chen, D., Lu, M., Zhao, H. Cheng, Y., Demura, M. ve diğerleri (2007). Aromatase excess in cancers of breast, endometrium and ovary. *The Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology*, 106, 81-96.
28. Buttery, R. G., Kamm, J. A., Ling, L. C. (1984). Volatile components of red clover leaves, flowers and seed pods: possible insect attractants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 32, 254-256.
29. Byfield, A. J. (2000). *Trifolium* L. Güner, A., Özhatay, N., Ekim, T., Başer, K. H. C. (ed.) Flora of Turkey and East Aegean Islands Suppl. II. (s.95). Edinburgh: Edinburgh University Press.
30. Camejo-Rodrigues, J., Ascensao, L., Bonet, M. A. ve Valles, J. (2003). An ethnobotanical study of medicinal and aromatic plants in the Natural Park of 'Serra de Sao Mamede' (Portugal). *Journal of Ethnopharmacology*, 89, 199-209.
31. Cappelletti, E. M., Trevisan, R. ve Caniato, R. (1982). External antirheumatic and antineuralgic herbal remedies in the traditional medicine of north-eastern Italy. *Jornal of Ethnopharmacology*, 6(2), 161-190.
32. Chedraui, P., San Miguel, G., Hidalgo, L., Morocho, N. ve Ross, S. (2008). Effect of *Trifolium pratense* derived isoflavones on the lipid profile of postmenopausal women with increased body mass index. *Gynecological Endocrinology*, 24 (11), 620-624.
33. Chen, H., Wang, X., Jin, Z., Xu, X., Zhao, J. ve Xie, Z. (2008). Protective effect of isoflavones from *Trifolium pratense* on dopaminergic neurons. *Neuroscience Research*, 62, 123-130.

34. Chifundera, K. (2001). Contribution to the inventory of medicinal plants from the Bushi area, south Kivu province, democratic republic of Congo. *Fitoterapia*, 72, 351-368.
35. Claus, E. P., Tyler, V. E. (1965). Pharmacognosy 5. Baskı, Philadelphia: Lea & Febiger.
36. Clifton-Bligh, P. B., Baber, R. J., Fulcher, G. R., Nery, M. ve Moreton, T. (2001). The effect of isoflavones extracted from red clover (Rimostil) on lipid and bone metabolism. *The Journal of The North American Menopause Society*, 8 (4), 259-265.
37. Collinge, D. B. ve Hughes, M. A. (1982). Development and physiological studies on the cyanogenic glucosides of white clover, *Trifolium repens* L. *Journal of Experimental Botany*, 33(132), 154-161.
38. Coon, J. T., Pittler, M. H. ve Ernst, E. (2007). *Trifolium pratense* isoflavones in the treatment of menopausal hot flushes: A systematic review and meta-analysis. *Phytomedicine*, 14, 153-159.
39. Davis, P. H. (1970). Flora of Turkey and East Aegean Islands Vol. 3. (s. 1-6). Edinburgh: Edinburgh University Press.
40. Davis, P. H., Mill, R. R. ve Tan, K. (1988). Flora of Turkey and the East Aegean Islands, Vol.10 (supplement I).(s. 95). Edinburgh: Edinburgh University Press.
41. D'Amelio, F. S. (1999). Botanicals, A Phytocosmetic Desk Reference, London: CRC Press.
42. Dornstauder, E., Jisa, E., Unterrieder, I., Krenn, L., Kubelka, W. ve Jungbauer, A. (2001). Estrogenic activity of two standardized red clover extracts (Menoflavon) intended for large scale use in hormone replacement therapy. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 78, 67-75.

