EPHEDRA DISTACHYA / DENİZÜZÜMÜ BİTKİSİYLE OLASI BİR ZEHİRLENMENİN MOLEKÜLER YÖNTEMLERLE BELİRLENMESİ

Ece TUNA

T.C.
BURSA ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

EPHEDRA DISTACHYA / DENİZÜZÜMÜ BİTKİSİYLE OLASI BİR ZEHİRLENMENİN MOLEKÜLER YÖNTEMLERLE BELİRLENMESİ

Ece TUNA
0009-0007-4906-8451

Prof.Dr. Özer YILMAZ
(Danışman)

YÜKSEK LİSANS TEZİ
ADLİ BİLİMLER ANABİLİM DALI

BURSA – 2025
Her Hakkı Saklıdır

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

EPHEDRA DISTACHYA / DENİZÜZÜMÜ BİTKİSİYLE OLASI BİR ZEHİRLENMENİN MOLEKÜLER YÖNTEMLERLE BELİRLENMESİ

Ece TUNA

Bursa Uludağ Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Adli Bilimler Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Özer YILMAZ

Ephedra distachya, tıbbi ve toksikolojik açıdan önemli bir bitki olarak uzun süredir araştırılmaktadır. İçerdiği efedrin maddesi, astım tedavisinde kullanılmış ve farmakolojik çalışmalara önemli katkılar sunmuştur. Ancak bu maddenin psikotropik ve toksik etkileri, özellikle psikotik vakalarla ilişkilendirilerek incelenmiştir. Morfolojik özellikleri ve taksonomik sınırları açısından tartışmalı bir konumda bulunan bu tür, moleküler tekniklerle daha detaylı anlaşılmaktadır. *ITS* bölgesi analizleri, türler arası ilişkilerin belirlenmesinde önemli bir rol oynamıştır. Adli bilimlerde, *E. distachya*'nın doğru tanımlanması ve zehirlenme vakalarının çözümü, moleküler analizlerle mümkün hale gelmiştir. Bu çalışma, bitkinin farmakolojik, toksikolojik ve taksonomik özelliklerini inceleyerek, adli süreçlerdeki önemini vurgulamaktadır. Ayrıca, efedrin ve benzeri maddelerin üretimi, taşınması ve satışı uluslararası sözleşmeler ve ulusal yasalarla sıkı bir şekilde kontrol altına alınmıştır. Bu maddelerin yasa dışı uyuşturucu üretiminde kullanılması, ele geçirilme oranlarında artışa neden olmuştur. Bitkinin endüstriyel kullanımı, farmasötik ve kimyasal sektörlerle sınırlı olmayıp, geleneksel tıpta ve bitkisel takviye ürünlerinde de yer almaktadır. Ancak, bu tür ürünlerin sağlık üzerindeki olumsuz etkileri nedeniyle, birçok ülkede yasal düzenlemelere tabi tutulmuştur.

Anahtar Kelimeler: DNA, *E. distachya*, Sekans Analizi, Zehirlenme.
2025, xvi + 54 sayfa

ABSTRACT

MSc Thesis

DETERMINATION of POSSIBLE POISONING with *EPHEDRA DISTACHYA* by MOLECULAR METHODS

Ece TUNA

Bursa Uludağ University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Forensic Sciences

Supervisor: Prof. Dr. Özer YILMAZ

Ephedra distachya has long been studied due to its significant medicinal and toxicological properties. The plant contains ephedrine, a compound that has been utilized in the treatment of asthma and has made substantial contributions to pharmacological research. However, the psychotropic and toxic effects of ephedrine have been investigated, particularly in relation to psychotic episodes. Morphologically and taxonomically, *E. distachya* remains a controversial species, but molecular techniques have provided more detailed insights. Analysis of the *ITS* region has played a crucial role in clarifying interspecies relationships. In forensic science, accurate identification of *E. distachya* and the resolution of poisoning cases have been made possible through molecular analyses. This study emphasizes the pharmacological, toxicological, and taxonomic characteristics of the plant and highlights its significance in forensic investigations. Furthermore, the production, transportation, and sale of ephedrine and similar substances are strictly regulated under international conventions and national laws. The use of these substances in the illicit manufacture of narcotics has led to an increase in seizure rates. The industrial use of the plant extends beyond the pharmaceutical and chemical sectors and includes applications in traditional medicine and herbal supplements. However, due to the adverse health effects of such products, many countries have implemented legal regulations governing their use.

Key words: DNA, *E. distachya*, Poisoning, Sequence Analysis.
2025, xvi + 54 pages

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim süresince maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen, tecrübelerini ve bilgi birikimini her zaman aktaran, bilimsel bakış açımı geliştirmemde ve bu tez çalışmasını başarıyla tamamlamamda rehberlik eden değerli danışmanım Prof. Dr. Özer YILMAZ'a,

Tezimle ilgili tüm çalışmalarımda desteklerini esirgemeyen Sayın Dr. Öğr. Üyesi Elif UZ YILDIRIM, Sayın Doç. Dr. Figen ERSOY, Sayın Prof. Dr. Özgür VATAN ve Sayın Prof. Dr. Gamze YILDIZ hocalarıma,

Yüksek lisans yolculuğumun en değerli parçalarından biri olan, beraber çalıştığım sevgili arkadaşım Meliha KOÇ ÖZTEPE'ye,

Bilgi birikimini aktarmaktan hiçbir zaman çekinmeyen ve her daim destekte bulunan arkadaşım Melih ÖZTEPE'ye,

Yüksek lisans eğitimim süresince yanımda olan, tüm süreçte maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen sevgili aileme,

FHIZ-2024-2066 No'lu Hızlı Destek Projesi (HZP) kapsamında, tez çalışmalarının bir kısmında malzeme desteği sağlayan Bursa Uludağ Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) Koordinasyon Birimi'ne teşekkürlerimi sunarım.

Ece TUNA
30/06/2025

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET viii
ABSTRACT ix
TEŞEKKÜR x
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ xiii
ŞEKİLLER DİZİNİ xv
ÇİZELGELER DİZİNİ xvi
1. GİRİŞ 1
2. KURAMSAL TEMELLER ve KAYNAK ARAŞTIRMASI 3
2.1. Adli Bilimlere Giriş 3
2.1.1. Adli Bilimlerin Temel Kavramları 3
2.1.2. Adli Bilimlerin Tarihsel Gelişimi 4
2.1.3. Adli Bilimlerde Moleküler Yöntemlerin Önemi 5
2.2. Zehirli Bitkiler 7
2.2.1. Zehirli Bitkilerin Sınıflandırılması 7
2.2.2. Zehirli Bitkilerde Etkili Bileşikler 8
2.2.3. Zehirli Bitkilerin Tanımlanmasında Kullanılan Yöntemler 9
2.3. Zehirli Bitkilerle Zehirlenme Vakaları 11
2.3.1. Zehirlenme Belirtileri ve Klinik Bulgular 11
2.3.2. Adli Olaylarda Zehirli Bitki Vakalarının Önemi 12
2.3.3. Zehirlenmelerde Toksikolojik Analizler 14
2.4. *Ephedra distachya* 15
2.4.1. *E. distachya* Morfolojik Özellikleri 15
2.4.2. *E. distachya* Filogenetik Özellikleri 17
2.4.3. *E. distachya* Moleküler Özellikleri 17
2.5. *Ephedra distachya*'nın Kullanım Alanları 19
2.5.1. Geleneksel ve Tıbbi Kullanım 19
2.5.2. Endüstriyel ve Yasal Kullanımlar 21
2.5.3. İllegal Kullanımı 22
2.5.4. *E.distachya*'nın Türkiye'deki Dağılım Haritası ve Ekolojik Özellikler 24
2.6. *E. distachya* Zehirlenmeleri 25
2.6.1. Zehirlenme Mekanizması 25
2.6.2. Zehirlenme Vakaları 26
2.6.3. Zehirlenmelerde Adli Değerlendirme 28
2.7. Tür Tayini ve Yöntemleri 29
2.7.1. Bitkilerde *ITS* Bölgesi ve Önemi 29
2.7.2. Moleküler Analizler ve BLAST 30
2.7.3. DNA İzolasyonu ve PCR Uygulamaları 32
2.7.4. Bitki Türlerinin Moleküler Tanısında Güncel Yaklaşımlar 33
3. MATERYAL ve YÖNTEM 35
3.1. Materyal 35
3.1.1. Bitki Örnekleri 35
3.1.2. Sarf Malzemeler 35
3.1.3. Kimyasal Malzemeler 36
3.1.4. Cihazlar 37

3.2. Yöntem 38
3.2.1. *Ephedra distachya* örneklerinin hazırlanması 38
3.2.2. *Ephedra distachya* örneklerinden çay yapımı 38
3.2.3. *Ephedra distachya* örneklerinin sindirim sıvılarıyla muamelesi 39
3.2.4. DNA İzolasyonu 40
3.2.5. NanoDrop Cihazı Aracılığıyla DNA Saflık Tayini 43
3.2.6. Agaroz Jel Elektroforezi ile Bitki Kaynaklı DNA Örneklerinin Kalitatif Değerlendirilmesi 44
3.2.7. PCR ile *ITS* Bölgelerinin çoğaltılması 44
3.2.7.1. Mix Hazırlama 45
3.2.7.2. 50 ng Template DNA Hazırlama 46
3.2.7.3. Striplere Yükleme 47
4. BULGULAR 48
4.1. NanoDrop Analizi Sonuçları 48
4.2. Agaroz Jel Elektroforezi 48
4.3. PCR Ürünlerinin Elektroforezi 49
5. SONUÇ 50
KAYNAKLAR 52
ÖZGEÇMİŞ 54

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler	Açıklama
%	Yüzde
°C	Santigrat derece
µl	Mikrolitre
µM	Mikromolar
A	Absorbans
cm	Santimetre
dH_2O	Distile (Saf) Su
dk	Dakika
g	Gram
HCl	Hidroklorik Asit
kb	Kilobaz
LD50	%50 Lethal (Öldürücü) Doz
M	Molarite
m	Metre
mg	Miligram
ml	Mililitre
NaCl	Sodyum Klorür
NFW	Nuclease-Free Water (Nükleazlardan Arındırılmış Su)
Ng	Nanogram
NK	Negatif Kontrol
pH	Potential of Hydrogen (Hidrojenin Gücü)
sa	Saat
UV	Ultraviyole
V	Volt
v/v	Hacim/Hacim
w	Weight (Kütle)

Kısaltmalar	Açıklama
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool (Temel Bölgesel Hizalama Arama Aracı)
CTAB	Setil Trimetil Amonyum Bromür
DNA	Deoksiribo Nükleik Asit
EDTA	Etilen Diamin Tetraasetik Asit
EKG	Elektrokardiyografi
EtBr	Ethidium Bromide (Etidyum Bromür)
ETS	External Transcribed Spacer
GC-MS	Gas Chromatography–Mass Spectrometry (Gaz Kromatografisi- Kütle Spektrometrisi)
HPLC	High-Performance Liquid Chromatography (Yüksek Performanslı Sıvı Kromotografisi)
ITS	Internal Transcribed Spacers

LC-MS/MS	Liquid Chromatography–Mass Spectrometry (Sıvı Kromatografisi-Tandem Kütle Spektrometrisi)
NCBI	National Center for Biotechnology Information (Ulusal Biyoteknoloji Bilgi Merkezi)
PCR	Polymerase Chain Reaction (Polimeraz Zincir Reaksiyonu)
PMC	Publication Medicine Central (Tıp Yayınları Merkezi)
PVP	Poly Vinyl Polypyrrolidone
rDNA	Ribozomal DNA
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism (Sınırlayıcı Enzim Parça Uzunluğu Polimorfizmi)
RNA	Ribonükleik Asit
RPM	Revolutions per Minute (Dakika Başına Devir)
TE	Tris-EDTA
VNTR	Variable Numbers of Tandem Repeats (Değişken Sayıda Tandem Tekrarlar)

ŞEKİLLER DİZİNİ

		Sayfa
Şekil 3.2.1.1.	*Ephedra distachya* örneklerinin steril hale getirilmesi	38
Şekil 3.2.2.1.	250 mL 100°C'de 5 mg kuru örnekle hazırlanan çay örneği	39
Şekil 3.2.3.1.	Bitki örneklerinin inkübasyon süreci	40
Şekil 3.2.4.1.	Bitki parçalarının havanda görüntüsü	40
Şekil 3.2.4.2.	Santrifüj sonucunda oluşan 3 faz	41
Şekil 3.2.4.3.	Santrifüj cihazına yerleştirilen Falcon tüplerinin görüntüsü	42
Şekil 3.2.7.2.3.1.	PCR strip şeması	47
Şekil 4.3.1.	PCR ürünlerinin jel görüntüsü	49

ÇİZELGELER DİZİNİ

		Sayfa
Çizelge 3.1.2.1.	Kullanılan sarf malzemeler listesi	35
Çizelge 3.1.3.1.	Kullanılan kimyasal malzemeler listesi	36
Çizelge 3.1.4.1.	Kullanılan cihazlar listesi	37
Çizelge 3.2.3.1.	*E. distachya* çay örneğinin su ve tükürük eklenerek hazırlandığı kontrol ve deney tüpleri	39
Çizelge 3.2.7.1.	ITS bölgesine ait primerlerin baz dizisi	45
Çizelge 3.2.7.2.	PCR bileşenleri ve döngü koşulları	45
Çizelge 3.2.7.2.1.1.	PCR reaksiyon karışımında kullanılan bileşenler ve hacimleri	46
Çizelge 3.2.7.2.2.1.	Stok DNA'ların PCR için uygun konsantrasyonlara indirgenmesi	46
Çizelge 4.1.1.	NanoDrop cihazı ile ölçülen DNA saflık ve konsantrasyon değerleri	48

1. GİRİŞ

Adli bilimler, zehirli bitkilerin tanımlanması ve etkili bileşenlerinin saptanması açısından önemli bir disiplinler arası alan olarak öne çıkmaktadır. Zehirli bitkiler, tarih boyunca hem tıbbi hem de toksikolojik açıdan ilgi odağı olmuş, özellikle adli olaylarda zehirlenme vakalarının aydınlatılmasında kritik rol oynamıştır. Bu bitkilerin sınıflandırılması, morfolojik ve anatomik özelliklerinin yanı sıra, içerdiği biyokimyasal bileşenlerin de detaylı olarak incelenmesini gerektirir. Modern adli bilimlerde, bitki türlerinin doğru şekilde teşhis edilmesi, olay yeri incelemelerinde ve toksikolojik analizlerde güvenilir sonuçlar elde edilmesi açısından büyük önem taşır (MUTLU vd., 2020). *Ephedra distachya*, Türkiye florasında yaygın olarak bulunan ve tıbbi, toksikolojik açıdan dikkat çeken bir bitkidir. Bu türün morfolojik ve anatomik özellikleri, benzer türlerle karşılaştırıldığında ayırt edici nitelikler taşır. Özellikle *E. major* ve *E. distachya* gibi türler aynı lokalitelerde bulunabilmekte, ancak morfolojik olarak birbirinden ayrılması güç olabilmektedir. Bu nedenle, türlerin tanımlanmasında morfolojik ve anatomik karakterlerin dikkatli bir şekilde analiz edilmesi gerekmektedir(Tanker & Altun, 1997) . Ayrıca, Ephedra cinsinin Türkiye'de *E. major, E. campylopoda* ve *E. distachya* olmak üzere üç türle temsil edildiği, bu türlerin alkaloit içeriklerinin tür, cinsiyet, lokalite ve mevsime bağlı olarak değişiklik gösterdiği tespit edilmiştir. Yapılan çalışmalarda, dişi bireylerde alkaloit miktarının yıl içinde değişkenlik gösterdiği, özellikle eylül ayında en yüksek seviyeye ulaştığı belirtilmiştir. *Ephedra distachya*'nın farmakolojik etkileri de oldukça dikkat çekicidir (Tanker vd., 2008). Geleneksel tıpta ve modern farmakolojide, bu bitkinin antiviral etkileri olduğu gösterilmiştir. Özellikle ısıya bağlı toksik sendromların ve Qi-Fen sendromunun tedavisinde etkin bir şekilde kullanıldığı, modern çalışmalarla da desteklenmiştir (Tang vd., 2023). Bununla birlikte, Ephedra içeren ürünlerin toksisite oranlarının, diğer bitkisel ürünlere kıyasla daha yüksek olduğu, zehirlenme riskinin arttığı saptanmıştır (Woolf vd., 2005). Bu durum, adli bilimlerde *Ephedra distachya* ve benzeri bitkilerin toksikolojik analizlerinin önemini artırmaktadır. Moleküler yöntemler, bitki türlerinin doğru şekilde tanımlanmasında ve filogenetik ilişkilerinin ortaya konmasında vazgeçilmez araçlar haline gelmiştir. Özellikle PCR tabanlı teknikler ve *ITS* nükleotid dizilemesi gibi moleküler filogenetik analizler,

morfolojik olarak ayırt edilmesi zor olan türlerin kesin olarak teşhis edilmesini sağlamaktadır (Hamedani et al., 2020). Yapılan filogenetik analizlerde, Ephedra türlerinin genetik çeşitliliği ve akrabalık ilişkileri detaylı şekilde ortaya konmuştur (Kakiuchi vd., 2011). Adli olaylarda zehirli bitki vakalarının tespiti ve değerlendirilmesi, yalnızca bitkinin morfolojik ve kimyasal özelliklerinin değil, aynı zamanda moleküler düzeydeki verilerin de analiz edilmesini gerektirir. Özellikle ağız ve mide özsuyu ile muamele olmuş bitki parçalarından DNA izolasyonu ve tür tespiti, adli toksikolojide güvenilir sonuçlar elde edilmesine olanak tanır (MUTLU vd., 2020) Bu bağlamda, zehirli bitkilerin adli bilimlerdeki önemi, hem olay yeri incelemelerinde hem de toksikolojik analizlerde giderek artmaktadır. *Ephedra distachya*'nın Türkiye'deki yayılışı, morfolojik ve moleküler ayırt edici özellikleri, içerdiği alkaloitlerin toksik etkileri ve adli bilimlerdeki yeri, bu bitkinin hem bilimsel hem de adli açıdan kapsamlı bir şekilde incelenmesini gerektirmektedir (Tanker vd., 2008; Tanker & Altun, 1997; Woolf vd., 2005).

