



## *Achillea millefolium* (Civanperçemi) Ekstraktı ve Luteolin'in *In Vitro* Rat Mesanesi Düz Kas Kontraksiyonları Üzerine Etkileri\*

Emin ŞENGÜL<sup>1</sup>✉, Fikret ÇELEBİ<sup>1</sup>, Ali ÇINAR<sup>1</sup>

1. Atatürk Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Fizyoloji Anabilim Dalı, Erzurum, TÜRKİYE.

Geliş Tarihi/Received	Kabul Tarihi/Accepted	Yayın Tarihi/Published
29.01.2018	04.04.2018	25.12.2018

**Bu makaleye atıfta bulunmak için/To cite this article:**  
Şengül E, Çelebi F, Çınar A: *Achillea millefolium* (Civanperçemi) Ekstraktı ve Luteolin'in *In Vitro* Rat Mesanesi Düz Kas Kontraksiyonları Üzerine Etkileri. *Atatürk Üniversitesi Vet. Bil. Derg.*, 13 (3): 326-336, 2018.  
DOI:10.17094/ataunivbd.385704

**Öz:** Civanperçemi (CP) alternatif tıpta yaygın olarak kullanılmakta ve yapısında birçok bileşikle birlikte Luteolin de bulunmaktadır. Bu çalışmada, CP metanol ekstraktı ve Luteolin'in izole rat mesane düz kas kontraktilesi üzerine etkileri araştırıldı. Çalışmada 20 adet erkek Sprague Dawley rat kullanıldı ve ratlar anestezi altında dekapite edildiler. İzole edilen mesanelerin temizlikleri yapıldı ve mesanelerden hazırlanan kas şeritleri organ banyosuna asıldı. Dokuya 1 gram gerim uygulandı ve 1 saatlik inkübasyon periyoduna bırakıldı. Inkübasyon periyodu sonunda banyoya CP ekstraktı, Luteolin, asetilkolin (ACh), potasyum klorür (KCl) ve Nifedipin bir protokol çerçevesinde uygulandı. Veriler one way ANOVA'da Tukey testi ile değerlendirildi. CP ekstraktı ve Luteolin'in farklı dozlarının, ACh ve KCl ile indüklenen izole mesane kontraksiyonlarını inhibe ettikleri belirlendi. ACh'nin submaksimal dozu ile indüklenen kontraksiyonların banyoda Nifedipin varlığında CP ekstraktı ve Luteolin ile daha güçlü bir şekilde baskılandığı görüldü. KCl'nin submaksimal dozu ile indüklenen kontraksiyonları CP ekstraktı ile Nifedipin'in birlikte daha fazla inhibe ettikleri belirlendi, ancak banyoda Nifedipin varlığında Luteolin'in etkisinin değişmediği tespit edildi. Bu çalışmada CP ekstraktı ve Luteolin'in farklı dozlarının mesane düz kas kontraksiyonlarını inhibe ettikleri ve CP ekstraktı ve Luteolin'in L tipi Ca<sup>2+</sup> kanalları aracılığıyla etkili olurken, CP ekstraktının ayrıca M<sub>3</sub> reseptör yolu üzerinden de etkili olabileceği belirlendi.