43. Drenin, A. A., Botirov, E. K. ve Petrulyak, E. V. (2008). Two new isoflavonoid monogalactosides from *Trifolium pratense* Roots. *Chemistry of Natural Compounds*, 44(1), 24-27.
44. Duran, A. (1998). Akseki (Antalya) ilçesindeki bazı bitkilerin yerel adları ve etnobotanik özellikleri. *Ot Sistematiği Botanik Dergisi*, 5(1), 77-92.
45. Dweck, A. C. (2009). The internal and external use of medicinal plants. *Clinics in Dermatology*, 27, 148-158.
46. El Beyrouthy, M., Arnold, N., Delelis-Dusollier, A. ve Dupont, F. (2008). Plants used as remedies antirheumatic and antineuralgic in the traditional medicine of Lebanon. *Journal of Ethnopharmacology*, 120, 315-334.
47. Engelhardt, P. F. ve Riedl, C. R. (2004). The effect of an isoflavone extract from red clover on prostate, micturition, sexual function and quality of life: a preliminary study report. *European Urology Supplements* 3, 2, 94.
48. Figueiredo, R., Rodrigues, A. I. ve Costa, M. C. (2007). Volatile composition of red clover (*Trifolium pratense* L.) forages in Portugal: The influence of ripening stage and ensilage. *Food Chemistry*, 104, 1445-1453.
49. Foo, L. Y., Lu, Y., Molan, A. L., Woodfield, D. R. ve McNabb, W. C. (2000). The phenols and prodelfinidins of white clover flowers. *Phytochemistry*, 54, 539-548.
50. Fraishtat, P. D., Popravko, S. A. ve Vul'fson, N. S. (1979). Secondary metabolites of clover II, Isolation of 4'-5-dihydroxy-6,7-methylenedioxyisoflavone and its 4'-O- β -D-glucoside from the roots of red clover (*Trifolium pratense*). *Bioorganicheskaya Khimiya (Soviet Journal of Bioorganic Chemistry)*, 5(2), 162-166.
51. Fraishtat, P. D., Popravko, S. A. ve Vul'fson, N. S. (1981). Secondary metabolites of clover VIII, Isolation and identification of pterocarpan in

the roots of cultured varieties of clover. *Bioorganicheskaya Khimiya* (Soviet Journal of Bioorganic Chemistry), 7(6), 504-512.

52. Franke, A. A., Custer, L. J., Cerna, C. M. ve Narala, K. K. (1994). Quantitation of phytoestrogens in legumes by HPLC. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 42, 1905-1913.
53. Frankenfeld, C. L., McTiernan, A., Tworoger, S. S., Atkinson, C., Thomas, W. K., Stanczyk, F. Z. ve diğerleri. (2004). Serum steroid hormones, sex hormones, sex hormone-binding globulin concentrations, and urinary hydroxylated estrogen metabolites in post-menopausal women in relation to daidzein-metabolizing phenotypes. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 88, 399-408.
54. Fugh-Berman, A., Kronenberg, F. (2001). Red clover (*Trifolium pratense*) for menopausal women: current state of knowledge. *Menopause*, 8(5), 333-337.
55. Garcia-Segura, L. M. (2008). Aromatase in the brain: not just for reproduction anymore. *Journal of Neuroendocrinology*, 20(6), 705-712.
56. Gill, S. (1963). Badania składu chemicznego *Trifolium arvense* L. *Dissertationes Pharmaceuticae*, 15(2), 241-249.
57. Godevac, D., Zdunic, G., Savikin, K., Vajs, V. ve Menkovic, N. (2008). Antioxidant activity of nine Fabaceae species growing in Serbia and Montenegro. *Fitoterapia*, 79, 185-187.
58. Gollschewski, S., Kitto, S., Anderson, D. ve Lyons-Wall, P. (2008). Women's perceptions and beliefs about the use of complementary and alternative medicines during menopause. *Complementary Therapies in Medicine*, 16, 163-168.
59. Gonzalez-Tejero, M. R., Casares-Porcel, M., Sanchez-Rojas, C. P., Ramiro-Gutierrez, J. M., Molero-Mesa, J., Pieroni, A. ve diğerleri (2008).

Medicinal plants in the Mediterranean area: synthesis of the results of the project Rubia. *Journal of Ethnopharmacology*, 116, 341-357.