2. KURAMSAL TEMELLER ve KAYNAK ARAŞTIRMASI

2.1.Adli Bilimlere Giriş

2.1.1. Adli Bilimlerin Temel Kavramları

Adli bilimler, suçun aydınlatılması, delillerin değerlendirilmesi ve adaletin sağlanmasında bilimsel yöntemlerin uygulanmasını esas alır. Bu disiplin, biyoloji, kimya, tıp, genetik ve hukuk gibi farklı alanların kesişiminde yer alır ve olay yeri incelemesinden laboratuvar analizlerine kadar geniş bir uygulama yelpazesine sahiptir. Adli bilimlerin temel kavramları arasında delil, delil zinciri, analiz yöntemleri, raporlama ve uzman görüşü gibi unsurlar bulunur. Delil kavramı, bir olayın aydınlatılmasında kullanılan her türlü materyali kapsar ve bu materyallerin toplanması, korunması ve analiz edilmesi sürecinde bilimsel standartlara uyulması gereklidir (MUTLU vd., 2020). Adli bilimlerde delil zinciri, delilin toplandığı andan itibaren laboratuvar analizine ve mahkemede sunulmasına kadar geçen tüm aşamaların kayıt altına alınmasını ifade eder. Bu zincirin bozulmaması, delilin güvenilirliğini ve geçerliliğini doğrudan etkiler. Özellikle toksikoloji ve biyolojik örnek analizlerinde, örneklerin uygun koşullarda saklanması ve taşınması büyük önem taşır. Fatma Tortum'un çalışmasında, adli olaylarda toksikasyon vakalarında temel ve ileri kardiyak yaşam desteğinin sağlanmasının öncelikli olduğu, hastalarda dolaşım, hava yolu ve solunumun kontrol edilmesi gerektiği vurgulanmaktadır. Bu yaklaşım, adli bilimlerin sadece laboratuvar analizleriyle sınırlı olmadığını, aynı zamanda olay yeri ve klinik müdahaleleri de kapsadığını gösterir. Adli bilimlerde kullanılan analiz yöntemleri, teknolojik gelişmelerle birlikte sürekli olarak yenilenmektedir. Özellikle gaz kromatografisi/kütle spektrometrisi (GC/MS) gibi ileri düzey teknikler, karmaşık örneklerin analizinde yüksek hassasiyet ve özgüllük sağlar. Ancak bu tekniklerin uygulanması, detaylı cihaz bilgisi ve uzmanlık gerektirir; ayrıca analizlerin tamamlanması saatler sürebilir. Standart immünolojik testler ise daha hızlı sonuç vermekle birlikte, bazı ajanların tespitinde yetersiz kalabilir. Bu nedenle, adli bilimlerde hem hızlı tarama testleri hem de doğrulayıcı ileri analiz yöntemleri birlikte kullanılmaktadır (Tortum, 2019). Adli bilimlerin temel kavramlarından biri de raporlama ve bilirkişi görüşüdür. Adli tıp kurumları ve uzmanlar, elde edilen bulguları bilimsel bir çerçevede değerlendirerek raporlar hazırlar. Bu raporlar, mahkemelerde delil olarak

sunulur ve karar süreçlerinde belirleyici rol oynar. Türkiye'de adli tıp kurumları, özellikle uyuşturucu madde analizleri ve toksikoloji alanında en fazla rapor üreten birimler arasında yer almaktadır. Emre Mutlu ve arkadaşlarının belirttiği gibi, adli bilimlerde raporlamanın standartlara uygun ve bilimsel temellere dayalı olması, adaletin sağlanmasında kritik öneme sahiptir. Adli bilimlerin tarihsel gelişimi incelendiğinde, ilk dönemlerde daha çok gözlemsel ve makroskobik yöntemlerin kullanıldığı, zamanla mikroskobik ve moleküler tekniklerin ön plana çıktığı görülmektedir. Günümüzde DNA analizi, toksikolojik testler ve kimyasal analizler, adli bilimlerin vazgeçilmez araçları haline gelmiştir. Bu gelişmeler, suçun aydınlatılması ve adli olayların çözümünde bilimsel kanıtların gücünü artırmıştır. Ayrıca, adli bilimlerde multidisipliner yaklaşımın benimsenmesi, farklı uzmanlık alanlarının bir arada çalışmasını ve daha güvenilir sonuçlar elde edilmesini sağlamaktadır. Sonuç olarak, adli bilimlerin temel kavramları arasında delil yönetimi, analiz yöntemleri, raporlama ve multidisipliner işbirliği öne çıkmaktadır. Bu kavramlar, adli olayların bilimsel olarak aydınlatılmasında ve adaletin sağlanmasında merkezi bir rol üstlenir.

2.1.2. Adli Bilimlerin Tarihsel Gelişimi

Adli bilimlerin tarihsel gelişimi, insanlık tarihinin eski dönemlerine kadar uzanır ve toplumsal düzenin sağlanmasında suçun tespiti ile adaletin yerine getirilmesi ihtiyacından doğmuştur. İlk çağlarda suçun ve suçlunun belirlenmesinde genellikle tanık ifadeleri, itiraflar ve fiziksel cezalar gibi yöntemler kullanılmıştır. Ancak zamanla, suçun bilimsel yöntemlerle aydınlatılması gerekliliği ortaya çıkmış ve adli bilimler disiplinler arası bir alan olarak gelişmeye başlamıştır (Cakmak vd., 2020). Modern adli bilimlerin temelleri, özellikle 19. yüzyılda bilimsel gelişmelerin hız kazanmasıyla atılmıştır. Kimya, biyoloji ve tıp gibi temel bilimlerin adli olayların çözümünde kullanılmaya başlanması, adli bilimlerin sistematik bir disiplin haline gelmesini sağlamıştır. Bu dönemde, toksikoloji ve adli tıp gibi alt dallar ortaya çıkmış, zehirlenme vakalarının tespitinde bilimsel analizler ön plana çıkmıştır. Özellikle zehirli bitkilerle ilgili vakalarda, bitkisel toksinlerin tespiti için laboratuvar tekniklerinin geliştirilmesi adli bilimlerin ilerlemesinde önemli rol oynamıştır. 20. yüzyılın başlarından itibaren, adli bilimlerde moleküler biyoloji ve genetik gibi yeni teknolojilerin kullanılmasıyla birlikte, suçun aydınlatılmasında

doğruluk ve güvenilirlik artmıştır. DNA analizi, polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ve gaz kromatografisi/kütle spektrometrisi (GC/MS) gibi teknikler, adli olaylarda delil niteliği taşıyan biyolojik materyallerin analizinde devrim yaratmıştır (Cakmak vd., 2020) . Bu tekniklerin uygulanması, özellikle zehirli bitkilerden elde edilen örneklerin kimyasal ve genetik olarak tanımlanmasını mümkün kılmıştır. Türkiye'de adli bilimlerin gelişimi, yasal düzenlemeler ve kurumsal yapılanmalarla desteklenmiştir. Özellikle Adli Tıp Kurumu gibi uzmanlaşmış kurumlar, adli olayların bilimsel olarak incelenmesinde ve bilirkişi raporlarının hazırlanmasında merkezi bir rol üstlenmiştir (MUTLU vd., 2020). Son yıllarda, adli bilimlerde multidisipliner yaklaşımlar benimsenmiş ve moleküler yöntemlerin önemi giderek artmıştır. Bitki toksinlerinin tespiti ve sınıflandırılması, adli vakalarda zehirlenme mekanizmalarının anlaşılması açısından kritik bir öneme sahiptir. Adli bilimlerin tarihsel gelişiminde, teknolojik ilerlemeler ve bilimsel yöntemlerin entegrasyonu, suçun aydınlatılmasında ve adaletin sağlanmasında önemli bir dönüşüm yaratmıştır. Bu süreçte, özellikle zehirli bitkiler ve bunların etkili bileşenlerinin tespiti için geliştirilen analitik ve moleküler teknikler, adli bilimlerin uygulama alanını genişletmiştir (Coskun, 2013).

2.1.3. Adli Bilimlerde Moleküler Yöntemlerin Önemi

Adli bilimlerde moleküler yöntemlerin önemi, özellikle zehirli bitkilerin tanımlanması, tür ayrımı ve adli olaylarda delil olarak değerlendirilmesi açısından giderek artmaktadır. Moleküler teknikler, klasik morfolojik ve anatomik incelemelerin ötesine geçerek, bitki materyalinin genetik düzeyde analiz edilmesini sağlar. Bu yöntemler, özellikle bitki örneklerinin morfolojik olarak ayırt edilemediği veya tahrip olduğu durumlarda, adli süreçlerde güvenilir ve objektif sonuçlar sunar. Bitki materyalinden DNA izolasyonu, adli bilimlerde moleküler analizlerin ilk ve en kritik adımlarından biridir. Özellikle ağız ve mide özsuyu ile muamele olmuş bitki parçalarından dahi başarılı bir şekilde DNA izolasyonu yapılabilmesi, adli vakalarda delil niteliği taşıyan materyallerin analizini mümkün kılar. Bu sayede, sindirim sisteminden geçmiş bitki parçalarından tür tespiti yapılabilmekte ve olay yeri incelemelerinde önemli bilgiler elde edilmektedir. Bitkilerden izole edilen DNA'nın saflık analizi ve uygun moleküler markerlar ile çoğaltılması, türlerin kesin olarak tanımlanmasına olanak tanır. Moleküler filogenetik analizler, türler

arası ilişkilerin ve evrimsel kökenlerin aydınlatılmasında da önemli rol oynar. PCR ile çoğaltılan gen bölgelerinin dizi analizleri, türlerin genetik benzerlik ve farklılıklarını ortaya koyar. Bu tür analizlerde, *ITS* gibi nükleotid dizileri sıklıkla kullanılır ve elde edilen veriler, filogenetik ağaçların oluşturulmasında temel teşkil eder (Hamedani vd., 2020).Bu yaklaşım, özellikle morfolojik olarak birbirinden ayırt edilmesi güç olan türlerin tanımlanmasında büyük avantaj sağlar. Türkiye'de Ephedra türlerinin teşhisinde de moleküler yöntemlerin önemi vurgulanmaktadır. Morfolojik olarak birbirine çok benzeyen *E. major* ve *E. distachya* gibi türlerin ayrımında, moleküler markerlar ve DNA dizi analizleri kesin sonuçlar sunar (Tanker & Altun, 1997). Yapılan bir çalışmada, Ephedra türlerinin taşıdığı alkaloit miktarlarının türlere, cinsiyete, lokaliteye ve mevsime bağlı olarak değişiklik gösterdiği belirlenmiş, bu değişkenliğin moleküler düzeyde de izlenebileceği ortaya konmuştur (Tanker vd., 2008). Ayrıca, adli bilimlerde moleküler yöntemlerin kullanımı, sadece bitki türlerinin tespitiyle sınırlı kalmaz. Zehirlenme vakalarında, toksik bitki bileşenlerinin ve bunlara ait genetik materyalin tespiti, olayın aydınlatılmasında kritik rol oynar. Özellikle Ephedra gibi toksik bitkilerin adli olaylarda tespit edilmesi, zehirlenme mekanizmalarının anlaşılması ve olayın adli boyutunun değerlendirilmesi açısından önemlidir. Adli Tıp Kurumu'na gelen vakalarda, bitki kaynaklı zehirlenmelerin tespitinde moleküler analizlerin kullanılması, raporların doğruluğunu ve güvenilirliğini artırmaktadır (MUTLU vd., 2020). Moleküler yöntemlerin sağladığı bir diğer avantaj, bitki materyalinin işlenmemiş veya işlenmiş olmasına bakılmaksızın analiz edilebilmesidir. Bitkiler hiçbir işleme maruz kalmadan önce DNA izole edilerek saflık analizi yapılabilmekte, bu da adli süreçlerde delil bütünlüğünün korunmasına katkı sağlamaktadır. Ayrıca, elde edilen moleküler veriler, Sequence Navigator ve MEGA gibi yazılımlar kullanılarak analiz edilmekte ve filogenetik ilişkiler detaylı şekilde ortaya konmaktadır. Sonuç olarak, adli bilimlerde moleküler yöntemlerin kullanımı, zehirli bitkilerin tanımlanması, tür ayrımı, zehirlenme vakalarının aydınlatılması ve adli raporların güvenilirliğinin artırılması açısından vazgeçilmez bir araç haline gelmiştir. Bu yöntemler, klasik yaklaşımların ötesine geçerek, adli bilimlerin bilimsel temellerini güçlendirmekte ve olayların çözümünde yüksek doğruluk sağlamaktadır (Cakmak vd., 2020).

2.2.Zehirli Bitkiler

2.2.1. Zehirli Bitkilerin Sınıflandırılması

Zehirli bitkilerin sınıflandırılması, adli bilimler ve toksikoloji açısından büyük önem taşır. Bitkilerin toksik etkileri, içerdiği kimyasal bileşenlere, morfolojik özelliklerine ve taksonomik gruplarına göre farklılık gösterir. Bu nedenle, zehirli bitkilerin sistematik olarak sınıflandırılması, hem bilimsel araştırmalar hem de adli vakaların çözümünde temel bir adımdır. Zehirli bitkiler, genellikle içerdiği toksik bileşiklerin türüne, etki mekanizmasına ve bitkinin ait olduğu familya ya da cinsine göre gruplandırılır (Tortum, 2019). Bitkilerde toksisiteye yol açan başlıca bileşikler arasında alkaloitler, glikozitler, fenolik bileşikler, saponinler ve bazı inorganik maddeler yer alır. Özellikle alkaloitler, birçok zehirli bitkinin temel toksik ajanı olarak öne çıkar. Ephedra türlerinde bulunan efedrin ve benzeri alkaloitler, hem farmakolojik hem de toksikolojik açıdan dikkat çeker (Coskun, 2013). Zehirli bitkilerin sınıflandırılmasında morfolojik ve anatomik özellikler de önemli rol oynar. Bitkilerin yaprak, gövde, çiçek ve tohum gibi organlarının şekli, büyüklüğü ve iç yapısı, türlerin ayırt edilmesinde kullanılır. Örneğin, *Ephedra distachya* ve *E. campylopoda* gibi türler arasında morfolojik ve anatomik farklılıklar, bu türlerin birbirinden ayrılmasını sağlar. *E. major* ve *E. distachya* gibi bazı türler ise aynı lokalitede birlikte bulunabilmekte ve morfolojik olarak birbirinden ayrılması zor olabilmektedir (Tanker & Altun, 1997). Bu nedenle, morfolojik sınıflandırma yanında moleküler yöntemler de giderek daha fazla kullanılmaktadır. Moleküler sınıflandırma, bitkilerin DNA dizilerinin analizine dayanır ve özellikle morfolojik olarak benzer türlerin ayırt edilmesinde yüksek doğruluk sağlar. Ephedra örneğinde olduğu gibi, bitki gövdesinden izole edilen DNA ile yapılan filogenetik analizler, türler arasındaki genetik farklılıkları ortaya koyar. PCR ve *ITS* nükleotid baz sırası gibi moleküler teknikler, bitkilerin filogenetik ilişkilerinin belirlenmesinde ve zehirli türlerin tespitinde etkin şekilde kullanılmaktadır. Ayrıca, ağız ve mide özsuyu ile muamele olmuş bitki parçalarından da başarılı şekilde DNA izolasyonu yapılabilmekte ve bu sayede adli vakalarda bitki türlerinin tespiti mümkün olmaktadır (Hamedani vd., 2020). Zehirli bitkilerin sınıflandırılması, sadece taksonomik açıdan değil, aynı zamanda toksik etkilerinin anlaşılması ve adli olaylarda doğru tanımlanabilmesi açısından da gereklidir. Özellikle

acil servislerde karşılaşılan zehirlenme vakalarında, hangi bitkinin toksik etki yaptığı ve hangi bileşenlerin sorumlu olduğu bilgisi, tedavi ve adli süreçlerin yönetilmesinde kritik rol oynar. Zehirli bitkilerde bulunan alkaloitler, glikozitler ve diğer toksik ajanlar, klinik tabloların ve tedavi yaklaşımlarının belirlenmesinde temel parametrelerdir. Türkiye florasında yer alan Ephedra türleri gibi bazı bitkiler, hem morfolojik hem de kimyasal çeşitlilik gösterir ve bu çeşitlilik, sınıflandırma çalışmalarında dikkate alınmalıdır. Ephedra türlerinin taşıdığı alkaloit miktarlarının türlere, cinsiyete, lokaliteye ve mevsime bağlı olarak değiştiği gözlemlenmiştir. Bu bulgular, zehirli bitkilerin sınıflandırılmasında çevresel ve genetik faktörlerin de göz önünde bulundurulması gerektiğini ortaya koyar. Zehirli bitkilerin sınıflandırılması, adli bilimlerde olay yeri incelemesi, toksikolojik analizler ve adli raporlamada doğru ve güvenilir sonuçlar elde edilmesi için vazgeçilmezdir. Ülkemizde zehirli bitkiler ve bunların öncül maddeleriyle ilgili yapılan araştırmaların artırılması, adli bilimlerin gelişimi açısından önem taşımaktadır. Ayrıca, adli tıp kurumlarında düzenlenen bilirkişi raporlarında zehirli bitki vakalarının doğru sınıflandırılması, hukuki süreçlerin sağlıklı ilerlemesine de katkı sağlar.

2.2.2. Zehirli Bitkilerde Etkili Bileşikler

Zehirli bitkilerde etkili bileşikler, bitkinin türüne, yetiştiği çevreye ve gelişim evresine bağlı olarak çeşitlilik gösterir. Bu bileşikler genellikle bitkinin savunma mekanizmasının bir parçası olarak ortaya çıkar ve hayvanlar veya insanlar tarafından tüketildiğinde toksik etki oluşturabilir. Ephedra türleri gibi bazı bitkilerde, alkaloitler başlıca toksik ve farmakolojik olarak etkili bileşikler arasında yer alır. Ephedra cinsinde özellikle efedrin ve psödoefedrin gibi alkaloitler yüksek oranda bulunur ve bu maddeler hem merkezi sinir sistemi üzerinde uyarıcı etki gösterir hem de kardiyovasküler sistem üzerinde ciddi yan etkilere yol açabilir. Efedrin ve psödoefedrin, bitkinin farklı türlerinde ve hatta aynı türün farklı lokalitelerinde değişen oranlarda bulunur. Örneğin, *Ephedra sinica*'da toplam alkaloit içeriği 9.7 mg/g ile 41.6 mg/g arasında değişirken, efedrin ve psödoefedrin oranları da türler arasında farklılık gösterir. Yapılan analizlerde, *Ephedra intermedia* 'da efedrin içeriği 4.6-18.1 mg/g arasında, psödoefedrin ise 11.2-16.7 mg/g arasında tespit edilmiştir. Bu alkaloitlerin toksik etkileri, doz ve maruziyet süresine bağlı olarak değişir. Efedrin ve türevleri, sempatomimetik etki göstererek taşikardi, hipertansiyon, ajitasyon

ve ciddi vakalarda kardiyak aritmilere neden olabilir (Scientific Assessment of Ephedra Species (Ephedra spp.), 2010). Ayrıca, bu bileşiklerin farmakolojik etkileri nedeniyle tıbbi ve yasa dışı kullanımları da söz konusudur. Türkiye'de Ephedra türlerinin taşıdığı alkaloit miktarlarının türlere, cinsiyete, lokaliteye ve mevsime bağlı olarak değişiklik gösterdiği tespit edilmiştir. Bu değişkenlik, adli toksikoloji açısından bitkinin tanımlanmasında ve toksik potansiyelinin değerlendirilmesinde önemlidir (Tanker vd., 2008). Zehirli bitkilerde etkili olan diğer bileşikler arasında glikozitler, fenolik bileşikler, terpenoidler ve bazı proteinler de yer alır. Ancak *Ephedra distachya* gibi türlerde alkaloitler, toksik etki açısından başat rol oynar. *E.campylopoda* ve *E.distachya*'nın morfolojik ve anatomik özellikleri incelendiğinde, bu türlerin ayırt edilmesinde etkili bileşiklerin miktar ve dağılımı da önemli bir parametre olarak öne çıkar. Ayrıca, bitkilerin morfolojik teşhisi ile birlikte kimyasal içeriklerinin de analiz edilmesi, adli bilimlerde doğru tanımlama ve toksikolojik değerlendirme için gereklidir (Tanker & Altun, 1997). Zehirli bitkilerdeki etkili bileşiklerin tespiti ve miktarlarının belirlenmesi, adli olaylarda zehirlenme vakalarının aydınlatılmasında kritik öneme sahiptir. Özellikle toksikasyon vakalarında, hastaya uygulanacak acil girişimlerde etkili bileşiğin türü ve miktarı tedavi protokolünü belirler. Zehirli bitkilerdeki etkili bileşiklerin hem kimyasal hem de biyolojik etkilerinin detaylı olarak incelenmesi, adli bilimler ve toksikoloji alanında bilimsel ve pratik açıdan büyük önem taşır.