**Anhtar Kelimeler:** Civanperçemi, Luteolin, Mesane, Rat.

## The Effects of *Achillea millefolium* (Yarrow) Extract and Luteolin on *In Vitro* Rat Urinary Bladder Muscles

**Abstract:** Yarrow (CP) is commonly used in alternative medicine and in its structure is found Luteolin together with many compounds. In this study, effects of CP methanol extract and Luteolin on isolated rat bladder smooth muscle contractility were investigated. In the study, twenty male Sprague Dawley rats were used and the rats were decapitated under anesthesia. The cleaning of isolated bladders were done and muscle strips prepared from the bladders were placed to organ baths. The tissues were applied to 1 gram tension and left for 1 hour incubation period. At the end of the incubation period, CP extract, Luteolin, acetylcholine (ACh), potassium chloride (KCl) and Nifedipine was applied with a protocol the bath. Data were evaluated by Tukey test in one way ANOVA. It was determined that different doses of CP extract and Luteolin inhibited the isolated bladder contractility induced by ACh and KCl. It was seen that of the contractions induced by ACh submaximal dose more strongly suppressed by CP extract and Luteolin in the presence of Nifedipine in the bath. Subcutaneous dose-induced indications of KCl were found to be more inhibitory in co-existence of CP extract and Nifedipine. It was determined that together with CP extract and Nifedipine were more inhibited the KCl's submaximal dose-induced contractions, but but the effect of Luteolin in the presence of Nifedipine in bath was not changed. In this study, it was assigned that inhibiting the bladder smooth muscle contractions of different doses of CP extract and Luteolin and of CP extract to be also effective on the M<sub>3</sub> receptor pathway.

**Keywords:** Luteolin, Rat, Urinary bladder, Yarrow.

✉ Emin ŞENGÜL

Atatürk Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Fizyoloji Anabilim Dalı, Erzurum, TÜRKİYE.  
e-posta: emin.sengul@atauni.edu.tr

\*Bu makale "*Achillea millefolium* (Civanperçemi) Ekstraktlarının ve Bazı Biyolojik Aktif Bileşiklerinin *In Vitro* Ortamda Rat Mesanesi Düz Kasları Üzerine Etkilerinin Araştırılması" isimli doktora tezinden hazırlanmıştır.

## GİRİŞ

**A**chillea millefolium (civanperçemi) dünyanın çeşitli bölgelerinde yetişen, çok yıllık bir bitki türüdür (1-4). Alternatif tıpta sıklıkla kullanılan Civanperçemi (CP)'nin (5) yapısında 100'den fazla biyolojik aktif bileşik bulunmaktadır (6). CP'nin yapısındaki bileşiklerin güçlü antioksidan aktivitelere sahip oldukları bilinmektedir (7). CP aynı zamanda antimikrobiyal, iltihabı azaltıcı, karaciğer koruyucu ve kalsiyum (Ca<sup>2+</sup>) antagonist aktivitelere sahiptir (8,9). CP metanol ekstraktının hipotansif ve vazodilatatör etkiye sahip olduğu (10) ve bu etkinin yapısında bulunan artemetin bileşiğinin Anjiyotensin Konverting Enzim'i inhibe etmesiyle gerçekleştiği belirlenmiştir (11). CP sulu ekstraktının farelerde *in vitro* mide düz kas kontraksiyonlarını indüklediği (12) ve CP'nin yapısındaki flavonoidlerin izole ileum düz kas kontraksiyon cevaplarını azalttıkları rapor edilmiştir (13-15). *In vitro* kobay ileumunda yapılan bir başka çalışmada ise, CP'nin hidroalkolik ekstraktının doza bağımlı olarak elektriksel alan stimülasyonu (EFS) ile indüklenen kontraksiyonları inhibe ettiği tespit edilmiştir (16). CP'nin yapısında bulunan flavonoid bileşikler, izole kobay ileumunda Ca<sup>2+</sup>'nin hücre içine akımını bloke ederek spazmolitik etki oluşturmaktadırlar (15). CP'nin yapısında bulunan biyolojik aktif bileşiklerden birisi de Luteolin'dir (17). Luteolin antiinflamatuvar ve antikanser etkilere sahip bir flavonoidtir (18,19). Luteolin reaktif oksijen ve nitrojen moleküllerini ortadan kaldırarak antioksidan etki oluşturmaktadır (20). Bu etkilerinin yanı sıra, damarlarda güçlü bir vazodilatatör olan nitrik oksit (NO) sentezinden sorumlu olan endotelial NO sentetaz (eNOS) düzeyini artırarak damarlarda gevşemeye neden olmaktadır (21). Ayrıca Luteolin'in kobay ileumu kontraksiyonlarını inhibe ederek, spazmolitik etki oluşturduğu belirlenmiştir (15). CP ekstraktları ve Luteolin'in çeşitli düz kasların myojenik aktivite üzerine etkileri birçok farklı çalışma ile belirlenmiş olmasına rağmen, mesane düz kas kontraktilesi üzerine etkileri ile alakalı yeterli literatür bilgi

bulunmamaktadır. Bu çalışmada, CP metanol ekstraktı ve Luteolin'in *in vitro* rat mesane düz kas kontraktilesi üzerine etkilerinin belirlenmesi amaçlanmaktadır.