60. Gruenwald, J., Brendler, T. ve Jaenicke, C. (2007). *PDR for Herbal Medicines* (4. bs.). New Jersey: Thomson Healthcare Inc.
61. Hanlidou, E., Karousou, R., Kleftoyanni, V. ve Kokkini, S. (2004). The herbal market of Thessaloniki (N Greece) and its relation to the ethnobotanical tradition. *Journal of Ethnopharmacology*, 91, 281-299.
62. Heck, A. M., Dewitt, B. A. ve Lukes, A. L. (2000). Potential interactions between alternative therapies and warfarin, *American Journal of Health-System Pharmacy*, 57, 1221-1227.
63. Hidalgo, L. A., Chedraui, P. A., Morocho, N., Ross, S. ve San Miguel, G. (2005). The effect of red clover isoflavones on menopausal symptoms, lipids and vaginal cytology in menopausal women: a randomized, double-blind, placebo-controlled study. *Gynecological Endocrinology*, 21(5), 257-264.
64. Howes, J. B., Tran, D., Brillante, D. ve Howes, L. G. (2003). Effects of dietary supplementation with isoflavones from red clover on ambulatory blood pressure and endothelial function in postmenopausal type 2 diabetes. *Diabetes, Obesity and Metabolism*, 5, 325-332.
65. ICH Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q 2(R1), Harmonised Tripartite Guideline (2006). London: European Medicines Agency.
66. Ingram, D., Sanders, K., Kolybaba, M. ve Lopez, D. (1997). Case-control study of phyto-oestrogens and breast cancer. *The Lancet*, 350, 990-994.
67. Ingram, D. M., Hickling, C., West, L., Mahe, L. J. ve Dunbar, P.M. (2002). A double blind randomised controlled trial of isoflavones in the treatment of cyclical mastalgia. *The Breast*, 11, 170-174.

68. Işık, E., Sabudak, T., Öksüz, S. (2007). Flavonoids from *Trifolium resupinatum* var. *microcephalum*. *Chemistry of Natural Compounds*, 43(5), 614-615.
69. Kami, T. (1978). Qualitative and quantitative analyses of the essential oils of red and ladino white clovers. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 26(5), 1194-1197.
70. Khaosaad, T., Krenn, L., Medjakovic, S., Ranner, A., Lössl, A., Nell, M. ve diğerleri. (2008). Effect of mycorrhization on the isoflavone content and the phytoestrogen activity of red clover. *Journal of Plant Physiology*, 165, 1161-1167.
71. Klejdus, B., Vitamvasova, D. ve Kuban, V. (1999). Reversed-phase high-performance liquid chromatographic determination of isoflavones in plant materials after isolation by solid-phase extraction. *Journal of Chromatography A*, 839, 261-263.
72. Klejdus, B., Vitamvasova-Sterbova, D. ve Kuban, V. (2001). Identification of isoflavone conjugates in red clover (*Trifolium pratense*) by liquid chromatography-mass spectrometry after two-dimensional solid-phase extraction. *Analytica Chimica Acta*, 450, 81-97.
73. Klejdus, B., Vacek, J., Lojkova, L., Benesova, L. ve Kuban, V. (2008). Ultrahigh-pressure liquid chromatography of isoflavones and phenolic acids on different stationary phases. *Journal of Chromatography A*, 1195, 52-59.
74. Knight, D. C., Howes, J. B. ve Eden, J. A. (1999). The effect of Promensil, an isoflavone extract, on menopausal symptoms. *Climacteric*, 2, 79-84.
75. Krenn, L., Unterrieder, I., ve Ruprecht, R. (2002). Quantification of isoflavones in red clover by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography B*, 777, 123-128.