2.2.3. Zehirli Bitkilerin Tanımlanmasında Kullanılan Yöntemler

Zehirli bitkilerin tanımlanmasında kullanılan yöntemler, adli bilimler ve toksikoloji açısından büyük önem taşır. Bu bitkilerin doğru şekilde teşhis edilmesi, hem zehirlenme vakalarının aydınlatılması hem de adli olaylarda delil olarak kullanılabilmesi için gereklidir. Tanımlama süreçlerinde morfolojik, anatomik, kimyasal ve moleküler yöntemler bir arada veya ayrı ayrı kullanılabilir. Morfo-anatomik yöntemler, bitkilerin dış görünüşleri ve iç yapılarının incelenmesine dayanır. Örneğin, *Ephedra distachya* gibi türlerde, braktelerin sayısı, şekli ve çiçeklerin dizilişi gibi morfolojik özellikler türlerin ayırt edilmesinde önemli rol oynar. *E.distachya*'da karakteristik olarak üçlü kısmi durum ve çok sayıda çiçek ile saplı ve derin bir çanak biçiminde 8-10 brakte çifti bulunması, bu türün tanımlanmasında ayırt edici bir özellik olarak öne çıkar. Ayrıca, *E.campylopoda* ve

E.distachya gibi türlerin morfolojik ve anatomik özellikleri karşılaştırılarak, türler arasındaki benzerlik ve farklılıklar belirlenmiş ve tanımada yardımcı olan karakterler saptanmıştır. *E.major* ve *E.distachya* gibi türler ise aynı lokalitede beraber bulunabilmekte, ancak morfolojik olarak birbirinden ayrılması zor olabilmektedir (Tanker & Altun, 1997).Bu nedenle, morfolojik incelemeler genellikle mikroskobik anatomik analizlerle desteklenir. Kimyasal analizler, bitkilerin içerdiği toksik bileşenlerin tespitine yöneliktir. Özellikle alkaloitler gibi zehirli bileşiklerin miktar ve dağılımı, bitkinin türüne, cinsiyetine, bulunduğu konuma ve mevsime göre değişiklik gösterebilir. Bu tür kimyasal analizler, zehirli bitkilerin tanımlanmasında ve toksik etkilerinin değerlendirilmesinde önemli bir araçtır. Moleküler yöntemler ise, son yıllarda bitki tanımlamasında gün geçtikçe daha fazla kullanılmaktadır. DNA izolasyonu ve saflaştırılması, bitki türlerinin genetik düzeyde tanımlanmasını mümkün kılar. Özellikle ağız ve mide özsuyu ile muamele olmuş bitki parçalarından başarılı bir şekilde DNA izolasyonu yapılabilmekte ve bu DNA üzerinden tür tespiti gerçekleştirilebilmektedir. Moleküler filogenetik analizlerde, PCR ile çoğaltılan DNA bölgeleri kullanılarak *ITS* nükleotid baz sırası belirlenmekte ve bu veriler, türlerin filogenetik ilişkilerinin ortaya konmasında kullanılmaktadır. Bu yöntemler, morfolojik olarak birbirine çok benzeyen veya klasik yöntemlerle ayrılması güç olan türlerin kesin olarak tanımlanmasını sağlar. Bitki materyalinin toplanması ve DNA izolasyonu sırasında, örneklerin işlenmemiş olması ve saflık analizlerinin yapılması gereklidir. Bu tür uygulamalar, adli bilimlerde bitki kökenli delillerin güvenilirliğini artırır. Zehirli bitkilerin tanımlanmasında kullanılan yöntemlerin seçimi, olayın niteliğine ve eldeki materyalin durumuna göre değişebilir. Morfolojik ve anatomik incelemeler, hızlı ve pratik sonuçlar sunarken, kimyasal ve moleküler analizler daha kesin ve güvenilir tanımlama sağlar. Özellikle adli olaylarda, zehirli bitki vakalarının aydınlatılmasında bu yöntemlerin birlikte kullanılması, hem bilimsel doğruluk hem de hukuki geçerlilik açısından büyük avantaj sağlar (MUTLU vd., 2020). Ephedra gibi tıbbi ve toksikolojik önemi yüksek olan bitkilerde bu çok yönlü yaklaşım, hem türlerin doğru teşhisini hem de zehirlenme mekanizmalarının anlaşılmasını mümkün kılar.

2.3.Zehirli Bitkilerle Zehirlenme Vakaları

2.3.1. Zehirlenme Belirtileri ve Klinik Bulgular

Zehirli bitkilerle zehirlenme vakalarında ortaya çıkan klinik bulgular ve zehirlenme belirtileri, bitkinin içerdiği toksik bileşenlerin türüne, miktarına, maruz kalma yoluna ve bireysel duyarlılığa bağlı olarak değişkenlik gösterir. *Ephedra distachya* gibi alkaloit içeren bitkilerde, zehirlenme semptomları genellikle kardiyovasküler ve sinir sistemi üzerinde belirgin etkiler oluşturur. Özellikle fenilpropanolamin ve fenilefrin gibi alfa-adrenerjik ajanların neden olduğu hipertansiyon, baroreseptör refleksiyle bradikardi veya atriyoventriküler (AV) blok gibi kardiyak yanıtlarla kendini gösterebilir (Tortum, 2019). Bu tür bitkilerle zehirlenme vakalarında, hastalarda baş dönmesi, çarpıntı, göğüs ağrısı, hipertansiyon ve aritmi gibi kardiyovasküler bulgular sıkça gözlenir. Ephedra türlerinin içerdiği alkaloitlerin toksik etkileri, dozla ilişkili olarak değişir. Yüksek dozlarda alımda, merkezi sinir sistemi uyarılması sonucu huzursuzluk, anksiyete, tremor, konvülsiyon ve hatta koma gibi nörolojik semptomlar ortaya çıkabilir. Ayrıca, gastrointestinal sistemde bulantı, kusma ve karın ağrısı gibi belirtiler de görülebilir. Ephedra ekstresinin oral yolla yüksek dozda alınması durumunda, letal dozun (LD_50) yaklaşık 5.30 g/kg olduğu belirlenmiştir. Bu da, ciddi zehirlenme vakalarında ölümcül sonuçların ortaya çıkabileceğini göstermektedir (SAFETY ASSESSMENT AND DETERMINATION OF A TOLERABLE UPPER LIMIT FOR EPHEDRA, 2000). Klinik tabloda, taşikardi, hipertansiyon, hipertermi ve kaslarda rijidite gibi semptomlar da gözlenebilir. Zehirli bitkilerle zehirlenme vakalarında, tanı ve tespit yöntemleri de klinik bulguların değerlendirilmesinde önem taşır. Özellikle adli bilimlerde, zehirlenmeye neden olan ajanların tespiti için kullanılan gaz kromatografisi/kütle spektrometrisi (GC/MS) gibi ileri teknikler, hem duyarlılık hem de özgüllük açısından avantaj sağlar. Ancak bu yöntemler, teknik olarak karmaşık olup, uzmanlık ve zaman gerektirir. Standart immünolojik testler ise daha hızlı sonuç vermekle birlikte, bazı ajanlar için duyarlılıkları sınırlı olabilir (Tortum, 2019). Bu nedenle, klinik bulguların laboratuvar bulgularıyla desteklenmesi, doğru tanı ve tedavi açısından kritik öneme sahiptir. *Ephedra distachya* ve benzeri bitkilerle zehirlenme vakalarında, semptomların şiddeti ve seyri, alınan bitki miktarına, bireyin yaşına, genel sağlık durumuna ve eşlik eden hastalıklara göre değişebilir. Hafif

vakalarda sadece baş ağrısı, halsizlik ve hafif taşikardi gibi semptomlar gözlenirken, ağır vakalarda kardiyak aritmi, hipertansif kriz, nöbet ve solunum depresyonu gibi hayatı tehdit eden bulgular ortaya çıkabilir (*Safety Assessment and Determination of a Tolerable Upper Limit for Ephedra,* 2000). Ayrıca, bazı vakalarda refleks bradikardi veya AV blok gibi paradoksal kardiyak yanıtlar da gelişebilir (Tortum, 2019).Zehirli bitkilerle zehirlenme vakalarının adli önemi, özellikle ölümle sonuçlanan veya ciddi sağlık sorunlarına yol açan durumlarda daha da artmaktadır. Bu tür vakalarda, toksikolojik analizlerin yanı sıra, klinik bulguların ayrıntılı olarak değerlendirilmesi ve zehirlenmeye neden olan bitkinin doğru şekilde tanımlanması gereklidir. Ephedra türlerinin morfolojik ve kimyasal özelliklerinin yanı sıra, toksik etkilerinin de iyi bilinmesi, adli olaylarda doğru değerlendirme yapılmasını sağlar. Ephedra türlerinin taşıdığı alkaloit miktarları türlere, cinsiyete, lokaliteye ve mevsime bağlı olarak değişebilir. Bu değişkenlik, zehirlenme vakalarında klinik bulguların farklılık göstermesine neden olabilir (Siran vd., 2013). Sonuç olarak, zehirli bitkilerle zehirlenme vakalarında klinik bulguların çeşitliliği, toksik maddenin özelliklerine ve bireysel faktörlere bağlı olarak geniş bir yelpazede ortaya çıkmaktadır. Doğru tanı ve etkin tedavi için, klinik belirtilerin laboratuvar analizleriyle desteklenmesi ve bitkinin toksikolojik özelliklerinin iyi anlaşılması gerekmektedir.

2.3.2. Adli Olaylarda Zehirli Bitki Vakalarının Önemi

Adli olaylarda zehirli bitki vakaları, hem olayların aydınlatılması hem de toplum sağlığının korunması açısından oldukça önemlidir. Zehirli bitkilerle gerçekleşen zehirlenme vakaları, özellikle adli tıp ve toksikoloji alanında, ölüm ya da ciddi sağlık sorunlarına yol açabilmeleri nedeniyle titizlikle incelenmektedir. Bu tür vakalarda, bitkinin türünün doğru şekilde tanımlanması, toksik bileşenlerin tespiti ve olayın adli boyutunun aydınlatılması için gereklidir (MUTLU vd., 2020). Zehirli bitkilerle ilişkili adli vakalarda, bitkinin morfolojik ve anatomik özelliklerinin yanı sıra, moleküler yöntemlerle yapılan tür tayini büyük önem taşır. Özellikle ağız ve mide özsuyu ile muamele olmuş bitki parçalarından DNA izolasyonu ve tür tespiti, olayın çözümünde kritik rol oynar. Bu tür analizler, bitkinin olay yerinde veya mağdurun vücudunda bulunup bulunmadığının belirlenmesinde kullanılabilir. Ayrıca, bitki türlerinin

morfolojik olarak birbirine çok benzeyebildiği durumlarda, moleküler filogenetik analizler ve DNA baz sırası belirleme yöntemleri, adli olaylarda kesin tanı için gereklidir. Bu bitkilerin zehirli doğası, alkaloidler, glikozitler, toksalbuminler, saponinler ve proteinler gibi toksik metabolitlerin varlığından kaynaklanmaktadır. Bu metabolitlerden bazıları çok az maruziyetle bile insan ve hayvanlar için ciddi sağlık sorunlarına yol açabilmektedir. Hem gelişmiş hem de gelişmekte olan ülkelerdeki adli çalışmalar, zehirlenme vakalarının %80'inden fazlasının yanlışlıkla tüketilmesinden kaynaklandığını, kalan vakaların ise gönüllü olarak tüketilmesinden kaynaklandığını ortaya koymuştur (Nithaniyal vd., 2021).*Ephedra distachya* gibi toksik etkili bitkiler, içerdiği alkaloitler nedeniyle zehirlenme vakalarında sıkça karşılaşılan türlerdendir. Bu bitkinin farmakokinetik ve farmakodinamik etkileri, içerdiği ephedrin alkaloidlerinin izomerik farklılıklarına bağlı olarak değişkenlik gösterir. Her bir izomerin toksikolojik davranışı farklı olabileceğinden, adli toksikoloji analizlerinde bu farklılıkların göz önünde bulundurulması gerekir (Woolf vd., 2005). Bu farklılık, adli olaylarda toksik dozun ve zehirlenme mekanizmasının değerlendirilmesinde dikkate alınmalıdır. Zehirli bitki vakalarında, toksik maddenin tespiti için çeşitli analitik yöntemler kullanılmaktadır. GC/MS gibi ileri teknikler, toksik bitki bileşenlerinin tespitinde yüksek hassasiyet sunar. Ancak bu yöntemler karmaşık cihazlar ve uzman personel gerektirir, ayrıca analiz süresi uzundur. Standart immünolojik testler ise daha hızlı sonuç verebilir, fakat bitki toksinlerinin çeşitliliği nedeniyle her zaman yeterli duyarlılığa sahip olmayabilir. Adli olaylarda zehirli bitki vakalarının önemi, sadece toksik maddenin tespitiyle sınırlı değildir. Aynı zamanda, olayın kriminal boyutunun aydınlatılması, mağdurun ölüm nedeni veya sağlık durumunun belirlenmesi ve olası suç unsurlarının ortaya çıkarılması açısından da kritiktir. Bitki türlerinin morfolojik ve moleküler olarak doğru tanımlanması, adli raporların güvenilirliğini artırır ve adaletin sağlanmasına katkı sunar. Özellikle *Ephedra distachya* gibi türlerin ayırt edici morfolojik ve anatomik özelliklerinin belirlenmesi, benzer türlerle karışıklığın önlenmesinde ve adli süreçlerde doğru değerlendirme yapılmasında önemlidir (Tanker & Altun, 1997) Sonuç olarak, zehirli bitki vakalarının adli olaylardaki önemi, multidisipliner bir yaklaşım gerektirir. Morfolojik, anatomik, moleküler ve toksikolojik analizlerin bir arada değerlendirilmesi, olayların doğru şekilde aydınlatılmasını sağlar. Bu süreçte, bitki türlerinin yayılışı, toksik

bileşenlerin çeşitliliği ve analitik yöntemlerin seçimi, adli bilimlerin temel kavramları arasında yer alır .

2.3.3. Zehirlenmelerde Toksikolojik Analizler

Zehirlenme vakalarında toksikolojik analizler, adli bilimler açısından kritik bir öneme sahiptir. Zehirli bitkilerle meydana gelen zehirlenmelerde, toksik maddenin tespiti, miktarının belirlenmesi ve biyolojik etkilerinin anlaşılması için çeşitli analitik ve moleküler yöntemler kullanılmaktadır. Bu analizler, hem olayın aydınlatılması hem de adli süreçlerde delil olarak kullanılabilecek bilimsel verilerin elde edilmesi açısından gereklidir (MUTLU vd., 2020). Toksikolojik analizlerde ilk adım, şüpheli bitki materyalinin veya biyolojik örneklerin uygun şekilde toplanması ve saklanmasıdır. Örneğin, *Ephedra distachya* gibi alkaloit içeren bitkilerle meydana gelen zehirlenmelerde, bitki örneklerinin yanı sıra, mağdurun kan, idrar veya doku örnekleri de analiz için kullanılabilir (Siran vd., 2013). Bu örneklerde, toksik bileşenlerin varlığı ve konsantrasyonu, genellikle GC-MS, HPLC gibi ileri analitik tekniklerle belirlenir. Ayrıca, bitki materyalinden DNA izolasyonu ve moleküler analizler de tür tayini ve toksik bileşenlerin genetik düzeyde tespiti için uygulanmaktadır (Cakmak vd., 2020). Ephedra türleri gibi alkaloit içeren bitkilerde, toksikolojik analizler sırasında özellikle efedrin ve benzeri alkaloitlerin miktar tayini önemlidir. Toksikolojik analizlerde örneklerin toplandığı koşulların ve bitkinin fenolojik durumunun kaydedilmesi gereklidir. Ayrıca, toksik maddenin biyolojik etkilerinin değerlendirilmesi için hayvan deneyleri de yapılabilmektedir. Örneğin, farelerde yapılan toksisite testlerinde, yüksek dozda alınan bitki ekstraktlarının hiperkinetik davranışlar, konvülsif nöbetler, ataksi ve letarji gibi semptomlara yol açtığı, ölümcül dozun (LD_50) ise cinsiyete göre değiştiği gösterilmiştir (*Safety Assessment and Determination of a Tolerable Upper Limit for Ephedra,* 2000). Moleküler düzeyde yapılan analizler, zehirlenme vakalarında bitki türünün kesin olarak tanımlanmasını sağlar. PCR tabanlı yöntemlerle bitki DNA'sı çoğaltılarak, *ITS* bölgesi gibi genetik markerlar üzerinden tür tayini yapılabilir (Hamedani vd., 2020). Morfolojik sınıflandırmaların yetersiz kaldığı durumlarda, mikromorfoloji, sitoloji, kimyasal analizler ve DNA dizileme gibi yöntemler, coğrafi dağılımla ilişkili tür ayrımında daha güvenilir sonuçlar sunmaktadır. Bu tür moleküler analizler, adli olaylarda şüpheli bitki

materyalinin doğru şekilde tanımlanmasına ve zehirlenme kaynağının belirlenmesine olanak tanır (Huang vd., 2005). Zehirlenme vakalarında toksikolojik analizlerin bir diğer önemli yönü, elde edilen bulguların adli raporlara yansıtılmasıdır. Özellikle Türkiye'de, adli tıp kurumları tarafından hazırlanan bilirkişi raporlarında, toksikolojik analiz sonuçları olayın aydınlatılmasında temel teşkil etmektedir. Bu raporlar, hem zehirlenmenin kaynağının hem de toksik maddenin miktarının belirlenmesi açısından önemlidir. Küresel zehirlenme vakalarının artışıyla ilgili oluşan endişe, önleme ve hızlı tedavi için bütün dünyada zehir kontrol merkezlerinin kurulmasını sağlamıştır. Bitki zehirlenmesi vakalarının kurbanlarını tedavi etmek genellikle belirli panzehirlerin acil kullanımını gerektirmektedir. Her zehirli bitki grubunun farklı toksik metabolitleri vardır. Bu nedenle, hastalar için uygun tedaviyi başlatmak için zehirlenmeyle ilişkili bitki türlerinin derhal ve güvenilir bir şekilde tanımlanması oldukça önemlidir. Kusmuk veya dışkı örneklerinin görsel muayenesiyle bitki türlerinin tanımlanması son derece zordur çünkü çok az miktarda parçalanmış bitki parçası mevcut olacaktır ve taksonomik tür tanımlaması için gereken morfolojik özellikler artık bu tür örneklerde yeterli gelmemektedir. Bu nedenle, tür tanımlaması için morfolojik özelliklere dayanmayan DNA barkodlaması, kusmuk veya dışkıdan yutulan bitkilerin tespitinde oldukça yararlı olacaktır (Nithaniyal vd., 2021).

2.4.*Ephedra distachya*

2.4.1. *E. distachya* Morfolojik Özellikleri

Ephedra distachya, Türkiye florasında yer alan üç Ephedra türünden biridir ve morfolojik özellikleriyle diğer türlerden ayırt edilebilmektedir (Tanker vd., 2008). *Ephedra distachya*'nın genel olarak enine kesitleri dairesel veya eliptik şekildedir ve yüzeylerinde çok sayıda sırt ve oluk vardır. Sırtlarda kütiküler yumrular gözlenmiştir ve olukların içinde koruyucu hücreli stomalar yer alır. Epidermal hücreler sıkı bir şekilde dizilmiştir ve kalın bir kütikül ile örtülüdür. Yüzeyin altında dikdörtgen şekilli lif demetlerinden oluşan sırtlar epidermis ile temas halindedir. Türkiye'den alınan örneklerde 165.78 ± 26.28 µm uzunluğundadır ve korteksin %50 ± 7'sini oluşturur. Korteks esas olarak, dış kortekste radyal olarak uzamış palizat hücreleri ve iç kortekste dairesel hücreler de dahil

olmak üzere parankima hücrelerinden oluşur. Düzensiz şekillerde birçok lif veya küçük lif grupları korteks boyunca dağılmıştır. Öz, çoğu dairesel olan ve sıklıkla kahverengi bir madde ile dolu olan büyük parankima hücrelerinden oluşur (Siran vd., 2013). Bu türde dişi çiçekler genellikle demet halinde bulunur ve meyveleri küremsi, parlak kırmızı renktedir. Meyve yapısı, iki tohum taşımasıyla *E. maior*'dan kolayca ayrılmasını sağlar. Ayrıca, *E. distachya*'da karakteristik olarak üçlü kısmi çiçek durumu gözlenir; çiçek sayısı oldukça fazladır ve 14-18 ile 8-10 arasında değişebilir. Çiçekler, saplı ve derin bir çanak biçiminde olan 8-10 brakte çiftiyle çevrilidir. Bu morfolojik özellikler, türün tanımlanmasında önemli rol oynar. *E. distachya*'nın morfolojik tanımlamasında, gövde ve dal yapısı da dikkate alınmalıdır. Türler arası benzerlik ve farklılıkların belirlenmesi amacıyla yapılan çalışmalarda, *E. distachya*'nın dallarının anatomik karakterleri ve genel morfolojisi detaylı olarak incelenmiştir. *E. distachya, E. maior* ile aynı lokalitede bulunabilmesine rağmen, morfolojik olarak ayrılması zor olan türlerdendir. Ancak, meyve ve çiçek yapısındaki farklılıklar, özellikle tohum sayısı ve meyve rengi, ayırt edici kriterler sunar. Morfolojik incelemelerde, *E. distachya* 'nın çiçeklenme ve meyve oluşum dönemleri de tür teşhisinde önem taşır. Aynı vejetatif dönemde toplanan örnekler üzerinde yapılan karşılaştırmalı analizler, türler arasındaki morfolojik varyasyonun belirlenmesine katkı sağlamıştır. *E. distachya*'nın morfolojik özellikleri, adli bilimlerde bitki tanımlama süreçlerinde de önem taşır. Özellikle zehirli bitki vakalarında, türün doğru teşhisi için çiçek, meyve ve tohum morfolojisinin detaylı olarak incelenmesi gerekmektedir. Sonuç olarak, *E. distachya*'nın morfolojik özellikleri; dişi çiçeklerin demet halinde olması, küremsi ve kırmızı meyve yapısı, iki tohum taşıması, çok sayıda çiçek ve karakteristik brakte çiftleri ile tanımlanabilir (Tanker & Altun, 1997) . Bu özellikler, hem türün diğer Ephedra türlerinden ayrılmasında hem de adli ve farmakolojik çalışmalarda doğru teşhisinin yapılmasında temel teşkil etmektedir.

2.4.2. *E. distachya* Filogenetik Özellikleri

Ephedra distachya'nın filogenetik özellikleri, hem moleküler hem de morfolojik veriler ışığında değerlendirildiğinde, bu türün Ephedra cinsinin evrimsel ilişkilerinde önemli bir konumda yer aldığı görülmektedir. Yapılan kloroplast gen analizleri, *E. distachya*'nın *E. equisetina* ile yakın bir filogenetik ilişki içerisinde olduğunu göstermektedir. Bu iki türün, dört farklı kloroplast gen ağacından üçünde birbirine yakın konumlandığı ve muhtemelen monofiletik bir grup oluşturduğu öne sürülmektedir. Bu durum, tek tohumlu kozalak yapısının ortak bir atadan kalma bir özellik olabileceğini düşündürmektedir (Huang vd., 2005). Bu seksiyona dahil edilen türlerin tek bir ortak atadan türemediği, farklı evrimsel kökenlere sahip oldukları düşünülmektedir. Bu bulgu, Ephedra cinsinin filogenetik sınıflandırmasında morfolojik karakterlerin tek başına yeterli olmadığını, moleküler verilerin de dikkate alınmasının gerekliliğini ortaya koymaktadır (Huang vd., 2005). Türkiye'de yetişen Ephedra türleri üzerinde yapılan araştırmalarda, *E. distachya*'nın hem erkek hem de dişi bireylerinin morfolojik ve kimyasal özellikleri detaylı olarak incelenmiştir. Bu türün filogenetik analizlerinde, morfolojik varyasyonların ve kimyasal bileşenlerin de dikkate alınması, türler arası ilişkilerin daha doğru bir şekilde ortaya konmasına katkı sağlamaktadır. Ephedra cinsinin filogenetik yapısının karmaşıklığı, hem moleküler hem de morfolojik verilerin birlikte değerlendirilmesini zorunlu kılmaktadır. Özellikle *E. distachya* gibi türlerde, kloroplast DNA dizilerinin analizi, türler arası akrabalık ilişkilerinin aydınlatılmasında önemli bir araç olarak öne çıkmaktadır (Huang vd., 2005). *E. distachya*'nın filogenetik konumunun belirlenmesinde hem moleküler hem de morfolojik verilerin bütüncül bir yaklaşımla değerlendirilmesi gerekmektedir.

2.4.3. *E. distachya* Moleküler Özellikleri

Ephedra distachya'nın moleküler özellikleri, türün filogenetik konumunun ve taksonomik ayırt ediciliğinin anlaşılması açısından büyük önem taşır. Bu bitkinin moleküler düzeyde incelenmesi, özellikle trakeal kalınlaşmalar gibi anatomik karakterlerin genetik temellerinin ve varyasyonlarının ortaya konulmasına olanak sağlar. Yapılan bir çalışmada, Kuzey Amerika Ephedra türlerinde helikal trakeal kalınlaşmaların çoğunlukla bulunduğunu, ancak bazı türlerde bu özelliğin görülmediğini ve bu karakterin

homoplaziye açık olduğunu belirtilmektedir. Bu durum, *E. distachya* gibi türlerde de benzer moleküler varyasyonların olabileceğini düşündürmektedir (Huang vd., 2005). Moleküler filogenetik analizler, bu türün diğer Ephedra türleriyle olan evrimsel ilişkilerini aydınlatmak için kullanılmaktadır. Özellikle ribozomal DNA ve kloroplast DNA dizilerinin karşılaştırılması, türler arası genetik farklılıkların belirlenmesinde etkili olmaktadır(Huang vd., 2005). *Ephedra distachya* 'nın genomik yapısı, sekonder metabolitlerin biyosentezinden sorumlu genlerin varlığı ve ekspresyon düzeyleri açısından da incelenmiştir. Bu bitkide bulunan efedrin ve psödoefedrin gibi alkaloidlerin biyosentez yolları, ilgili enzimlerin kodlandığı genlerin moleküler analiziyle anlaşılabilmektedir. Efedrin ve psödoefedrinin akut inflamasyonlarda antienflamatuvar olarak kullanıldığı ve bu bileşiklerin moleküler düzeyde biyosentezinin türün farmakolojik özellikleriyle doğrudan ilişkili olduğu yapılan bir çalışmada belirtilmektedir (Tanker vd., 2008). Ayrıca yapılan başka bir çalışmada, Ephedra türlerinin akciğer dokusunda inflamatuvar mediyatörlerin salınımını inhibe ettiğini ve bu etkinin IL-21, IL-21R, STAT3 ve p-STAT3 gibi moleküler belirteçlerin ekspresyonunun azalmasıyla ilişkili olduğunu göstermiştir. Bu bulgular, *E. distachya*'nın moleküler düzeyde anti-inflamatuvar mekanizmalarını anlamak için önemli ipuçları sunmaktadır (Tang vd., 2023). *Ephedra distachya*'nın moleküler tanımlanmasında, DNA barkodlama ve mikrosatellit analizleri gibi modern moleküler biyoloji teknikleri kullanılmaktadır. Bu yöntemler, türün diğer Ephedra türlerinden ayırt edilmesinde yüksek doğruluk sağlamaktadır. Ayrıca, bitkinin morfolojik olarak benzer türlerle karıştırılmasını önlemek için moleküler belirteçlerin kullanımı adli bilimler açısından da önem taşır. Yapılan saha çalışmaları, *E. distachya*'nın farklı coğrafi bölgelerdeki popülasyonlarının genetik çeşitliliğini ortaya koymak için örnekleme ve moleküler analizlerin birlikte yürütülmesinin gerekliliğini vurgulamaktadır (Thureborn, 2014)). *Ephedra distachya*'nın kimyasal bileşenlerinin tespiti ve miktar tayini için HPLC gibi analitik yöntemler kullanılmaktadır. Toz numunelerin asidik ortamda ekstraksiyonu ve UV detektör ile analizinin, bitkideki aktif bileşenlerin moleküler düzeyde kantitatif olarak belirlenmesini sağladığını belirtilmektedir (Tanker vd., 2008). Bu tür analitik yaklaşımlar, bitkinin farmasötik ve toksikolojik değerlendirmelerinde güvenilir veri elde edilmesine katkı sunar. *Ephedra distachya*'nın moleküler özelliklerinin anlaşılması, hem türün sistematikteki yerinin netleştirilmesi hem de farmakolojik ve toksikolojik etkilerinin

açıklanması açısından gereklidir. Moleküler düzeyde yapılan çalışmalar, türün genetik çeşitliliği, sekonder metabolit profili ve biyolojik etkileri arasındaki ilişkilerin ortaya konulmasına olanak tanır. Bu bilgiler, adli bilimlerde zehirli bitki vakalarının doğru şekilde tanımlanması ve değerlendirilmesi için de temel teşkil etmektedir (Huang vd., 2005; Tang vd., 2023; Tanker vd., 2008)

2.5. *Ephedra distachya*'nın Kullanım Alanları

2.5.1. Geleneksel ve Tıbbi Kullanım

Ephedra (ma-huang), en az 5.000 yıldır bilinen bir Çin çalısıdır. MÖ 2.700 civarında Çin imparatoru Shen Nung, 365 bitkiyi acılıklarına göre güçlü, orta ve hafif olmak üzere 3 ana grupta katalogladığında, kelimenin tam anlamıyla çevirisi 'kenevir sarısı' anlamına gelen Ma-huang, orta gruba yerleştirildi. 16. yüzyılın sonlarında, Li Shih-Chen tarafından çalının açıkça tanımlandığı Pents'ao Kang Mu adlı ünlü bir dispanser üretildi. Ephedra'nın dolaşım uyarıcısı, terletici ve ateş düşürücü olarak yararlı olduğu söylendi. Ayrıca öksürüğün tedavisinde de yararlı olduğuna inanılıyordu ve sonuç olarak sap, birçok öksürük kesici preparatın önemli bir bileşeni haline geldi. On altıncı yüzyılın sonunda kurutulmuş saplar Japonya'ya ihraç edildi ve bu ticaret, yaklaşık üç yüz yıl sonra Japon hekimlerin ve kimyagerlerin bitkiye olan ilgisini canlandırmada önemli bir rol oynamıştır. Tıbbi değeri olduğu düşünülen diğer Ephedra türleri (E. pachyclada ve E. intermedia) Yunanistan, Rusya, Hindistan ve Amerika'da keşfedildi. Hindular ve Parsiler de dahil olmak üzere çeşitli dini gruplar, törenlerinde coşku hissi yaratmak için bunları kullanmışlardır. Ephedra, efedrinin kan-beyin bariyerinden hızla geçmesi sonucu merkezi sinir uyarıcısı olarak işlev görmektedir. Bu, hipotalamusun bir kısmını da kontrol eden limbik sistemdeki nöronları uyarmaktadır (Lee, 2011). Bu türün içerdiği alkaloitler, özellikle efedrin ve psödoefedrin, farmakolojik etkileri nedeniyle çeşitli tedavi amaçlarıyla kullanılmıştır. Efedrin, sempatomimetik etkileriyle bilinir ve bronkodilatör, dekonjestan ve hafif uyarıcı olarak tıbbi uygulamalarda yer bulmuştur. Özellikle solunum yolu hastalıklarında, astım ve bronşit gibi durumlarda bronşları genişletici etkisiyle tercih edilmiştir. Ayrıca, efedrin ve türevleri, soğuk algınlığı ve grip ilaçlarında burun tıkanıklığını gidermek amacıyla kullanılmıştır. *Ephedra distachya*'nın tıbbi kullanımı

sadece solunum sistemiyle sınırlı değildir. Bitkinin içerdiği aktif bileşenler, merkezi sinir sistemi üzerinde de uyarıcı etki gösterir. Bu nedenle, yorgunluk ve halsizlik gibi durumlarda enerji artırıcı olarak da kullanımı söz konusu olmuştur. Ancak, bu etkiler farmakokinetik olarak incelendiğinde, efedrinin vücutta hızlı bir şekilde emildiği ve plazma konsantrasyonunun belirli bir süre boyunca yüksek kaldığı gözlemlenmiştir. Bu durum, tıbbi uygulamalarda dozaj ve kullanım sıklığının dikkatli bir şekilde ayarlanmasını gerektirir (*Safety Assessment and Determination of a Tolerable Upper Limit for Ephedra,* 2000). Bu sebeple *Ephedra distachya*, tıbbi kullanım açısından tarih boyunca önemli bir bitki olarak öne çıkmıştır. Efedrin metabolizması incelendiğinde, vücutta çeşitli metabolitlere dönüştüğü ve idrar yoluyla atıldığı anlaşılmaktadır. Özellikle hippurik ve benzoik asit gibi metabolitler idrarda yüksek oranda tespit edilebilmektedir. Ayrıca, 1-fenil-1,2-propanediol gibi metabolitler de idrarda bulunabilmektedir. Bu metabolik yolaklar, efedrin kullanımının toksikolojik analizlerinde ve adli tıp uygulamalarında önemli bir yer tutar. *Ephedra distachya*'nın tıbbi kullanımı, bitkinin doğal bileşenlerinin farmasötik preparatlarda standardize edilmesiyle daha kontrollü hale getirilmiştir. Modern analiz teknikleriyle, bitkiden elde edilen alkaloitlerin miktarları hassas bir şekilde belirlenebilmekte ve bu sayede dozaj güvenliği sağlanmaktadır. Yapılan çalışmalar, standart alkaloit miktarlarının kalibrasyon eğrileriyle doğrulanabildiğini göstermektedir (Siran vd., 2013). Bununla birlikte, *Ephedra distachya* ve türevlerinin tıbbi kullanımı bazı riskleri de beraberinde getirmektedir. Yanlış dozaj veya uygunsuz kullanım, kardiyovasküler sistem üzerinde olumsuz etkilere yol açabilir. Özellikle hipertansiyon, taşikardi ve aritmi gibi yan etkiler, efedrin içeren preparatların kontrollü kullanımını zorunlu kılar. Ayrıca, efedrin ve psödoefedrin gibi bileşenlerin kötüye kullanımı, yasal düzenlemelerle sınırlandırılmıştır. Bu maddeler hem üretim hem de ticaret açısından sıkı denetim altındadır (MUTLU vd., 2020). *Ephedra distachya*'nın tıbbi kullanımı, bitkinin morfolojik ve kimyasal çeşitliliğiyle de ilişkilidir. Farklı coğrafi bölgelerde yetişen popülasyonlar arasında genetik çeşitlilik gözlemlenmiş ve bu durum, tıbbi amaçla kullanılan bitki materyalinin etkinliğinde farklılıklara yol açabilmektedir. Yapılan genetik analizler, Ephedra türlerinde yüksek genetik çeşitlilik olduğunu ortaya koymuştur (Hamedani vd., 2020). Bu çeşitlilik, tıbbi uygulamalarda standardizasyonun önemini bir kez daha vurgulamaktadır. Sonuç olarak, *Ephedra distachya*'nın tıbbi kullanımı, hem geleneksel hem de modern tıpta önemli bir yere sahiptir. Bitkinin içerdiği

efedrin ve psödoefedrin gibi alkaloitler, farmakolojik etkileri nedeniyle çeşitli hastalıkların tedavisinde kullanılmış, ancak bu kullanım beraberinde bazı riskleri ve yasal kısıtlamaları da getirmiştir. Ayrıca, bitkinin genetik ve kimyasal çeşitliliği, tıbbi uygulamalarda kalite kontrol ve standardizasyonun gerekliliğini ortaya koymaktadır (Hamedani vd., 2020).

2.5.2. Endüstriyel ve Yasal Kullanımlar

Ephedra distachya, endüstriyel ve yasal kullanımları açısından hem farmasötik hem de geleneksel uygulamalarda önemli bir yere sahiptir. Bitkinin en dikkat çeken endüstriyel kullanımı, içerdiği efedrin alkaloidleri sayesinde farmasötik sektöründe ortaya çıkmaktadır. Efedrin, sempatomimetik etkileri nedeniyle özellikle solunum yolu hastalıklarının tedavisinde, bronkodilatör ve dekonjestan olarak kullanılmaktadır. Modern farmasötik ürünlerde efedrin, astım ve bronşit gibi hastalıkların semptomatik tedavisinde yer almakta, ayrıca bazı kombinasyon ilaçlarda da aktif bileşen olarak bulunmaktadır. Yapılan bir çalışmada, Ephedra'nın ana etken madde olarak kullanıldığı geleneksel bir karışımın (Mahuang decoction) astım modelinde antiasthmatik etkiler gösterdiği ortaya konmuştur (Tang vd., 2023). Endüstriyel ölçekte efedrin üretimi, bitkiden ekstraksiyon yoluyla veya sentetik olarak gerçekleştirilebilmektedir. Doğal kaynaklardan elde edilen efedrin, farmasötik kalite standartlarına uygun olarak saflaştırılır ve dozaj formlarında kullanıma sunulur. Bununla birlikte, efedrin ve türevlerinin merkezi sinir sistemi üzerindeki uyarıcı etkileri ve kardiyovasküler sistemde oluşturduğu yan etkiler nedeniyle, bu bileşiklerin kullanımı birçok ülkede yasal düzenlemelere tabi tutulmuştur (*Safety Assessment and Determination of a Tolerable Upper Limit for Ephedra*, 2000). Özellikle efedrin içeren ürünlerin kötüye kullanım potansiyeli ve yasa dışı amfetamin türevlerinin üretiminde ara madde olarak kullanılabilmesi, yasal kısıtlamaların temel nedenlerindendir. Türkiye'de ve birçok ülkede efedrin ve türevlerinin satışı, reçeteye tabi tutulmuş ve belirli dozaj sınırları ile sınırlandırılmıştır. Ayrıca, efedrin içeren bitkisel ürünlerin gıda takviyesi olarak satışı da yasal olarak kısıtlanmıştır. Bu düzenlemeler, hem halk sağlığını korumak hem de yasa dışı madde üretiminin önüne geçmek amacıyla uygulanmaktadır (Tortum, 2019). Klinik uygulamalarda efedrin ve benzeri alkaloidlerin kullanımı, toksikolojik testler ve

farmakovijilans uygulamaları ile yakından izlenmektedir. Toksikolojik tarama testlerinin yönetim üzerindeki etkisi sınırlı olmakla birlikte, efedrin gibi maddelerin tespiti adli ve klinik açıdan önem taşımaktadır. *Ephedra distachya*'nın endüstriyel kullanımı sadece farmasötik alanla sınırlı değildir. Bitkinin morfolojik ve kimyasal özellikleri, taksonomik ve filogenetik araştırmalarda da referans materyal olarak kullanılmasını sağlamaktadır. Özellikle herbaryum örnekleri, bilimsel araştırmalarda tür teşhisi ve genetik analizler için önemli bir kaynak oluşturmaktadır (Kakiuchi vd., 2011). Yasal düzenlemeler, *Ephedra distachya*'nın doğadan toplanması, işlenmesi ve ticareti üzerinde de etkili olmuştur. Bitkinin doğal popülasyonlarının korunması amacıyla, bazı bölgelerde toplama faaliyetleri izne tabi tutulmuş veya kısıtlanmıştır. Ayrıca, bitkinin endüstriyel amaçlarla yetiştirilmesi ve işlenmesi sırasında çevresel etkiler de göz önünde bulundurulmaktadır. *Ephedra distachya* geniş bir coğrafi yayılışa sahiptir, ancak bazı bölgelerde diğer Ephedra türleriyle kısmen örtüşen habitatlarda bulunduğu belirtilmektedir.(Woolf vd., 2005) Bu durum, türün sürdürülebilir kullanımı ve korunması açısından yasal düzenlemelerin gerekliliğini ortaya koymaktadır. Sonuç olarak, *Ephedra distachya*'nın endüstriyel ve yasal kullanımları, farmasötik uygulamalardan bilimsel araştırmalara, doğadan toplama ve ticaret süreçlerinden çevresel koruma önlemlerine kadar geniş bir yelpazede değerlendirilmektedir. Bitkinin içerdiği efedrin ve benzeri alkaloidlerin hem tıbbi hem de yasa dışı kullanımları, yasal düzenlemelerin ve denetimlerin önemini artırmaktadır (Huang vd., 2005)