76. Kroyer, G., T. (2004). Red clover extract as antioxidant active and functional food ingredient. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 5, 101-105.
77. Kurzer, M. S. ve Xu, X. (1997). Dietary phytoestrogens. *Annual Review of Nutrition*, 17, 353-381.
78. Lam, A. N. C., Demasi, M., James, M. J., Husband, A. J. ve Walker, C. (2004). Effect of red clover isoflavones on Cox-2 activity in murine and human monocyte/macrophage cells. *Nutrition and Cancer*, 49(1), 89-93.
79. Leporatti, M. L. ve Ivancheva, S. (2003). Preliminary comparative analysis of medicinal plants used in the traditional medicine of Bulgaria and Italy. *Journal of Ethnopharmacology*, 87, 123-142.
80. Levy, J. R., Faber, K. A., Ayyash, L. ve Hughes, C. L. (1995). The effect of prenatal exposure to the phytoestrogen genistein on sexual differentiation in rats. *Society for Experimental Biology and Medicine*, 208, 60-66.
81. Lewis, W. H. ve Elvin-Lewis, P. F. (2003). *Medical Botany, Plants Affecting Human Health*, New Jersey: John Wiley & Sons.
82. Liu, J., Burdette, J. E., Xu, H., Gu, C., van Breemen, R. B., Bhat, K. P. L. ve diğ erleri. (2001). Evaluation of estrogenic activity of plant extracts for the potential treatment of menopausal symptoms. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 2472-2479.
83. Livingston, A. L., Bickoff, E. M. ve Jurd, L. (1964). Isolation of Daphnoretin from Ladino Clover. *Agricultural and Food Chemistry*, 12(6), 535-536.
84. Lodhi, S., Pawar, R.S., Jain, A.P., Singhai, A.K. (2006). Wound healing potential of *Tephrosia purpurea* (Linn.) Pers. in rats. *Journal of Ethnopharmacology* 108, 204-210.

85. Lokar, L. C. ve Poldini, L. (1988). Herbal remedies in the traditional medicine of the Venezia Giulia region (North East Italy). *Journal of Ethnopharmacology*, 22(3), 231-279.
86. Madersbacher, S., Ponholzer, A., Schatzl, G., Gsur, A., Haidinger, G., Vries, C. ve diğerleri (2003). Phyto-oestrogens in BPH and prostate cancer patients. *European Urology Supplements* 2, 1, 36.
87. Miletic, S., Milosavljevic, S. ve Vidakovic, M. (1991). The isolation and identification of flavonoids from the leaves of *Trifolium pannonicum* L. *Journal of the Serbian Chemical Society*, 56(6), 307-310.
88. Mohamed, K. M., Ohtani, K., Kasai, R. ve Yamasaki, K. (1995). Oleanene glycosides from seeds of *Trifolium alexandrinum*. *Phytochemistry*, 40(4), 1237-1242.
89. Mohamed, K. M., Mohamed, M. H., Ohtani, K., Kasai, R. ve Yamasaki, K. (1999). Megastigmane glycosides from seeds of *Trifolium alexandrinum*. *Phytochemistry*, 50, 859-862.
90. Mohamed, K. M., Hassanean, H. A., Ohtani, K., Kasai, R. ve Yamasaki, K. (2000). Chalcanol glucosides from seeds of *Trifolium alexandrinum*. *Phytochemistry*, 53, 401-404.
91. Morton, M. S., Chan, P. S. F., Cheng, C., Blacklock, N., Matos-Ferreira, A., Abranches-Monteiro, L. ve diğerleri (1997). Lignans and isoflavonoids in plasma and prostatic fluid in men: samples from Portugal, Hong Kong and the United Kingdom. *The Prostate*, 32, 122-128.
92. Mousavi, Y. ve Adlercreutz, H. (1993). Genistein is an effective stimulator of sex hormone-binding globulin production in hepatocarcinoma human liver cancer cells and suppresses proliferation of these cells in culture. *Steroids*, 58(7), 301-304.