2.5.3. İllegal Kullanımı

Ephedra distachya'nın illegal kullanımı, bitkinin içerdiği alkaloidlerin farmakolojik etkilerinden kaynaklanmaktadır. Özellikle efedrin ve türevleri, merkezi sinir sistemi üzerinde uyarıcı etki gösterdiğinden, bu bileşikler yasa dışı amaçlarla sıklıkla kullanılmaktadır. Efedrin, sentetik uyuşturucu üretiminde öncü madde olarak da değerlendirilmektedir. Bu nedenle, *Ephedra distachya* ve benzeri türlerin kontrolsüz kullanımı, hem sağlık hem de adli açıdan önemli riskler taşır (*Safety Assessment and Determination of a Tolerable Upper Limit for Ephedra,* 2000). Efedra alkaloidlerinin yasa dışı kullanımı, çoğunlukla performans artırıcı veya kilo kaybı sağlayıcı etkilerinden dolayı ortaya çıkmaktadır. Ancak, bilimsel araştırmalar, efedrin içeren ürünlerin

ergogenik etkilerinin abartıldığını ve bu tür iddiaların genellikle bilimsel dayanağı olmadığını göstermektedir. Efedrin ve benzeri maddelerin atletik performans üzerindeki etkilerinin çoğu zaman yanlış aktarıldığı ve bu maddelerin genç, sağlıklı bireylerde beklenen faydaları sağlamadığı artık bilinmektedir (Powers, 2001). Bu durum, özellikle sporcular arasında efedrin içeren ürünlerin yasa dışı yollarla temin edilmesine ve kullanılmasına yol açmaktadır. *Ephedra distachya*'nın yasa dışı kullanımı sadece performans artırıcı veya kilo kaybı amacıyla sınırlı değildir. Efedrin, metamfetamin gibi sentetik uyuşturucuların üretiminde de ana bileşen olarak kullanılmaktadır. Türkiye'de ve dünyada metamfetamin üretiminde efedrin ve türevlerinin yasa dışı ticareti önemli bir sorun haline gelmiştir. 2016 yılında Türkiye'de metamfetamin tespit edilen olay sayısında ciddi bir artış gözlenmiş, bu artışın temel nedenlerinden biri olarak efedrin temininindeki kolaylık gösterilmiştir (MUTLU vd., 2020). Bu tür vakalar, adli bilimler açısından bitkinin ve türevlerinin izlenmesini ve kontrolünü zorunlu kılmaktadır. *Ephedra distachya* ve benzeri bitkilerden elde edilen efedrin, farmasötik ürünlerin yanı sıra, yasa dışı laboratuvarlarda da kullanılabilmektedir. Bu laboratuvarlarda efedrin, kimyasal işlemlerle metamfetamin gibi güçlü psikoaktif maddelere dönüştürülmektedir. Bu süreçte kullanılan yöntemler, genellikle yüksek saflıkta organik çözücüler ve laboratuvar ekipmanları gerektirir. Yasa dışı efedrin kullanımı ve ticareti, halk sağlığı açısından da ciddi tehlikeler barındırmaktadır. Ephedra alkaloidlerinin yüksek dozda alınması, kardiyovasküler sistem üzerinde ciddi yan etkilere yol açabilir. Bu nedenle, toksik dozların tespiti ve erken müdahale, zehirlenme vakalarında hayati öneme sahiptir. *Ephedra distachya*'nın yasa dışı kullanımı, sadece bireysel sağlık sorunlarına değil, aynı zamanda toplumda suç oranlarının artmasına ve yasa dışı uyuşturucu pazarının büyümesine de katkı sağlamaktadır. Bu nedenle, bitkinin ve türevlerinin kontrol altına alınması, hem yasal düzenlemeler hem de adli bilimler açısından öncelikli bir konu olarak değerlendirilmelidir. Ayrıca, bitkinin doğal yayılış alanlarının izlenmesi ve yasa dışı toplama faaliyetlerinin önlenmesi, biyolojik çeşitliliğin korunması açısından da önem taşımaktadır (Thureborn, 2014).

2.5.4. *E.distachya*'nın Türkiye'deki Dağılım Haritası ve Ekolojik Özellikler

Türkiye'de Ephedra türlerinin dağılımı ve ekolojik özellikleri, bitkinin biyocoğrafik kökeni ve adaptasyon yeteneği açısından önemli bilgiler sunar. Bazı araştırmacılar, Ephedra'nın yalnızca Akdeniz bölgesine özgü olduğunu öne sürerken, diğerleri bu cinsin Kuzey Afrika, Avrupa-Anadolu, Orta ve Doğu Asya, Kuzey Amerika ve Meksika ile Güney Amerika'da doğal olarak yetiştiğini ve bu bölgelerin Ephedra türlerinin yayılış alanlarını oluşturduğunu belirtmektedir. Bu görüşler, Ephedra'nın geniş bir ekolojik toleransa sahip olduğunu ve farklı iklimsel koşullara adapte olabildiğini göstermektedir. Türkiye'de *Ephedra distachya* türünün yayılışı, özellikle İç Anadolu ve Akdeniz bölgelerinde gözlemlenmiştir. Örneğin, Mersin-Silifke arasında, 15. kilometrede 30 Aralık 1991 tarihinde toplanan örnekler, bu türün Akdeniz ikliminin hakim olduğu alanlarda varlığını sürdürdüğünü göstermektedir. Ayrıca, Kayseri-Yılanlıdağ'da 1160 metre yükseklikte, Sallıbayır mevkiinde 8 Haziran ve 27 Temmuz 1991 tarihlerinde toplanan örnekler, *Ephedra distachya*'nın yüksek rakımlı ve karasal iklim özellikleri gösteren bölgelerde de yetişebildiğini ortaya koymaktadır. Bu bulgular, türün hem deniz seviyesine yakın hem de yüksek rakımlı alanlarda yaşayabildiğini, dolayısıyla ekolojik esnekliğinin yüksek olduğunu düşündürmektedir. Ekolojik olarak, Ephedra türleri genellikle kurak ve yarı kurak habitatlarda, taşlık ve kumlu topraklarda, güneşli ve açık alanlarda yayılım göstermektedir. Bu türlerin, su tutma kapasitesi düşük topraklarda ve ekstrem sıcaklık değişimlerine karşı dayanıklı olmaları, onların Türkiye'nin farklı ekolojik bölgelerinde varlık gösterebilmesini sağlamaktadır(Tanker & Altun, 1997). Ayrıca, *Ephedra distachya*'nın morfolojik varyasyonları ve polen morfolojisindeki çeşitlilik, türün farklı ekolojik koşullara uyum sağlama potansiyelini desteklemektedir. Türkiye'de Ephedra türlerinin yayılış haritası, hem Akdeniz hem de İç Anadolu'nun farklı ekolojik nişlerinde varlık gösteren popülasyonları içermektedir. Bu dağılım, türün hem sıcak ve kurak Akdeniz iklimine hem de daha soğuk ve karasal İç Anadolu iklimine adapte olabildiğini göstermektedir (Tanker & Altun, 1997) (Ickert-Bond & Wojciechowski, 2004) . Ayrıca, *Ephedra distachya*'nın yayılış alanlarının, insan etkisiyle değişen habitatlarda da gözlemlenmesi, türün ekolojik plastisitesinin yüksek olduğunu ortaya koymaktadır. Ekolojik özellikler açısından, *Ephedra distachya*'nın fotosentetik etkinliği, su kullanım verimliliği ve stres koşullarına dayanıklılığı, türün Türkiye'deki

farklı coğrafi bölgelerde başarılı bir şekilde yayılmasına olanak tanımaktadır. Bu özellikler, türün hem doğal hem de antropojenik baskılara karşı dirençli olmasını sağlamaktadır. Sonuç olarak, *Ephedra distachya*'nın Türkiye'deki dağılımı, geniş bir ekolojik tolerans ve morfolojik çeşitlilik ile karakterizedir ve bu durum, türün ülkemizdeki biyocoğrafik ve ekolojik önemini artırmaktadır.

2.6. *E. distachya* Zehirlenmeleri

2.6.1. Zehirlenme Mekanizması

Ephedra distachya zehirlenmelerinde mekanizma, bitkinin içerdiği aktif bileşenlerin farmakolojik etkileriyle yakından ilişkilidir. Özellikle efedrin ve benzeri sempatomimetik alkaloidler, merkezi sinir sistemi ve kardiyovasküler sistem üzerinde belirgin uyarıcı etkilere sahiptir. Bu maddeler adrenerjik reseptörleri aktive ederek sempatik sinir sistemini aşırı uyarır ve bu durum çeşitli klinik bulgulara yol açar. Sempatomimetik ajanların toksikasyonunda, soluk renkli cilt ve aşırı terleme gibi semptomlar gözlenebilir. Ayrıca, ciddi lokalize solukluk arteryel vazospazm sonucu ortaya çıkabilir ve bu durum özellikle amfetamin veya efedrin kullanımıyla ilişkilendirilebilir. Siyanoz ise hipoksi, methemoglobinemi veya sülfehemoglobinemi gibi oksijen taşınım bozukluklarını gösterebilir. Zehirlenme mekanizmasında, alınan toksik maddenin farmakolojik özellikleri hastanın solunum fonksiyonlarını da tehlikeye atabilir. Solunumun varlığı ve derinliği dikkatle izlenmeli, çünkü solunum depresyonu veya apne gelişebilir. Ayrıca, kusma ve aspirasyon riski de göz önünde bulundurulmalıdır. Efedrin ve benzeri alkaloidlerin aşırı alımı, taşikardi, hipertansiyon, aritmi ve hatta miyokard iskemisi gibi kardiyovasküler komplikasyonlara neden olabilir. Monitörizasyon, özellikle bu tür farmakolojik etkiler sonucu gelişebilecek disritmiler, hipoksi veya elektrolit dengesizliklerinin erken tespiti açısından önemlidir. *Ephedra distachya* zehirlenmelerinde de tipik olarak sempatomimetik toksidrom gözlenir. Bu sendrom, vital bulguların ve uç organ etkileniminin bir kombinasyonu ile tanımlanır. Klinik olarak taşikardi, hipertansiyon, hipertermi, midriyazis ve ajitasyon gibi bulgular ön plandadır. Ayrıca, efedrin ve türevlerinin aşırı dozda alımı, merkezi sinir sistemi üzerinde uyarıcı etkiyle birlikte konvülsiyon, halüsinasyon ve psikoz gibi nörolojik semptomlara da yol

açabilir (Tortum, 2019). *Ephedra distachya* zehirlenmelerinde toksik etkilerin şiddeti, alınan doz, kişinin yaş, cinsiyet ve genel sağlık durumu gibi bireysel faktörlerine bağlı olarak değişkenlik gösterebilir. Hayvan deneylerinde, Ephedra içeren preparatların yüksek dozlarda bile iyi tolere edilebildiği, ancak belirli bir eşik aşıldığında toksik etkilerin ortaya çıktığı gösterilmiştir. Örneğin, farelerde yapılan çalışmalarda, l-efedrinin 14 günlük LD_50 değeri 360 mg/kg olarak belirlenmiştir. Bu bulgu, zehirlenme riskinin doza bağımlı olduğunu ve toksik etkilerin ortaya çıkmasında bireysel toleransın önemli rol oynadığını göstermektedir (*Safety Assessment and Determination of a Tolerable Upper Limit for Ephedra,* 2000). Zehirlenme mekanizmasının anlaşılması, adli bilimler açısından da büyük önem taşır. Çünkü zehirli bitki vakalarında, toksik maddenin vücutta oluşturduğu farmakolojik ve patofizyolojik değişikliklerin doğru şekilde tanımlanması, hem tanı hem de tedavi sürecinde kritik rol oynar. Ayrıca, zehirlenme mekanizmasının bilinmesi, adli olaylarda ölüm nedeni veya morbiditeyle ilişkili bulguların yorumlanmasında yol gösterici olur (MUTLU vd., 2020; Tang vd., 2023)

2.6.2. Zehirlenme Vakaları

Ephedra distachya zehirlenme vakaları, bitkinin içerdiği alkaloidlerin farmakolojik etkileri ve toksik potansiyeli nedeniyle adli bilimler açısından önemli bir inceleme alanı oluşturur. Ephedra türlerinin başlıca aktif bileşenleri arasında efedrin ve psödoefedrin gibi alkaloidler yer alır; bu maddeler hem eczanelerde satılan ilaçlardan hem de doğrudan bitkisel kaynaklardan elde edilebilmektedir (Tang vd., 2023). Bu alkaloidlerin merkezi sinir sistemi ve kardiyovasküler sistem üzerinde uyarıcı etkileri bulunur. Zehirlenme vakalarında, özellikle yüksek doz alımında, ajitasyon, konfüzyon, halüsinasyon, tremor, ataksi ve nistagmus gibi nörolojik semptomlar gözlenebilir. Ayrıca, kardiyovasküler sistemde taşikardi, hipertansiyon ve aritmi gibi ciddi komplikasyonlar gelişebilir. *Ephedra distachya*'nın toksik etkileri, içerdiği alkaloidlerin farmakokinetik özelliklerine ve bireyin duyarlılığına bağlı olarak değişkenlik gösterebilir. Zehirlenme vakalarında, özellikle çocuklar ve yaşlılar gibi hassas gruplarda daha ağır klinik tablolar ortaya çıkabilmektedir. Klinik bulgular arasında mental durum değişiklikleri, deliryum ve koma gibi ciddi nörolojik bozukluklar da yer alır. Ayrıca, gastrointestinal sistemde batında distansiyon ve metalik barsak sesleri gibi bulgular da rapor edilmiştir (Tortum, 2019).

Ephedra alkaloidlerinin toksisitesi, bu maddelerin yasa dışı üretiminde ve ticaretinde de önemli bir risk faktörü olarak karşımıza çıkar. Özellikle efedrin ve psödoefedrin, sentetik uyuşturucu üretiminde ara madde olarak kullanılmakta ve bu nedenle toplu miktarlarda ele geçirilebilmektedir. Bu durum, adli olaylarda zehirli bitki vakalarının tespitinde ve değerlendirilmesinde moleküler ve kimyasal analiz yöntemlerinin önemini artırmaktadır. Tüm yöntemler, tehlikeli ek kimyasalların ve işlemlerin kullanımını içermekte olup, bu da zehirlenme riskini daha da artırmaktadır. *Ephedra distachya* zehirlenmelerinin tespitinde, klinik semptomların değerlendirilmesinin yanı sıra, laboratuvar analizleri de kritik rol oynar. Özellikle idrar ve kan örneklerinde efedrin ve psödoefedrin düzeylerinin ölçülmesi, tanı ve adli değerlendirme açısından önemlidir (MUTLU vd., 2020). Ayrıca, bitkinin morfolojik ve moleküler tanımlama yöntemleri, adli vakalarda doğru tür teşhisi için gereklidir. Ephedra alkaloidleri toplamda 29 farklı bileşen içerie ve bunların toksik etkilerinin çeşitlilik göstermektedir. *Ephedra distachya*'nın zehirlenme vakalarında, toksik etkilerin mekanizması tam olarak aydınlatılamamış olsa da, özellikle psödoefedrin ve polisakkaritlerin analjezik etkilerinin olduğu, ancak bu etkinin mekanizmasının henüz netleşmediği ifade edilmektedir. Bununla birlikte, bitkinin antimikrobiyal özellikleri de bulunmakta ve bu durum, bazı vakalarda cilt lezyonlarının iyileşmesini destekleyebilmektedir (Tang vd., 2023). Ancak, bu tür faydalı etkiler, yüksek doz alımında ortaya çıkan toksik etkilerle gölgelenmektedir. *Ephedra distachya* zehirlenmelerinin adli bilimler açısından önemi, hem bireysel zehirlenme vakalarının değerlendirilmesinde hem de yasa dışı üretim ve ticaretin tespitinde ortaya çıkar. Özellikle, bitkinin içerdiği alkaloidlerin kolayca elde edilebilmesi ve sentetik uyuşturucu üretiminde kullanılabilmesi, adli olaylarda bu tür vakaların sıklığını artırmaktadır (MUTLU vd., 2020). Bu nedenle, zehirlenme vakalarının tanımlanmasında hem klinik hem de analitik yaklaşımların bir arada kullanılması gerekmektedir.

2.6.3. Zehirlenmelerde Adli Değerlendirme

Zehirlenmelerde adli değerlendirme, özellikle *Ephedra distachya* gibi toksik potansiyeli olan bitkilerle ilişkili vakalarda, multidisipliner bir yaklaşım gerektirir. Bu tür bitkilerle meydana gelen zehirlenmelerde, toksik maddenin vücuda alınma şekli, miktarı, zamanlaması ve bireysel metabolik farklılıklar gibi birçok parametre değerlendirilmelidir. Ephedra türlerinin içerdiği alkaloidlerin (örneğin efedrin ve psödoefedrin) toksik etkileri, farmakokinetik özellikleri ve vücutta izlenebilirlikleri, adli toksikoloji açısından büyük önem taşır (Scientific Assessment of Ephedra Species (Ephedra spp.), 2010). Adli olaylarda, zehirlenmenin tespitinde kullanılan laboratuvar yöntemlerinin hassasiyeti ve özgüllüğü kritik rol oynar. Kromatografi gibi ileri teknikler, ilaç veya metabolitlerin tespitinde yüksek duyarlılık ve özgüllük sunar; ancak bu yöntemler iyi eğitimli personel ve gelişmiş cihazlar gerektirir, sonuçların elde edilmesi ise genellikle birkaç saat sürer. Bu nedenle, ilk aşamada genellikle tercih edilmezler. Bununla birlikte, hızlı tarama testlerinin sonuçları, zehirli madde alımını kesin olarak doğrulamaz veya dışlayamaz. Negatif bir sonuç, örneğin numunenin alınma zamanlaması nedeniyle, eşik sınırının altındaki bir konsantrasyonu yansıtabilir. Bu nedenle, ileri tekniklerle doğrulama gereklidir (Tortum, 2019). *Ephedra distachya* zehirlenmelerinde, efedrin ve türevlerinin vücuttaki dağılımı ve eliminasyonu adli değerlendirmede dikkate alınmalıdır. Efedrin, vücutta büyük oranda değişmeden idrarla atılır ve yarı ömrü yaklaşık 7 saattir. Kan ve idrar analizlerinde efedrin düzeylerinin belirlenmesi, zehirlenmenin şiddeti ve zamanlaması hakkında bilgi verebilir. Kan düzeylerinin, bazı ölümcül vakalarda bildirilen aralıklarda olduğu gözlenmiştir. İdrarda tespit edilen efedrin miktarı, genellikle orijinal kan düzeyinin yaklaşık %5'ini yansıtır (*Safety Assessment and Determination of a Tolerable Upper Limit for Ephedra*, 2000). Bu tür farmakokinetik veriler, ölüm nedeni araştırmalarında ve adli raporlamada önemli bir referans noktası oluşturur. Ephedra ürünlerinin içerdiği alkaloid miktarları, ürünler ve partiler arasında büyük farklılıklar gösterebilir. Bu değişkenlik, adli değerlendirmede dozun ve toksik etkinin belirlenmesini güçleştirir. Ürünlerdeki toplam alkaloid miktarı 0 ile 26 mg arasında değişebilir ve bildirilen miktarlarla gerçek içerik arasında önemli farklar olabilir (Scientific Assessment of Ephedra Species (Ephedra spp.), 2010). Bu nedenle, zehirlenme vakalarında kullanılan ürünün analizi ve içerik doğrulaması adli süreçte gereklidir.

Zehirlenme mekanizmasının anlaşılması, adli değerlendirmede olayın aydınlatılması açısından önemlidir. Ephedra alkaloidleri, merkezi sinir sistemi ve kardiyovasküler sistem üzerinde uyarıcı etki gösterir. Yüksek dozlarda ise hipertansiyon, taşikardi, hipertermi ve nörolojik komplikasyonlar gibi ciddi toksik etkiler ortaya çıkabilir. Hayvan deneylerinde, efedrinin sistemik dozları ve beyin ekstrasellüler düzeyleri ile dopamin artışı ve hipertermi gibi etkiler arasında ilişki gösterilmiştir (*Safety Assessment and Determination of a Tolerable Upper Limit for Ephedra,* 2000) (Woolf vd., 2005).Bu bulgular, insanlarda da benzer toksik etkilerin ortaya çıkabileceğini düşündürmektedir. Adli değerlendirme sürecinde, toksikolojik analizlerin yanı sıra, olayın tıbbi ve kriminalistik yönleri de dikkate alınmalıdır. Zehirlenme şüphesiyle başvuran olgularda, klinik bulgular, laboratuvar sonuçları ve olayın öyküsü birlikte değerlendirilmelidir. Ayrıca, adli raporlamada etik kurallara uyulması ve ilgili mevzuatın gerekliliklerinin yerine getirilmesi zorunludur. *Ephedra distachya* ve benzeri toksik bitkilerle ilişkili zehirlenme vakalarında, adli bilimlerin sunduğu moleküler ve analitik yöntemler, olayın aydınlatılmasında ve adli süreçlerin doğru yürütülmesinde vazgeçilmezdir. DNA safiyet tayini ve moleküler analizler, bitki materyalinin doğru tanımlanmasında ve olayın rekonstrüksiyonunda yardımcı olabilir (MUTLU vd., 2020). Bu tür multidisipliner yaklaşımlar, zehirlenme vakalarının adli açıdan güvenilir şekilde değerlendirilmesini sağlar.

2.7.Tür Tayini ve Yöntemleri

2.7.1. Bitkilerde *ITS* Bölgesi ve Önemi

Bitkilerde *ITS* bölgesi, tür tayini ve filogenetik analizlerde sıklıkla kullanılan nükleer ribozomal DNA bölgelerinden biridir. *ITS* bölgesi, 18S, 5.8S ve 28S ribozomal RNA genleri arasında yer alan ve yüksek oranda değişkenlik gösteren bir dizidir. Bu değişkenlik, yakın akraba türlerin birbirinden ayrılmasında ve filogenetik ilişkilerin ortaya konmasında önemli avantajlar sunar. Jinling Huang et al. tarafından yapılan çalışmalarda, *ITS-1* dizilerinin özellikle Ephedra cinsinin Kuzey Amerika türlerinde türler arası ayrımı desteklediği gösterilmiştir. Aynı şekilde, *Ephedra distachya* gibi türlerin filogenetik konumlarının belirlenmesinde de *ITS* bölgelerinin kullanımı, morfolojik

karakterlerin yetersiz kaldığı durumlarda tamamlayıcı bir rol üstlenmektedir (Huang vd., 2005). *ITS* bölgesinin önemi, türler arası genetik farklılıkların yüksek olması ve evrimsel süreçte hızlı değişim göstermesiyle ilişkilidir. Bu özellik, özellikle morfolojik olarak benzer veya yakın akraba olan bitki türlerinin ayırt edilmesinde *ITS* dizilerinin tercih edilmesini sağlar. Ephedra türlerinde yapılan moleküler analizlerde, *ITS* bölgelerinin kullanımı ile elde edilen filogenetik ağaçlar, morfolojik karakterlere dayalı sınıflandırmalarla karşılaştırıldığında daha yüksek çözünürlük sunabilmektedir. Ayrıca, *ITS* dizilerinin nükleer genomda çok kopyalı olması, PCR tabanlı yöntemlerle kolayca çoğaltılmasını ve analiz edilmesini mümkün kılar (Huang vd., 2005). Filogenetik analizlerde *ITS* dizilerinin kullanımı, sadece tür tayiniyle sınırlı kalmaz; aynı zamanda türler arası evrimsel ilişkilerin ve genetik çeşitliliğin ortaya konmasında da etkilidir. Örneğin, Ephedra cinsinde yapılan çalışmalar, *ITS* dizilerinin bazı türlerin monofiletik gruplar oluşturduğunu, bazılarının ise beklenmedik şekilde farklı kladlarda yer aldığını göstermiştir (Thureborn, 2014). Bu durum, *ITS* bölgesinin filogenetik analizlerde hem avantajlarını hem de dikkat edilmesi gereken sınırlılıklarını ortaya koyar. *ITS* dizisinin tür tayininde kullanılmasının bir diğer avantajı, çevresel örneklerden veya işlenmiş bitkisel materyallerden DNA elde edilmesi durumunda da güvenilir sonuçlar vermesidir. Özellikle adli bilimlerde, zehirli bitki vakalarında türün doğru tespiti için *ITS* dizilerinin analizi, morfolojik tanımlamanın mümkün olmadığı örneklerde kritik öneme sahiptir (Thureborn, 2014) (Huang vd., 2005). Bu sayede, adli olaylarda bitki kaynaklı zehirlenmelerin kaynağına ulaşmak ve olayın aydınlatılmasına katkı sağlamak mümkün olmaktadır. Sonuç olarak, *ITS* dizileri bitkilerde tür tayini ve filogenetik analizler için vazgeçilmez bir moleküler belirteç olarak öne çıkmaktadır. *Ephedra distachya* ve benzeri türlerde yapılan çalışmalar, *ITS* dizilerinin hem türler arası ayrımı hem de evrimsel ilişkilerin çözülmesinde yüksek derecede güvenilirlik sunduğunu göstermektedir.

2.7.2. Moleküler Analizler ve BLAST

Moleküler analizler, tür tayininde yüksek doğruluk ve güvenilirlik sağlayan modern biyolojik yöntemler arasında yer almaktadır. Özellikle bitkilerin genetik materyalinin incelenmesi, morfolojik benzerliklerin ötesine geçerek, türler arasındaki filogenetik ilişkilerin ve genetik farklılıkların ortaya konulmasına olanak tanır. Bu analizlerde

sıklıkla kullanılan gen bölgeleri arasında *matK, ITS* ve *ETS* gibi nükleer ve kloroplast DNA bölgeleri bulunmaktadır. Thureborn et al. tarafından yapılan çalışmada, Ephedra türlerinin moleküler karakterizasyonu için *matK, ITS* ve *ETS* bölgelerinden elde edilen diziler kullanılmıştır. Bu tür gen bölgeleri, türler arası ayrımı güçlendiren ve filogenetik analizlerde yüksek çözünürlük sunan moleküler belirteçlerdir. Moleküler analizlerin temel adımlarından biri, hedef DNA bölgesinin polimeraz PCR ile çoğaltılması ve ardından dizilenmesidir. Elde edilen DNA dizileri, tür tayini ve filogenetik analizler için referans veri tabanlarıyla karşılaştırılır. Bu noktada BLAST algoritması, biyoinformatik analizlerde yaygın olarak kullanılan bir araçtır. BLAST, sorgu dizisini veri tabanındaki dizilerle hizalayarak benzerlik oranlarını hesaplar ve en yakın eşleşmeleri listeler. Böylece, elde edilen dizinin hangi türe ait olduğu veya hangi türlerle yakın akraba olduğu belirlenebilir (Thureborn, 2014). Ephedra cinsinin filogenetik ve moleküler analizlerinde, BLAST gibi araçlar sayesinde türler arası genetik farklılıklar ve benzerlikler detaylı biçimde ortaya konulabilmektedir. Özellikle *Ephedra distachya* gibi morfolojik olarak benzer türlerin ayırt edilmesinde, moleküler veriler kritik rol oynar. Ickert-Bond ve Wojciechowski tarafından ortaya konulan filogenetik yaklaşımlar, Ephedra türlerinin kökeni ve evrimi hakkında önemli bilgiler sunarken, moleküler verilerin bu analizlerdeki önemini vurgulamaktadır. BLAST analizleri, türler arası genetik mesafelerin hesaplanmasında ve filogenetik ağaçların oluşturulmasında temel bir araç olarak kullanılmaktadır (Ickert-Bond & Wojciechowski, 2004). Ayrıca, moleküler analizlerin adli bilimlerdeki uygulamaları da giderek artmaktadır. Zehirli bitki vakalarında, özellikle toksik etkili bileşenlerin kaynağının belirlenmesi ve olay yerinden elde edilen bitki materyalinin tür tayini için moleküler yöntemler büyük avantaj sağlar. BLAST gibi araçlar, adli olaylarda elde edilen DNA dizilerinin hızlı ve güvenilir şekilde tanımlanmasına olanak tanır. Bu sayede, zehirlenme vakalarında bitkinin doğru şekilde teşhis edilmesi ve adli süreçte bilimsel delil olarak kullanılması mümkün olur (Ickert-Bond & Wojciechowski, 2004; Thureborn, 2014). Ephedra türlerinin moleküler düzeyde incelenmesi, sadece tür tayiniyle sınırlı kalmaz; aynı zamanda türler arası evrimsel ilişkilerin ve coğrafi yayılışın anlaşılmasına da katkı sağlar. Ephedra cinsinin kökeni ve yayılışı üzerine yapılan moleküler analizler, türlerin tarihsel dağılımı ve adaptasyon süreçleri hakkında da bilgi sunmaktadır. Bu tür analizlerde BLAST, yeni elde edilen dizilerin mevcut veri tabanlarıyla karşılaştırılmasında ve filogenetik pozisyonunun

belirlenmesinde vazgeçilmez bir araçtır. Sonuç olarak, moleküler analizler ve BLAST algoritması, bitki türlerinin doğru ve hızlı şekilde tanımlanmasında, filogenetik ilişkilerin ortaya konulmasında ve adli bilimlerde zehirli bitki vakalarının çözümünde önemli bir yer tutmaktadır. Yapılan çalışmalar, bu yöntemlerin hem temel bilimlerde hem de uygulamalı alanlarda etkinliğini açıkça göstermektedir (Ickert-Bond & Wojciechowski, 2004; Thureborn, 2014).

2.7.3. DNA İzolasyonu ve PCR Uygulamaları

DNA izolasyonu ve PCR uygulamaları, tür tayini ve bitkisel materyalin genetik analizinde temel adımları oluşturur. Bitkilerden DNA izolasyonu, genellikle hücre duvarının parçalanması, proteinlerin ve diğer hücresel bileşenlerin uzaklaştırılması ve saf DNA'nın elde edilmesi süreçlerini içerir. Bu aşamada, örneklerin kontaminasyondan korunması ve yüksek kalitede DNA elde edilmesi, sonraki moleküler analizlerin başarısı için kritik öneme sahiptir (Doyle & Hortorium, 1991). DNA izolasyonunda kullanılan yöntemler, bitkinin dokusuna ve içerdiği sekonder metabolitlere göre optimize edilmelidir. Özellikle Ephedra gibi sekonder metabolitlerce zengin türlerde, polifenoller ve polisakkaritler DNA izolasyonunu zorlaştırabilir. Bu nedenle, izolasyon protokollerinde genellikle CTAB (setiltrimetilamonyum bromür) tamponları ve çeşitli saflaştırma adımları tercih edilir (Chen vd., 2019). İzole edilen DNA'nın kalitesi ve miktarı, downstream uygulamalar için değerlendirilir. Genellikle agaroz jel elektroforezi ile DNA'nın bütünlüğü ve saflığı kontrol edilir. Etidyum bromür gibi interkalant ajanlar, UV ışığı altında DNA'nın görselleştirilmesini sağlar. Bu aşamada, DNA'nın bozulmamış ve RNA ile proteinlerden arındırılmış olması gereklidir (Doyle & Hortorium, 1991). DNA'nın uygun konsantrasyona getirilmesi, PCR gibi amplifikasyon tekniklerinde başarıyı artırır. PCR, belirli DNA bölgelerinin çoğaltılmasını sağlayan bir tekniktir. Tür tayini amacıyla, genellikle *ITS, matK, rbcL* gibi nükleer ve kloroplast gen bölgeleri hedeflenir (Chen vd., 2019; Huang vd., 2005). PCR uygulamalarında, özgül primerler kullanılarak hedef bölge amplifiye edilir. PCR'ın başarısı, primer tasarımına, DNA'nın kalitesine ve reaksiyon koşullarına bağlıdır. Amplifikasyon sonrası ürünler, genellikle agaroz jel elektroforezi ile doğrulanır ve bantların varlığı, amplifikasyonun başarılı olduğunu gösterir (Doyle & Hortorium, 1991). Ephedra türlerinin filogenetik

analizlerinde, PCR ile çoğaltılan *ITS-1, matK* ve *rbcL* bölgeleri sıklıkla kullanılmıştır. PCR ile elde edilen ürünlerin sekanslanması, türler arası genetik farklılıkların belirlenmesinde önemli rol oynar. PCR ürünlerinin doğrulanması ve daha ileri analizler için Southern blotting gibi yöntemler de kullanılabilir. Bu teknik, DNA fragmentlerinin membrana transferi ve spesifik problarla hibridizasyonunu içerir. Özellikle RFLP analizlerinde, PCR sonrası elde edilen DNA fragmentlerinin tanımlanmasında Southern blotting kritik bir aşamadır (Doyle & Hortorium, 1991). *Ephedra distachya* gibi türlerin ayırt edilmesinde, PCR tabanlı moleküler belirteçler, morfolojik benzerliklerin ötesinde kesin tür tayini sağlar. *ITS* gibi gen bölgelerinin sekanslanması, filogenetik ağaçların oluşturulmasına ve türler arası ilişkilerin ortaya konmasına olanak tanır.

2.7.4. Bitki Türlerinin Moleküler Tanısında Güncel Yaklaşımlar

Bitki türlerinin moleküler tanısında güncel yaklaşımlar, klasik morfolojik yöntemlerin ötesine geçerek, genetik materyalin doğrudan analizine dayalı tekniklerin kullanımını içermektedir. Bu yaklaşımlar, özellikle morfolojik olarak benzer veya taksonomik olarak karmaşık grupların ayırt edilmesinde yüksek doğruluk ve güvenilirlik sağlamaktadır. Moleküler tanı yöntemleri, bitkilerin filogenetik ilişkilerinin aydınlatılması, tür içi varyasyonların belirlenmesi ve adli bilimlerde tür tespitinin hassasiyetinin artırılması açısından büyük önem taşır (Kakiuchi vd., 2011). Günümüzde en yaygın kullanılan moleküler tanı tekniklerinden biri, ribozomal DNA (rDNA) bölgelerinin, özellikle de *ITS* dizilerinin analizidir. Kakiuchi ve diğerleri, *Ephedra distachya* ve yakın akrabalarının *ITS1* dizilerinde yüksek varyasyon tespit etmiş ve bu varyasyonun türlerin ayrımında önemli bir rol oynadığını göstermiştir. Aynı şekilde, farklı coğrafi bölgelerden toplanan örneklerin *ITS* dizilerinin karşılaştırılması, türlerin evrimsel ilişkilerinin ve genetik çeşitliliğinin anlaşılmasına katkı sağlamaktadır (Kakiuchi vd., 2011). Moleküler tanı süreçlerinde, çoklu dizi hizalaması gibi biyoinformatik araçlar da yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu yöntemler, farklı türlerden elde edilen DNA dizilerinin karşılaştırılmasını ve filogenetik ağaçların oluşturulmasını mümkün kılar. ClustalX gibi yazılımlar, dizilerin hizalanmasında ve filogenetik analizlerin güvenilirliğinin artırılmasında önemli rol oynamaktadır. Bu tür analizler, türlerin evrimsel geçmişinin ve taksonomik konumlarının daha doğru bir şekilde belirlenmesini sağlar (Ickert-Bond &

Wojciechowski, 2004). Moleküler tanı tekniklerinin bir diğer avantajı, morfolojik olarak ayırt edilemeyen veya çevresel koşullara bağlı olarak fenotipik değişkenlik gösteren türlerin güvenilir şekilde tanımlanabilmesidir. Özellikle adli bilimlerde, bitki materyalinin bozulmuş veya parçalanmış olduğu durumlarda, DNA tabanlı yöntemler tür tayininde kritik bir rol oynar. Bu bağlamda, *Ephedra distachya* gibi tıbbi ve toksik öneme sahip bitkilerin doğru tanımlanması, hem halk sağlığı hem de adli süreçler açısından büyük önem taşır (Kakiuchi vd., 2011). Ayrıca, moleküler tanı yöntemleri sadece tür tayiniyle sınırlı kalmayıp, aynı zamanda popülasyon genetiği, genetik çeşitlilik ve evrimsel biyoloji çalışmalarında da kullanılmaktadır. Bu yöntemler sayesinde, bitki popülasyonlarının genetik yapısı, göç yolları ve adaptasyon mekanizmaları hakkında detaylı bilgiler elde edilebilmektedir. Modern moleküler tekniklerin sağladığı yüksek çözünürlük, türler arası ve tür içi ilişkilerin daha hassas bir şekilde ortaya konmasına olanak tanır . Sonuç olarak, bitki türlerinin moleküler tanısında güncel yaklaşımlar, klasik yöntemlerin ötesinde, genetik düzeyde kesin ve hızlı tanımlama imkânı sunmakta; filogenetik, taksonomik ve adli uygulamalarda güvenilirliği artırmaktadır. Bu gelişmeler, hem temel biyolojik araştırmalarda hem de uygulamalı alanlarda, özellikle de zehirli bitkilerin tespitinde ve adli olaylarda, bilimsel doğruluğun ve güvenliğin sağlanmasına önemli katkılar sunmaktadır.

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Bitki Örnekleri

Ephedra distachya örnekleri, 5 Mayıs 2023 tarihinde Prof. Dr. Özer YILMAZ danışmanlığında Bursa Gölyazı çevresinden, yeşil olan gövdeler makas yardımıyla kesilerek toplanmıştır. Örnekler temiz bir poşete konulup laboratuvarda herbaryum formunda saklanmaktadır.