93. Mu, H., Bai, Y. H., Wang, S. T., Zhu, Z. M. ve Zhang, Y. W. (2008). Research on antioxidant effects and estrogenic effect of formononetin from *Trifolium pratense* (red clover). *Phytomedicine*, 16 (4), 314-319.
94. Nestel, P. J., Pomeroy, S., Kay, S., Komesaroff, P., Behrsing, J., Cameron, J. D. ve West, L. (1999). Isoflavones from red clover improve systemic arterial compliance but not plasma lipids in menopausal women. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 84(3), 895-898.
95. Neves, J. M., Matos, C., Moutinho, C., Queiroz, G. ve Gomes, L. R. (2009). Ethnopharmacological notes about ancient uses of medicinal plants in Tras-os-Montes (northern of Portugal). *Journal of Ethnopharmacology*, 124, 270-283.
96. Nissan, H. P., Lu, J., Booth, N. L., Yamamura, H. I., Farnsworth, N. R. Ve Wang, Z. J. (2007). A red clover (*Trifolium pratense*) phase II clinical extract possesses opiate activity. *Journal of Ethnopharmacology*, 112, 207-210.
97. Occhiuto, F., Zangla, G., Samperi, S., Palumbo, D. R., Pino, A., Pasquale, R. D. ve diğerleri. (2008). The phytoestrogenic isoflavones from *Trifolium pratense* L. (Red clover) protects human cortical neurons from glutamate toxicity. *Phytomedicine*, 15, 676-682.
98. Occhiuto, F., Palumbo, D. R., Samperi, S., Zangla, G., Pino, A., Pasquale, R. ve Circosta, C. (2009). The isoflavones mixture from *Trifolium pratense* L. Protects HCN 1-A neurons from oxidative stres. *Phytotherapy Research*, 23, 192-196.
99. Oleszek, W. ve Stochmal, A. (2002). Triterpene saponins and flavonoids in the seeds of *Trifolium* species. *Phytochemistry*, 61, 165-170.
100. Overk, C. R., Guo, J., Chadwick, L. R., Lantvit, D. D., Minassi, A., Appendino, G. ve diğerleri. (2008). In vivo estrogenic comparisons of *Trifolium pratense* (red clover) *Humulus lupulus* (hops), and the pure

compounds isoxanthohumol and 8-prenylnaringenin. *Chemico-Biological Interactions*, 176, 30-39.

101. Özyazıcıoğlu, N., Polat, S. ve Bıçakçı, H. (2010). The effect of training programs on traditional approaches that mothers use in emergencies. *Journal of Emergency Nursing*, baskıda, doi:10.1016/j.jen.2009.10.021.
102. Paplauskiene, V., Sprainaitis, A. (2003). Variability of cyanogenic glucoside content in white clover plants. *Biologija*, 1, 85-88.
103. Parvu, E. (2004). *Trifolium pratense* for breast disease: a case series. *Homeopathy*, 93, 45-50.
104. Peng, Y. Y. ve Ye, J. N. (2006). Determination of isoflavones in red clover by capillary electrophoresis with electrochemical detection. *Fitoterapia*, 77, 171-178.
105. Pengelly, A. (1996). *Constituents of Medicinal Plants*, Avustralya: CABI Publising.
106. Peterson, G. ve Barnes, S. (1991). Genistein inhibition of the growth of human breast cancer cells: Independence from estrogen receptors and the multi-drug resistance gene. *Biocemical and Biophysical Research Communications*, 179(1), 661-667.
107. Pieroni, A., Giusti, M. E., Münz, H., Lenzarini, C., Turkovic, G. ve Turkovic, A. (2003). Ethnobotanical knowledge of the Istro-Romanians of Zejane in Croatia. *Fitoterapia*, 74, 710-719.
108. Pieroni, A., Dibra, B., Grishaj, G., Grishaj, I. ve Maçai, S. G. (2005). Traditional phytotherapy of the Albanians of Lepushe, Northern Albanian Alps. *Fitoterapia*, 76, 379-399.
109. Polasek, J., Queiroz, E. F. ve Hostettmann, K. (2007). On-line identification of phenolic compounds of *Trifolium* species using HPLC-UV-MS and Post-column UV-derivatisation. *Phytochemical Analysis*, 18, 13-23.

110. Ponce, M. A., Scervino, J. M., Erra-Balsells, R., Ocampo, J. A. ve Godeas, A. M. (2004). Flavonoids from shoots and roots of *Trifolium repens* (white clover) grown in presence or absence of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices*. *Phytochemistry*, 65, 1925-1930.
111. Ramos, G. P., Dias, P. M. B., Morais, C. B., Fröhlich, P. E., Dall'Agnol, M. ve Zuanazzi, J. A. S. (2008). LC determination of four isoflavone aglycones in red clover (*Trifolium pratense* L.). *Chromatographia*, 67 (1/2), 125-129.
112. Rice, S., Mason, H. D. ve Whitehead, S. A. (2006). Phytoestrogens and their low dose combinations inhibit mRNA expression and activity of aromatase in human granulosa-luteal cells. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 101, 216-225.
113. Rigat, M., Bonet, M. A., Garcia, S., Garnatje, T. ve Valles, J. (2007). Studies on pharmaceutical ethnobotany in the high river Ter valley (Pyrenees, Catalonia, Iberian Peninsula). *Journal of Ethnopharmacology*, 113, 267-277.
114. Rijke, E., Zafra-Gomez, A., Ariese, F., Brinkman, U. A. ve Gooijer, C. (2001). Determination of isoflavone glucoside malonates in *Trifolium pratense* L. (red clover) extracts: quantification and stability studies. *Journal of Chromatography A*, 932, 55-64.
115. Rijke, E., Zappey, H., Ariese, F., Gooijer, C. ve Brinkman, U. A. T. (2004). Flavonoids in Leguminosae: Analysis of extracts of *T. pratense* L., *T. dubium* L., *T. repens* L. and *L. corniculatus* L. leaves using liquid chromatography with UV, mass spectrometric and fluorescence detection, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 378, 995-1006.
116. Rokaya, M. B., Münzbergova, Z. ve Timsina, B. (2010). Ethnobotanical study of medicinal plants from the Humla district of western Nepal. *Journal of Ethnopharmacology*, 130(3), 485-504.

117. Sabudak, T., Khan, M. T. H., Choudhary, M. I., Öksüz, S. (2006). Potent tyrosinase inhibitors from *Trifolium balansae*. *Natural Product Research*, 20(7), 665-670.
118. Sabudak, T. Işık, E. ve Öksüz, S. (2007). Lipid constituents of *Trifolium resupinatum* var. *microcephalum*. *Natural Product Research*, 21(9), 828-833.
119. Sabudak, T. Işık, E. ve Öksüz, S. (2008). Two new compounds from *Trifolium resupinatum* var. *microcephalum*. *Journal of Asian Natural Products Research*, 10(11), 1017-1021.
120. Sabudak, T. ve Güler, N. (2009). *Trifolium* L. – A review on its phytochemical and pharmacological profile. *Phytotherapy Research*, 23, 439-446.
121. Sachse, J. (1974). Die bestimmung östrogener isoflavone und cumöstrol in klee (*Trifolium pratense* L. und *Trifolium repens* L.). *Journal of Chromatography*, 96, 123-136.
122. Sachse, J. (1984). Quantitative Hochdruckflüssigchromatographie von isoflavonen in rotklee (*Trifolium pratense* L.). *Journal of Chromatography*, 298, 175-182.
123. Sadaf, F., Saleem, R., Ahmed, M., Ahmad, S.I., Navaid-UI, Z. (2006). Healing potential of cream containing extract of *Sphaeranthus indicus* on dermal wounds in guinea pigs. *Journal of Ethnopharmacology* 107, 161-163.
124. Sakamoto, S., Kofuji, S., Kuroyanagi, M., Ueno, A. ve Sekita, S. (1992). Saponins from *Trifolium repens*. *Phytochemistry*, 31(5), 1773-1777.
125. Samman, S., Wall, P. M. L., Chan, G. S. M., Smith, S. J. ve Petocz, P. (1999). The effect of supplementation with isoflavones on plasma lipids and oxidisability of low density lipoprotein in premenopausal women. *Atherosclerosis*, 147, 277-283.