3.1.2. Sarf Malzemeler

Çizelge 3.1.2.1. Kullanılan sarf malzemeler listesi

Sarf Malzemeler	Temin Edildiği Yer
Dnase&Rnase içermeyen filtreli 10µl'lik pipet uçları	Corning/ABD
Dnase&Rnase içermeyen filtreli 100µl'lik pipet uçları	Corning/ABD
Dnase&Rnase içermeyen filtreli 1000µl'lik pipet uçları	Corning/ABD
Dnase&Rnase içermeyen santrifüj tüpleri (15 ml)	Thermo Scientific/ABD
Dnase&Rnase içermeyen santrifüj tüpleri (50 ml)	Thermo Scientific/ABD
Dnase&Rnase içermeyen eppendorf tüpleri (0,5 ml)	SSIbio/ABD
Dnase&Rnase içermeyen eppendorf tüpleri (1,5 ml)	SSIbio/ABD
Serolojik pipet (10 ml)	ThermoFisher/ABD
Serolojik pipet (25 ml)	ThermoFisher/ABD
Sıvı Azot	Asalgaz/Türkiye
Mezür (100 ml-1000 ml)	Superior Marienfeld/Almanya
Parafilm (50 mm x 75 m)	3M/Türkiye

3.1.3. Kimyasal Malzemeler

Çizelge 3.1.3.1. Kullanılan kimyasal malzemeler listesi

Kimyasal Maddeler	Temin Edildiği Firma/Yer
HCl çözeltisi (>%37)	Sigma/ABD
NaCl	Sigma/ABD
Kloroform	Merck/Almanya
İzoamil Alkol	Merck/Almanya
Ethanol (%96-100)	Merck/Almanya
β-Merkaptoetanol	Sigma/ABD
DNA Ladder (1 kb/N3232S)	Neb/ABD
DNA Ladder (100 bp/N3231S)	Neb/ABD
Yükleme boyası (6X/G108-R)	Abm/Kanada
Yükleme boyası (6X/7654)	Sigma/ABD
Etidyum Bromür (EtBr/111608)	BioShop/Kanada
Tris bazı	Sigma/ABD
Borik Asit	BioShop/Kanada
Etilen Diamin Tetraasetik Asit (EDTA)	BioShop/Kanada
Agar-Agar	Sigma/ABD
Pepsin	Merck/Almanya

3.1.4. Cihazlar

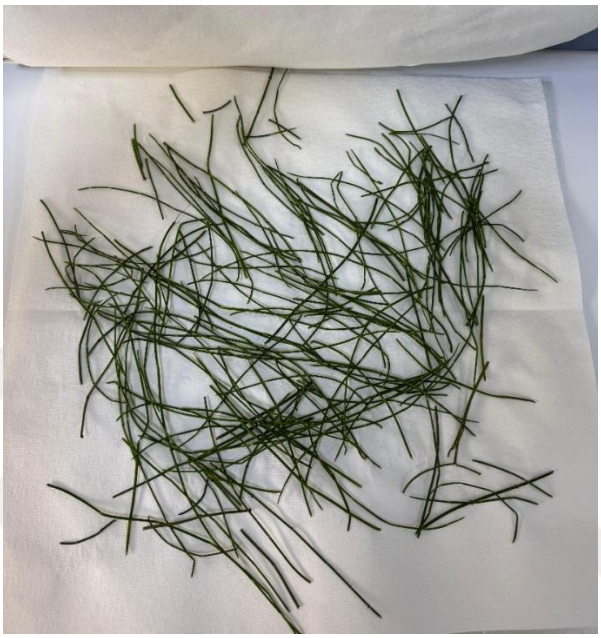
Çizelge 3.1.4.1. Kullanılan cihazlar listesi

Cihazlar	Temin Edildiği Yer
Yatay elektroforez sistemi (NanoPAC-300P)	Cleaver Science/UK
Steril Kabin (Kimyasal Hazırlama)	Esco/Singapur
0,5-10µl'lik pipet (Biohit)	Krackeler Scientific/New York
10-100µl'lik pipet (Biohit)	Krackeler Scientific/New York
100-1000µl'lik pipet (Biohit)	Krackeler Scientific/New York
Saf su cihazı (Direct-Q 3 UV)	Merck/Almanya
Kuru Blok Termostat (WiseTherm HB-96)	Daihan Scientific/Güney Kore
UV-Görüntüleme Cihazı (Syngene GVM20)	Gemini/Hollanda
Hassas terazi (Precisa-XB3200C)	Labor/Türkiye
(+4) / (-20) °C Buzdolabı	Vestel/Türkiye
Mikrospin-Vortex cihazı (WiseMix VM-10)	Lab.Tec/Almanya
Manyetik mini-karıştırıcı (Isotex SH-4)	İldam/Türkiye
Mikrosantrifüj (Gyrozen 1524)	Art Laborteknik/Türkiye
Buharlı sterilizatör/Otoklav	Nüve/Türkiye
Nanodrop (NANODROP 2000)	Thermo Scientific/ABD
pHmetre (AD1000)	Adva/Macaristan
Soğutmalı santrifüj (NF 400R)	Nüve/Türkiye
Pcr tüpleri	Nüve/Türkiye
Pcr cihazı (Applied Biosystems Step One Plus v2.3)	Thermo Scientific/ABD
Falkon Tüp Karıştırıcı (Tube Revolver Rotator)	Thermo Scientific/ABD

3.2.Yöntem

3.2.1. *Ephedra distachya* örneklerinin hazırlanması

Gölyazı ve çevresinden toplanan *Ephedra distachya* örnekleri toz ve kalıntılardan arındırılıp steril hale getirilmesi amacıyla önce alkolle daha sonrasında saf su ile yıkanıp kurutma kağıdı üzerinde 1 gece kurutmaya bırakıldı. (Şekil 3.2.1.1.)



Şekil 3.2.1.1. *Ephedra distachya* örneklerinin steril hale getirilmesi

3.2.2. *Ephedra distachya* örneklerinden çay yapımı

Ephedra distachya zehirlenmelerinin büyük bir çoğunluğunda çay formuyla zehirlenmenin gerçekleştiği gözlemlenmiştir. Bu sebeple deneyde *Ephedra distachya*'nın çay formunun kullanılmasına karar verilmiştir. 250 mL 100°C'de hazırlanan saf suyun içerisine 5 g olarak tartılan ve küçük parçalara ayrılmış kuru bitki eklenmiştir. Hazırlanan çay örneği 30 dk demlenmeye bırakılmıştır.



Şekil 3.2.2.1. 250 mL 100°C'de 5 mg kuru örnekle hazırlanan çay örneği

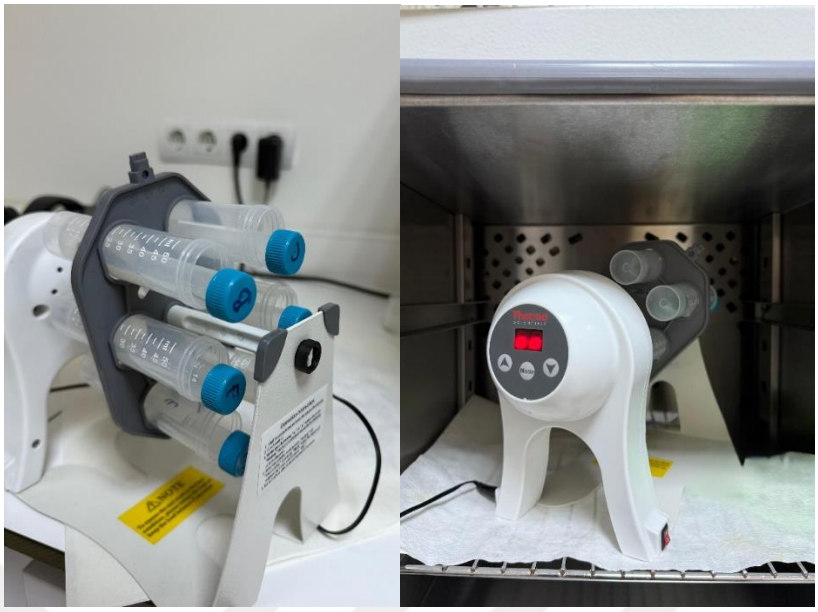
3.2.3. *Ephedra distachya* örneklerinin sindirim sıvılarıyla muamelesi

Ephedra distachya bitkisiyle hazırlanan çay örneğinden 0,6 g bitki parçası tartılarak 6 ayrı tüpe eşit şekilde dağıtıldı. Bu tüplerden 3'ü kontrol grubu (A, B, C), 3'ü ise deney grubu (D, E, F) olarak belirlendi. Kontrol grubundaki tüplere 600 µL saf su, deney grubundaki tüplere ise 600 µL tükürük örneği eklendi. Tüm tüpler oda sıcaklığında 20 dakika bekletildi. (Şekil 3.2.3.1.)

Çizelge 3.2.3.1. *E. distachya* çay örneğinin su ve tükürük eklenerek hazırlandığı kontrol ve deney tüpleri

A	B	C	D	E	F
Örnek + Nükleaz İçermeyen Su (1 Saat)	Örnek + Nükleaz İçermeyen Su (2 Saat)	Örnek + Nükleaz İçermeyen Su (3 Saat)	Örnek + Tükürük Sıvısı + Pepsin Çözeltisi (1 Saat)	Örnek + Tükürük Sıvısı + Pepsin Çözeltisi (2 Saat)	Örnek + Tükürük Sıvısı + Pepsin Çözeltisi (3 Saat)

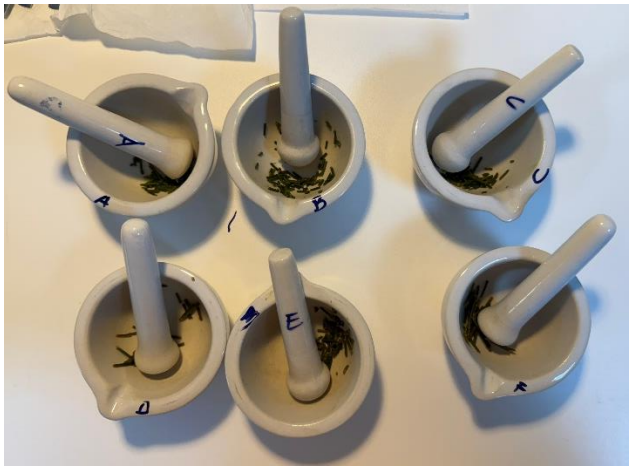
Gerçek bir vakadan örnek alınamadığı için yapraklar 2 ml tükürük sıvısı (amilaz enzim (EC 3.2.1.1) aktivitesi için) ve %1 (v/v)'lik HCl (pepsin enzim (EC 3.4.23.1) aktivitesi için) çözeltilerine maruz bırakılarak fizyolojik ortam koşulları simüle edilmiştir.



Şekil 3.2.3.1. Bitki örneklerinin inkübasyon süreci

3.2.4. DNA İzolasyonu

Moleküler analizlerin yapılabilmesi için gerekli olan DNA izolasyonuna yönelik olarak hazırlanan bitki ekstratları, önceden otoklavlanarak sterilize edilmiş havanlara alındı. (Şekil 3.2.4.1.) Ardından havanlara sıvı azot eklendi. Steril havan tokmağı kullanılarak ezildi ve fiziksel parçalanma sağlandı.



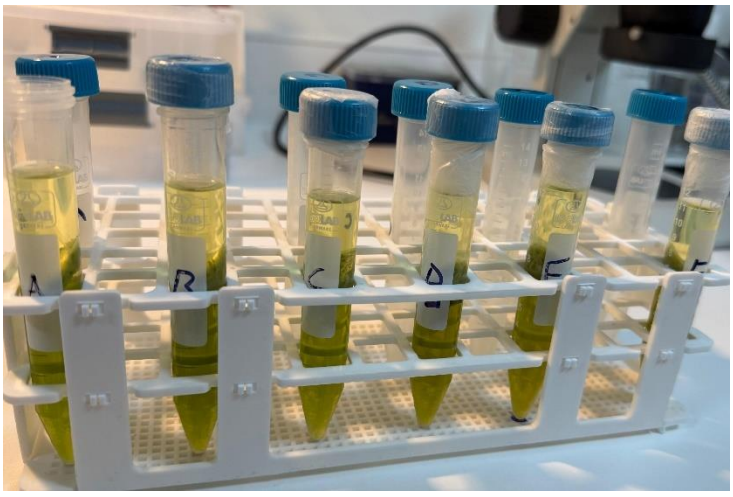
Şekil 3.2.4.1. Bitki parçalarının havanda görüntüsü

Fiziksel parçalanmanın ardından, her bir havana 100 µL β-merkaptoetanol ve 5 mL CTAB tamponu eklendi. Ardından 50 mg PVP-40 ilave edildi. Karışım, steril havan tokmağıyla hafifçe ezilerek homojenize edildi.

Elde edilen çözelti, 15 mL'lik Falcon tüplerine aktarıldı ve 60 °C'de 25 dakika boyunca etüvde inkübasyona bırakıldı. İnkübasyonun ardından tüpler, buz içeren soğuk su banyosu kullanılarak oda sıcaklığına getirildi. Her bir tüpe 6 mL kloroform:izoamil alkol (24:1) karışımı eklendi ve çözelti 20–25 kez manuel olarak çalkalanarak karıştırıldı.

Falcon tüplerin ağızları parafilm ile kapatıldı ve 6000 rpm'de 15 dakika süreyle santrifüj edildi.

Santrifüj işlemi sonucunda üç faz oluştu: üst faz (sulu faz, DNA içeren kısım), orta faz (interfaz, protein kalıntıları) ve alt faz (organik faz). (Şekil 3.2.4.2.) Üst faz, pipet yardımıyla dikkatlice alınarak yeni ve steril 15 mL'lik Falcon tüplerine aktarıldı. A, B, D ve E numaralı tüplerden 4 mL; C ve F numaralı tüplerden ise 3,5 mL üst faz transfer edildi.



Şekil 3.2.4.2. Santrifüj sonucunda oluşan 3 faz

Her tüpe, 5 M NaCl çözeltisinden tüp hacminin yarısı oranında eklendi; A, B, D ve E tüplerine 2 mL, C ve F tüplerine ise 1,75 mL NaCl çözeltisi ilave edildi.

NaCl çözeltisi, DNA'nın negatif yüklerini nötralize ederek moleküllerin birbirine yaklaşmasını sağlar; bu sayece DNA'nın çökelmesi kolaylaşır ve çözeltideki istenmeyen bileşenlerin uzaklaştırılmasına katkıda bulunur (Heikrujam vd., 2020).

Her tüpe, -20 °C'de saklanan %96'lık etanol çözeltisinden, örnek hacminin iki katı oranında eklendi; A, B, D ve E tüplerine 8 mL, C ve F tüplerine ise 7 mL etanol ilave edildi. Etanol, çözeltinin kutuplaşmasını azaltarak DNA'nın negatif yüklerini nötralize eder ve moleküllerin birbirine yaklaşmasını sağlayarak DNA'nın çökelmesini kolaylaştırır ve çözeltideki istenmeyen bileşenlerin uzaklaştırılmasına yardımcı olur (Green & Sambrook, 2016).

Çökelmenin tamamlanabilmesi ve DNA iplikçiklerinin belirginleşmesi amacıyla tüpler, yaklaşık 20 dakika süreyle +4 °C'de inkübasyona bırakıldı.

Tüpler önce 3000 rpm'de 3 dakika santrifüj edildi, ardından 8000 rpm'de 5 dakika daha döndürüldü. Bu iki aşamalı santrifüj, DNA'nın tam çökelmesini ve süpernatanttan ayrılmasını sağlamak amacıyla uygulanmıştır. (Şekil 3.2.4.3.)



Şekil 3.2.4.3. Santrifüj cihazına yerleştirilen Falcon tüplerinin görüntüsü

Süpernatant dikkatlice uzaklaştırıldıktan sonra, +4 °C'de saklanan %76'lık etanol çözeltisinden 100 µL eklendi ve DNA pelletine zarar vermeden yıkama işlemi gerçekleştirildi. Düşük sıcaklıkta yapılan bu yıkama ile, tuz ve diğer kirleticilerin pelletten uzaklaştırılmasını hedeflenmektedir, böylece DNA daha saf bir hale gelir (Doyle & Hortorium, 1991).

DNA'nın tuz ve diğer kirleticilerden daha etkin şekilde arındırılması amacıyla etanol yıkama işlemi iki kez uygulandı. Sambrook ve arkadaşlarının çalışmasında da belirtildiği üzere, çoklu etanol yıkama adımları DNA pelletinde kalabilecek tuz, protein ve diğer kontaminantların uzaklaştırılmasında yaygın olarak kullanılmaktadır. Tek yıkama genellikle yetersiz kalabildiğinden, bu çalışmada ilk yıkama Falcon tüplerinde, ikinci yıkama ise pelletin transfer edildiği steril Eppendorf tüplerinde gerçekleştirildi. Her iki yıkama adımında da +4 °C'de muhafaza edilen %76'lık etanol kullanıldı (Green & Sambrook, 2016).

Eppendorf tüplerinde gerçekleştirilen yıkama işleminden sonra kalan fazla alkol dikkatlice uzaklaştırıldı. Tüplerin ağızları açık bırakılarak, 37 °C'de alkolün tamamen uçması ve tüplerin kuru kalması sağlandı.

A, B, C, D, E olarak harflendirilmiş Eppendorf tüplerindeki DNA pelletlerinin üzerine 400 µL, F olarak harflendirilmiş Eppendorf tüpüne ise 450 µL TE tamponu eklendi ve örnekler oda sıcaklığında bir gece inkübasyona bırakıldı. Eklenen TE tamponu miktarı, gözle görülen DNA iplikçiklerinin yoğunluğuna göre ayarlandı.

3.2.5. NanoDrop Cihazı Aracılığıyla DNA Saflık Tayini

İzole edilen DNA örneklerinin saflık ve konsantrasyonları, spektrofotometrik yöntemle NanoDrop cihazı kullanılarak değerlendirildi. Ölçümler, DNA'nın 260/280 nm ve 260/230 nm absorbans oranları üzerinden kalite kontrolü yapılmasını sağladı. Bu değerler, örneklerin protein ve diğer kontaminantlardan ne derece arındığını göstermektedir.

3.2.6. Agaroz Jel Elektroforezi ile Bitki Kaynaklı DNA Örneklerinin Kalitatif Değerlendirilmesi

Agaroz jel elektroforezi, DNA ve RNA gibi nükleik asitlerin kalitatif olarak değerlendirilmesinde yaygın olarak kullanılan bir yöntemdir. Negatif yüklü nükleik asitler, uygulanan elektriksel alan etkisiyle pozitif uca doğru hareket eder ve molekül ağırlıklarına bağlı olarak jel içerisinde karakteristik bantlar oluşturur. Jel ortamı genellikle %1'lik agarozdan hazırlanır ve içerisine interkalasyon yapabilen boyalar (EtBr veya GelRed) eklenerek UV altında görselleştirme sağlanır. DNA örnekleri, yükleme boyası ile birlikte kuyucuklara yerleştirilir; moleküllerin jel içerisinde ilerlemesi Tris-Borik Asit-EDTA (TBE) tamponu yardımıyla gerçekleşir. Bu sayede bant profilleri üzerinden örneklerin bütünlüğü ve kalitesi değerlendirilebilir (Kavsaoğlu & Mersinkaya, 2019; Sanderson vd., 2014).

Jel ve tampon çözelti hazırlandıktan sonra, her bir kuyucuğa ortalama 100 ng genomik DNA içerecek şekilde DNA örnekleri, 1X yükleme boyası ile karıştırılarak toplam 6 µL hacimde dikkatlice yüklendi. Referans olarak New England Biolabs'a ait 1 kb DNA Ladder (N3232S, 500 µg/mL) kullanıldı. Elektroforez işlemi, jelin boyutlarına bağlı olarak ortalama 80 V (yaklaşık 6 V/cm) gerilim uygulanarak 90 dakika süreyle gerçekleştirildi. Moleküllerin migrasyonu, tampon çözelti içerisindeki iyon akışı ve uygulanan elektriksel alan aracılığıyla sağlandı. Jelin ve DNA örneklerinin voltaj kaynaklı ısıdan zarar görmemesi için yürütme işlemi buz banyosu üzerinde yapıldı. Süre sonunda jel, UV transilluminator cihazı kullanılarak görüntülendi.

3.2.7. PCR ile *ITS* Bölgelerinin çoğaltılması

Filogenetik çalışmalarda tür tayini için ribozomal DNA (rDNA) bölgesinde yer alan Internal Transcribed Spacer (*ITS*) dizileri yaygın şekilde tercih edilmektedir (Baldwin, 1992). *Ephedra distachya* bitkisine ait *ITS* bölgesi *(ITS-1*, 5.8S rRNA geni ve *ITS-2*) çoğaltılması amacıyla, aşağıda dizileri verilen primer seti (Gausterer vd., 2012; Kakiuchi vd., 2011) ticari olarak temin edilmiştir.

Çizelge 3.2.7.1. *ITS* bölgesine ait primerlerin baz dizisi

Primer	Yön	Tm*(°C)	Sekans (5′→3′)
*ITS*_F	Forward	58	AACCTGCGGTAGGATCATTGT
*ITS*_R	Reverse	59	TCGCGACTAACAACGAGTAAAGT

*Tm; Melting Temperature

Standart PCR ile *ITS* bölgesi çoğaltma işlemi, "Applied Biosystems Step One Plus v2.3 (ThernoFisher, USA)" cihazında "Polimeraz, dNTP ve Buffer çözeltilerini içeren (5X) FIREPol® Master Mix (12.5 mM MgCl2)" kullanılarak, mix üretici firmanın protokolü doğrultusunda optimize edilerek aşağıda verilen bileşenler ve döngü koşullarında gerçekleştirildi (Çizelge 3.2.7.2).

Çizelge 3.2.7.2. PCR bileşenleri ve döngü koşulları

PCR Bileşenleri	**Final Konsantrasyon**	**Döngü Koşulları**			
5X FIREPol® Master Mix (12.5 mM $MgCl_2$)	1X	İlk Denatürasyon	95 ^{0}C	5 dakika	x1
Forward Primer (0,1-0,3 µM)	0,3 µM	Denatürasyon	95 ^{0}C	30 saniye	x30
Reverse Primer (0,1-0,3 µM)	0,3 µM	Annealing	55 ^{0}C	30 saniye	
Template (cDNA) (2-200 ng)	10 ng	Uzama (1 dk/kb)	72 ^{0}C	1 dakika	
Nuclease İçermeyen Su	Total hacim 20 µl'ye tamamlanır	Son Uzama	72 ^{0}C	5 dakika	x1

3.2.7.1.Mix Hazırlama

Sekanslama çalışmaları için hazırlanan PCR karışımında, örnek sayısına %10 oranında ek yapılarak köpürme ve pipetleme kaynaklı hacim kayıpları dikkate alındı. Bu doğrultuda, toplam 6 bitki DNA örneği ve 1 negatif kontrol (NK) olmak üzere 7 örnek üzerinden hesaplama yapıldı. Her örnek için 2 tüp hazırlanarak (biri sekanslama, diğeri elektroforez ve arşivleme amaçlı), toplamda 28 reaksiyon (Rxn) oluşturuldu. Tüplerin biri doğrudan −20 °C'de saklanmak üzere ayrıldı; diğer tüpten 6 µL'lik bir hacim

elektroforez analizinde kullanılmak üzere alındı, kalan hacim ise −20 °C'de muhafaza edildi.