126. Santen, R. J., Brodie, H., Simpson, E. R., Siiteri, P. K. ve Brodie, A. (2009). History of aromatase: saga of an important biologic mediator and therapeutic target. *Endocrine Reviews*, 30(4), 343-375.
127. Saric-Kundalic, B., Dobes, C., Klatte-Asselmeyer, V. ve Saukel, J. (2010). Ethnobotanical study on medicinal use of wild and cultivated plants in middle, south and west Bosnia and Herzegovina. *Journal of Ethnopharmacology*, 131(1), 33-55.
128. Saviranta, N. M. M., Anttonen, M. J., Wright, A. ve Karjalainen, R. O. (2008). Red clover (*Trifolium pratense* L.) isoflavones: determination of concentrations by plant stage, flower colour, plant part and cultivar. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 88, 125-132.
129. Saxena, V. K. ve Jain, A. K. (1986). Genistein 7-(2"-p-coumaroylglucoside) from *Trifolium repens*. *Phytochemistry*, 25(11), 2687-2688.
130. Schult, T. M. K., Ensrud, K. E., Blackwell, T., Ettinger, B., Wallace, R. ve Tice, J. A. (2004). Effect of isoflavones on lipids and bone turnover markers in menopausal women. *Maturitas*, 48, 209-218.
131. Schultz, G. ve Böhrer, I. (1971). Flavones of *Trifolium pannonicum*. *Phytochemistry*, 10(12), 3315.
132. Sezik, E., Yeşilada, E., Tabata, M., Honda, G., Takaishi, Y., Fujita, T., Tanaka, T. ve diğerleri. (1997). Traditional medicine in Turkey VIII. Folk medicine in east anatolia: Erzurum, Erzincan, Ağrı, Kars, Iğdır Provinces. *Economic Botany*, 51(3), 195-211.
133. Simonet, A. M., Stochmal, A., Oleszek, W. ve Macias, F. A. (1999). Saponins and polar compounds from *Trifolium resupinatum*. *Phytochemistry*, 51, 1065-1067.
134. So, F. V., Guthrie, N., Chambers, A. F. ve Carroll, K. K. (1997). Inhibition of proliferation of estrogen receptor-positive MCF-7 human breast cancer

- cells by flavonoids in the presence and absence of excess estrogen. *Cancer Letters*, 112, 127-133.
135. Spencer, R. R., Witt, S. C., Lundin, R. E. ve Bickoff E. M. (1967). Bicoumol, a new bicoumarinyl, from ladino clover. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 15(3), 536-538.
 136. Stochmal, A. ve Oleszek, W. (1997). Changes of cyanogenic glucosides in white clover (*Trifolium repens* L.) during the growing season. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45, 4333-4336.
 137. Stürtz, M., Lander, V., Schmid, W. ve Winterhalter, P. (2006). Preparative isolation of isoflavones from soy and red clover. *Molecular Nutrition and Food Research*, 50, 356-361.
 138. Suguna, L., Singh, S., Sivakumar, P., Sampath, P., Chandrakasan, G. (2002). Influence of *Terminalia chebula* on dermal wound healing in rats. *Phytotherapy Research*, 16, 227-231.
 139. Tangpu, V., Temjenmongla, K. ve Yadav, A. K. (2004). Anticestodal activity of *Trifolium repens* extract. *Pharmaceutical Biology*, 42(8), 656-658.
 140. Tapia, T., Perich, F., Pardo, F., Palma, G. ve Quiroz, A. (2007). Identification of volatiles from differently aged red clover (*Trifolium pratense*) root extracts and behavioural responses of clover root borer (*Hylastinus obscurus*) (Marsham) (Coleoptera:Scolytidae) to them. *Biochemical Systematics and Ecology*, 35, 61-67.
 141. Tava, A. ve Annicchiarico, P. (2000). Spectrophotometer-aided evaluation of cyanogenic potential in white clover (*Trifolium repens* L.). *Phytochemical Analysis*, 11, 169-173.
 142. Thompson, A. C. ve Knight, W. E. (1978). Surface lipids of *Trifolium* species. *Phytochemistry*, 17(10), 1755-1756.

143. Tice, J. A., Ettinger, B., Ensrud, K. E., Wallace, R. B., Blackwell, T. ve Cummings, S. R. (2003). Phytoestrogen supplements for the treatment of hot flashes: the isoflavone clover extract (ICE) study. *Journal of American Medicinal Association*, 290, 207-214.
144. Toebes, A. H. W., Boer, V., Verkleij, J. A. C., Lingeman, H. ve Ernst, W. H. O. (2005). Extraction of isoflavone malonylglucosides from *Trifolium pratense* L., *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 4660-4666.
145. Tosun, F., Akyüz Kızılay, Ç., Şener, B., Vural, M. ve Palittapongarnpim, P. (2004). Antimycobacterial screening of some Turkish plants. *Journal of Ethnopharmacology*, 95, 273-275.
146. Trease, G. E. (1978). Pharmacognosy (s. 103-107), London: Bailliere Tindall.
147. Tsunoda, N., Pomeroy, S. ve Nestel P. (2002). Absorption in humans of isoflavones from soy and red clover is similar. *American Society for Nutritional Sciences*, 2199-2201.
148. Vacek, J., Klejdus, B., Lojkova, L. ve Kuban, V. (2008). Current trends in isolation, separation, determination and identification of isoflavones: A review. *Journal of Separation Science*, 31, 2054-2067.
149. Van de Weijer, P. H. M. ve Barentsen, R. (2002). Isoflavones from red clover (Promensil®) significantly reduce menopausal hot flush symptoms compared with placebo. *Maturitas*, 42, 187-193.
150. Vetter, J. (1995). Isoflavones in different parts of common *Trifolium* species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 43, 106-108.
151. Wang, S., Ghisalberti, E. L. ve Ridsdill-Smith, J. (1999). Volatiles from *Trifolium* as feeding deterrents of redlegged earth mites. *Phytochemistry*, 52, 601-605.
152. Weenink, R. O. (1962). Minor constituents of the acetone-soluble lipids of red-clover (*Trifolium pratense*) leaves. *Biochemistry Journal*, 82, 523-527.

153. Weenink, R. O. (1964). Lipids of the acetone-insoluble fraction from red-clover (*Trifolium pratense*) leaves. *Biochemical Journal*, 93, 606-611.
154. Weenink, R. O. ve Shorland, F. B. (1964). The isolation of trans-3-hexadecenoic acid from the lipids of red-clover (*Trifolium pratense*) leaves. *Biochimica et Biophysica Acta*, 84, 613-614.
155. Wende, K., Krenn, L., Unterrieder, I. ve Lindequist, U. (2004). Red clover extracts stimulate differentiation of human osteoblastic osteosarcoma HOS58 cells. *Planta Medica*, 70, 1003-1005.
156. Williamson, E. M., Okpako, D. T. ve Evans, F. J. (1996). Pharmacological Methods in Phytotherapy Research Volume 1: Selection, Preparation and Pharmacological Evaluation of Plant Material, West Sussex: John Wiley & Sons.
157. Wu, Q., Wang, M. ve Simon, J. E. (2003). Determination of isoflavones in red clover and related species by high-performance liquid chromatography combined with ultraviolet and mass spectrometric detection. *Journal of Chromatography A*, 1016, 195-209.
158. Zhan, Q., Xia, Z., Wang, J. ve Lao, A. (2003). Two new bicoumarins from *Trifolium repens* L. *Journal of Asian Natural Products Research*, 5(4), 303-306.
159. Zohary, M. (1970). *Trifolium* L. Davis P. H. (ed.). Flora of Turkey and East Aegean Islands Vol.3. (s. 384-448). Edinburgh: Edinburgh University Press.
160. Zomlefer, W. B. (1994). Plant Families (s. 160-166). London: The University of North Carolina Press.

ÖZGEÇMİŞ

15.07.1980 tarihinde Trabzon'da doğdum. İlk öğrenimimi Trabzon İskenderpaşa İlkokulu'nda, orta öğrenimimi ise Trabzon Kanuni Anadolu Lisesi, Trabzon Yomra Fen Lisesi ve Trabzon Lisesi'nde tamamladım. 1998 yılında Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi'ni kazanarak lisans eğitimime başladım ve 2002 yılında mezun oldum. Aynı yıl H. Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü Farmasötik Botanik Programına yüksek lisans öğrencisi olarak kaydoldum ve Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Botanik Anabilim Dalı'nda araştırma görevlisi olarak çalışmaya başladım. Ocak 2005'te Prof. Dr. Nurten Ezer danışmanlığında "Türkiye'de yetişen bazı *Scutellaria* L. türleri üzerinde farmasötik botanik araştırmalar" isimli yüksek lisans tezimi tamamladım ve aynı yılın Şubat ayında Farmakognozi programında doktora öğrenimime başladım. 2005 yılı Mayıs ayından itibaren, Trabzon ilinde "Gülin Eczanesi" ni işletmekteyim.