Çizelge 3.2.7.1.1. PCR reaksiyon karışımında kullanılan bileşenler ve hacimleri

Bileşen	Final Konsantrasyon	1 Rxn (µL)	30 Rxn (µL)
5X FirePol Master Mix	1X	4	120
Forward Primer (10 µM)	0,3 µM	0,6	18
Reverse Primer (10 µM)	0,3 µM	0,6	18
Nuclease Free Water	15 µL'ye tamamlanır	9,8	294

3.2.7.2. 50 ng Template DNA Hazırlama

NanoDrop analizleri sonucunda DNA konsantrasyonlarının ortalama 500 ng/µL civarında olduğu belirlendi. Bu nedenle, pipetleme sırasında 1 µL'nin altında hacim almak hem teknik hata riskini artırabileceğinden hem de çok kanallı pipetleme yapılacağından, DNA örnekleri ayrı strip tüplerine alınarak son konsantrasyonu 50 ng olacak şekilde seyreltildi.

Çizelge 3.2.7.2.1. Stok DNA'ların PCR için uygun konsantrasyonlara indirgenmesi

Örnek	Kons. (ng/µL)	10 ng'a Seyreltme (%)	Stoktan (µL)	NFW (µL)	Final Kons.
A	457	45,7	1+	44,7	50 ng template için her örnekten 5'er µL alındı
B	740	74	1+	73	
C	190	19	2+	36	
D	635	63,5	1+	62,5	
E	485	48,5	1+	47,5	
F	580	58	1+	57	
NK	-	-	-	40	

3.2.7.3.Striplere Yükleme

Her reaksiyon için 15 µL PCR mix ve 5 µL (%50 ng) seyreltik DNA ayrı tüplerde hazırlandı. Ardından, çok kanallı pipet kullanılarak önce PCR mix, ardından DNA örnekleri PCR tüplerine eklendi.

Temp			1	2	3	4					Mix	Strip Düzeni
A			A	A	A	A					A	
B			B	B	B	B					B	
C			C	C	C	C					C	
D			D	D	D	D					D	
E			E	E	E	E					E	
F			F	F	F	F					F	
NK			NK	NK	NK	NK					NK	

Şekil 3.2.7.3.1. PCR strip şeması

PCR ürünleri, Master Mix boya içerdiği için doğrudan jel kuyucuklarına yaklaşık 6 µL hacminde yüklendi. %2'lik agaroz jel ortamında, 80 V gerilimle yaklaşık 90 dakika boyunca elektroforez işlemi gerçekleştirildi. (Şekil 3.2.7.2.3.1.)

4. BULGULAR

4.1.NanoDrop Analizi Sonuçları

NanoDrop cihazı ile yapılan ölçümlerde, tüm örneklerde DNA konsantrasyonlarının 190–740 ng/µL arasında değiştiği ve 260/280 değerlerinin ~1.90 üzerinde olduğu gözlenmiştir. Bu durum, örneklerde protein kontaminasyonunun düşük olduğunu ve DNA'nın yüksek saflıkta izole edildiğini göstermektedir.

Çizelge 4.1.1. NanoDrop cihazı ile ölçülen DNA saflık ve konsantrasyon değerleri

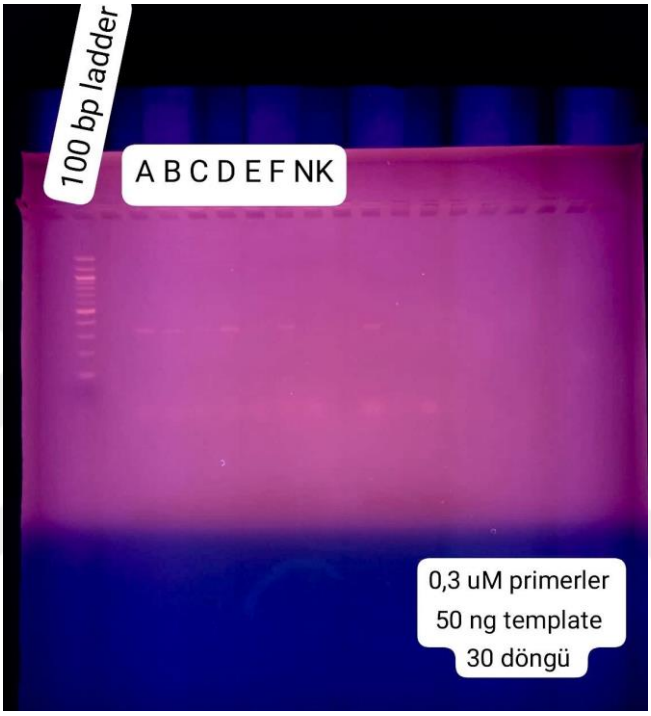
Örnek	Nükleik Asit (ng/µl)	260/280	260/230
A	457	1,94	1,63
B	740	1,93	1,57
C	190	1,90	1,36
D	635	1,93	1,61
E	485	1,92	1,61
F	580	1,90	1,54

4.2.Agaroz Jel Elektroforezi

Agaroz jel elektroforezi sonuçlarında, tüm örneklerde zayıf yoğunlukta da olsa DNA bantlarının varlığı gözlemlenmiştir. Bu bantlar, DNA'nın izole edildiğini göstermekte olup, bazı örneklerde bantların silik oluşu düşük miktarda veya kısmen bozulmuş DNA'nın varlığına işaret etmektedir. Ladder ile yapılan karşılaştırmada bant büyüklükleri beklentilerle örtüşmüş, ancak bant yoğunlukları örnekten örneğe değişkenlik göstermiştir.

4.3. PCR Ürünlerinin Elektroforezi

ITS bölgesine ait primerlerle yapılan PCR uygulamaları sonucunda %2'lik agaroz jelde beklenen büyüklükte amplifikasyon bantları elde edilmiştir. PCR ürünlerinin varlığı ve beklenen büyüklükte bantlarla eşleşmesi, amplifikasyon işleminin başarılı olduğunu ve bitkisel örneklerde *ITS* bölgesinin doğru şekilde çoğaltıldığını göstermektedir.



Şekil 4.3.1. PCR ürünlerinin jel görüntüsü

5. SONUÇ

Bu çalışmada, *Ephedra distachya* bitkisinden başarılı bir şekilde DNA izolasyonu gerçekleştirilmiş ve *ITS* bölgesi hedeflenerek PCR amplifikasyonu uygulanmıştır. CTAB bazlı izolasyon yöntemi, özellikle fenolik bileşikler, polisakkaritler ve diğer sekonder metabolitleri yüksek düzeyde içeren bitki türlerinde yaygın olarak kullanılmakta ve güvenilir sonuçlar vermektedir (Doyle & Hortorium, 1991; Porebski vd., 1997). Ephedra cinsi, yapısında alkaloidler, tanenler ve uçucu bileşenler gibi inhibitör maddeler barındırdığından, klasik izolasyon protokolleriyle elde edilen DNA'nın saflığı ve bütünlüğü genellikle yetersiz kalmaktadır. Deneyin başlangıç aşamalarında çeşitli markalara ait izolasyon kitleri denenmiş, fakat başarı sağlanamamıştır. Bu nedenle, CTAB yöntemi tercih edilerek modifiye protokollerle daha kaliteli izolasyon sağlanmıştır.

NanoDrop analizleri, izole edilen DNA örneklerinin 260/280 oranlarının ideal sınırlar içinde olduğunu (1.90–1.94) ve protein kontaminasyonunun oldukça düşük olduğunu göstermiştir. Ancak 260/230 oranlarının bazı örneklerde optimal seviyenin altında olması (örn. 1.36) potansiyel fenol veya diğer organik kalıntıların varlığına işaret etmektedir. Bu durum, CTAB bazlı izolasyon protokollerinde sıkça gözlemlenen ancak genetik analizleri genellikle etkilemeyen bir durumdur (Wilfinger vd., 1997).

DNA'nın kalitatif olarak değerlendirilmesinde kullanılan agaroz jel elektroforezi, tüm örneklerde DNA varlığını göstermiştir. Ancak bant yoğunluklarının düşük ve silik olması, izole edilen DNA'nın nispeten düşük konsantrasyonlarda veya miktarlarda olabileceğini düşündürmektedir. Bununla birlikte, bu durum PCR amplifikasyonunu engellememiş ve *ITS* bölgesi başarıyla çoğaltılmıştır.

Filogenetik çalışmalarda yaygın olarak kullanılan *ITS* bölgesi, tür düzeyinde ayırt edici gücü yüksek olması nedeniyle genellikle tercih edilmektedir (Baldwin, 1992) Bu çalışmada *ITS* bölgesine ait primerlerle yapılan PCR uygulamaları sonucunda elde edilen amplifikasyon ürünleri, jel üzerinde beklenen büyüklükte ve netlikte bantlar oluşturarak amplifikasyonun başarılı olduğunu ortaya koymuştur.

Çalışmanın en dikkat çekici bulgularından biri, amplifiye edilen *ITS* bölgesinin, GenBank gibi uluslararası genetik veri tabanlarında daha önce kayıt altına alınmamış olmasıdır. Bu durum, elde edilen sekansın özgünlüğünü ortaya koymakta ve çalışmanın literatürdeki katkı değerini artırmaktadır. Genetik dizilerin GenBank gibi açık erişimli veri tabanlarına yüklenmesi, bilimsel şeffaflığın artırılmasına, gelecekte yapılacak filogenetik, moleküler taksonomi ve biyocoğrafya çalışmalarına referans sağlamasına olanak tanımaktadır (Clark vd., 2016).

Danışman hocam Sn. Prof. Dr. Özer Yılmaz'ın rehberliğinde, elde edilen sekansların NCBI GenBank sistemine yüklenmesi planlanmaktadır. Bu sayede, elde edilen veriler yalnızca bu çalışmanın çıktısı olarak kalmayacak; aynı zamanda diğer araştırmacılar tarafından da erişilebilir ve karşılaştırılabilir hale gelecektir.

Sonuç olarak, bu tez çalışması, moleküler biyoloji teknikleri kullanılarak *Ephedra distachya* bitkisinin *ITS* bölgesinin çoğaltılması ve sekanslanması sürecinde hem metodolojik hem de veritabanı yönüyle özgün katkılar sunmaktadır. Özellikle, veri tabanlarında bulunmayan bu sekansların tanımlanması ve kayıt altına alınması, tür düzeyinde yapılacak tanımlamalar için temel bir referans niteliğindedir.

Ayrıca, *Ephedra distachya*'nın Türkiye florasında doğal olarak yetişen ve potansiyel olarak psikoaktif veya toksik bileşenler içerebilen bitkiler arasında yer alması, bu çalışmayı adli bilimler açısından da önemli kılmaktadır. Bitki kaynaklı materyallerin tür tayini, adli vakalarda önemli bir yer tutmaktadır. Özellikle yasa dışı bitki ürünlerinin tespiti, toksikolojik analizlerde bitki kökenli etkenlerin belirlenmesi gibi durumlarda tür düzeyinde yapılacak doğru tanımlamalar kritik öneme sahiptir. Bu bağlamda, çalışmada elde edilen genetik veriler, hem adli botanik hem de toksikoloji alanında yürütülecek moleküler analizler için bilimsel bir referans noktası sağlayacaktır.

Elde edilen bulgular, yalnızca bitkisel sistematik ve moleküler taksonomi açısından değil; aynı zamanda adli delil değerlendirmelerinde moleküler tanımlama süreçlerini destekleyecek biçimde geniş bir uygulama alanı sunmakta olup, ilerleyen dönemde bu alanda yapılacak multidisipliner araştırmalar için güçlü bir temel oluşturmaktadır.

KAYNAKLAR

Baldwin, B. G. (1992). Phylogenetic utility of the internal transcribed spacers of nuclear ribosomal DNA in plants: An example from the compositae. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, *1*(1), 3-16. https://doi.org/10.1016/1055-7903(92)90030-K

Cakmak, I. B., Gurses, A. G., Kaya, H., & Goka, E. (2020). Brief psychotic disorder due to ephedrine. Içinde *Dusunen Adam - The Journal of Psychiatry and Neurological Sciences* (C. 33, Sayı 4, ss. 441-443). Kare Publishing. https://doi.org/10.14744/DAJPNS.2020.00114

Chen, X., Cui, Y., Nie, L., Hu, H., Xu, Z., Sun, W., Gao, T., Song, J., & Yao, H. (2019). Identification and Phylogenetic Analysis of the Complete Chloroplast Genomes of Three Ephedra Herbs Containing Ephedrine. *BioMed Research International*, *2019*. https://doi.org/10.1155/2019/5921725

Clark, K., Karsch-Mizrachi, I., Lipman, D. J., Ostell, J., & Sayers, E. W. (2016). GenBank. *Nucleic Acids Research*, *44*(D1), D67-D72. https://doi.org/10.1093/nar/gkv1276

Doyle, J., & Hortorium, B. (1991). DNA Protocols for Plants: CTAB Total DNA Isolation. *NATO ASI Series*, *57*, 283-293.

Gausterer, C., Stein, C., & Stimpfl, T. (2012). Application of direct PCR in a forensic case of yew poisoning. *International Journal of Legal Medicine*, *126*(2), 315-319. https://doi.org/10.1007/s00414-011-0607-0

Green, M. R., & Sambrook, J. (2016). Precipitation of DNA with ethanol. *Cold Spring Harbor Protocols*, *2016*(12), 1116-1120. https://doi.org/10.1101/pdb.prot093377

Hamedani, S. G., Asri, Y., & Mehregan, I. (2020). Genetic diversity and population structure of Iranian Ephedra Major. *Rostaniha*, *21*(2), 231-247. https://doi.org/10.22092/BOTANY.2020.351724.1217

Heikrujam, J., Kishor, R., & Mazumder, P. B. (2020). The Chemistry Behind Plant DNA Isolation Protocols. Içinde O.-M. Boldura (Ed.), *The Chemistry Behind Plant DNA Isolation Protocols*. IntechOpen. https://doi.org/10.5772/intechopen.92206

Huang, J., Giannasi, D. E., & Price, R. A. (2005). Phylogenetic relationships in Ephedra (Ephedraceae) inferred from chloroplast and nuclear DNA sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, *35*(1), 48-59. https://doi.org/10.1016/j.ympev.2004.12.020

Ickert-Bond, S. M., & Wojciechowski, M. F. (2004). Phylogenetic relationships in Ephedra (Gnetales): Evidence from nuclear and chloroplast DNA sequence data. *Systematic Botany*, *29*(4), 834-849. https://doi.org/10.1600/0363644042451143

Kakiuchi, N., Mikage, M., Ickert-Bond, S., Maier-Stolte, M., & Freitag, H. (2011). A molecular phylogenetic study of the ephedra distachya/E. sinica complex in Eurasia. *Willdenowia*, *41*(2), 203-215. https://doi.org/10.3372/wi.41.41201

Kavsaoğlu, A. R., & Mersinkaya, İ. (2019). Python İle Mini Jel Elektroforez Kontrol Yazılımı Ve Sistem Tasarımı. *Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Dergisi Part C: Tasarım ve Teknoloji*, *7*(4), 969-984. https://doi.org/10.29109/gujsc.621700

Lee, M. R. (2011). The history of Ephedra (ma-huang). *Journal of the Royal College of Physicians of Edinburgh*, *41*(1), 78-84. https://doi.org/10.4997/JRCPE.2011.116

MUTLU, E., OKUDAN, M., & AŞICIOĞLU, F. (2020). Precursor Substances Used in Manufacturing Drug: Ten-Year Single Center Data. *Turkiye Klinikleri Journal of*

Forensic Medicine and Forensic Sciences, *17*(1), 25-34. https://doi.org/10.5336/forensic.2019-70140

Nithaniyal, S., Majumder, S., Umapathy, S., & Parani, M. (2021). Forensic application of DNA barcoding in the identification of commonly occurring poisonous plants. *Journal of Forensic and Legal Medicine*, *78*. https://doi.org/10.1016/j.jflm.2021.102126

Porebski, S., Bailey, L. G., & Baum, B. R. (1997). Modification of a CTAB DNA Extraction Protocol for Plants Containing High Polysaccharide and Polyphenol Components. *Plant Molecular Biology Reporter*, *1*, 8-15.

Powers, M. E. (2001). Ephedra and Its Application to Sport Performanca: Another Concern for the Athletic Trainer? *Journal of Athletic Training*, *36*(4), 420-424. www.journalofathletictraining.org

Safety Assessment and Determination of a Tolerable Upper Limit for Ephedra. (2000). Cantox Health Sciences International.

Sanderson, B. A., Araki, N., Lilley, J. L., Guerrero, G., & Lewis, L. K. (2014). Modification of gel architecture and TBE/TAE buffer composition to minimize heating during agarose gel electrophoresis. *Analytical Biochemistry*, *454*(1), 44-52. https://doi.org/10.1016/j.ab.2014.03.003

Scientific Assessment of Ephedra Species (Ephedra spp.). (2010). http://www.efsa.europa.eu/en/scdocs/doc/1249.pdf.

Siran, N., Matsumoto, M., Shimoyama, Y., Allain, N., Coşkun, M., Yılmaz, T., & Mikage, M. (2013). Anatomical, chemical, and molecular genetic studies of Ephedra distachya. *Journal of Japanese Botany*, *88*(3), 144-155. https://doi.org/https://doi.org/10.51033/jjapbot.88_3_10434

Tang, S., Ren, J., Kong, L., Yan, G., Liu, C., Han, Y., Sun, H., & Wang, X. J. (2023). Ephedrae Herba: A Review of Its Phytochemistry, Pharmacology, Clinical Application, and Alkaloid Toxicity. Içinde *Molecules* (C. 28, Sayı 2). MDPI. https://doi.org/10.3390/molecules28020663

Tanker, N., & Altun, M. L. (1997). Türkiye'de Yetişen Ephedra Türleri Üzerinde Farmasötik Botanik Yönünden Araştırmalar. *Journal of Faculty of Pharmacy*, *26*(1), 1-12.

Tanker, N., Coşkun, M., & Altun, M. L. (2008). Türkiye'de Yetişen Ephedra Türlerindeki Alkaloitlerin Mevsime ve Cinsiyete Göre Gösterdiği Değişimlerin YBSK Metodu ile İncelenmesi: Studies on Sexual and Seasonal Changes in Alchaloid Content of Ephedra. *Ankara Universitesi Eczacilik Fakultesi Dergisi*, 049-056. https://doi.org/10.1501/eczfak_0000000465

Thureborn, O. (2014). *New insights into the deep divergences in Ephedra (Gnetales) using molecular data*. Stockholms Universitet.

Tortum, Fatma. (2019). Toksikoloji Vakalarına Yaklaşım, Tanı ve Tarama Yöntemleri, Dekontaminasyon. Içinde *Acil Yaklaşımlar* (ss. 527-541). Akademisyen Kitabevi.

Wilfinger, W. W., Mackey, K., & Chomczynski, P. (1997). Effect of pH and ionic strength on the spectrophotometric assessment of nucleic acid purity. *BioTechniques*, *22*(3), 474-481. https://doi.org/10.2144/97223st01

Woolf, A. D., Watson, W. A., Smolinske, S., & Litovitz, T. (2005). The severity of toxic reactions to ephedra: Comparisons to other botanical products and national trends from 1993-2002. *Clinical Toxicology*, *43*(5), 347-355. https://doi.org/10.1081/CLT-200066075