## MATERYAL ve METOT

Çalışmamız, Atatürk Üniversitesi Rektörlüğü Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'nun 2012/655 nolu kararı ile onaylandı ve Atatürk Üniversitesi Rektörlüğü BAP birimi tarafından 2012/362 No'lu proje kapsamında desteklendi. Çalışmada, Atatürk Üniversitesi Tıbbi Deneysel Araştırma ve Uygulama Merkezi'nden temin edilen, ortalama 200-250 gr ağırlığında ergin 20 adet erkek Sprague Dawley rat kullanıldı. 10 adet rat *in vitro* mesane düz kas kontraksiyonlarının asetilkolin (ACh) ile indüklendiği çalışmalarda, kalan 10 rat ise potasyum klorür (KCl) ile indüklendiği çalışmalarda kullanıldı. Tüm hayvanlar standart bakım ve besleme şartlarına tabi tutuldu ve herhangi bir kısıtlama yapılmadı.

## Mesane Düz Kas Şeritlerinin Hazırlanması

Ketamin (75mg/kg)-Rompun (15mg/kg) eşliğinde anesteziye alınan hayvanlar servikal dislokasyon yöntemi ile ötenazi edildiler. Mesane dokusu hızlı bir şekilde izole edilerek içerisinde +4°C sıcaklığında Krebs solüsyonu (mM: NaCl 119, KCl 4.75, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.2, NaHCO<sub>3</sub> 25, MgSO<sub>4</sub> 1.5, CaCl<sub>2</sub> 2.5, glukoz 11) bulunan petri kutusunda temizliği yapıldı. Mesaneden vertikal yönde, 2x10 mm ebadında iki veya üç kas şeridi hazırlandı. Hazırlanan kas şeritleri pH'sı 7.4 ve sıcaklığı 37°C olan Krebs solüsyonu ile dolu 20 ml'lik organ banyosuna yerleştirilerek alt ucu banyo tabanındaki çelik çengele üst ucu ise bir çelik tel ile transdusere (ELJ-S045C-EMKA-R04003 ve R04004) bağlandı ve banyo %95 O<sub>2</sub> ve %5 CO<sub>2</sub> ile sürekli gazlandırıldı. Doku şeritlerine 1 gr gerim uygulandı ve 1 saatlik inkübasyon periyoduna tabi tutuldu. İnkübasyon periyodu esnasında banyo ortamı 15 dakikalık periyotlarla Krebs solüsyonu ile yıkandı (22,23). İnkübasyon periyodu sonunda ACh'nin dozları (10<sup>-9</sup>-10<sup>-3</sup> M) banyoya kümülatif

uygulanarak doz cevap eğrisi elde edildi. Dokular üç kez yıkanıp 5 dk dinlendirildi ve bu işlem üç kez tekrarlandı. Daha sonra CP ekstraktı veya Luteolin'in en düşük dozları ayrı ayrı banyoya uygulandı ve 10 dk maruziyet süresi sonunda ACh dozları ( $10^{-9}$ - $10^{-3}$  M) banyoya kümülatif uygulanarak doz cevap eğrisi elde edildi ve dokular üç kez yıkanarak 5 dk dinlendirildi. Bu işlemler CP ekstraktı ve Luteolin'in her bir dozu için ayrıca yapıldı. Banyoda CP ekstraktı ve Luteolin'in dozlarının varlığında ve yokluğunda ACh'nin  $10^{-9}$ - $10^{-3}$  M dozları ile elde edilen doz cevap eğrileri karşılaştırılarak değerlendirildi. Bu protokol kontraksiyonları indükleyici ajan olarak KCl'nin kümülatif dozları (20, 40, 60, 80 ve 100 mM) banyoya uygulanarak da yapıldı. CP ekstraktı ve Luteolin'in mesane düz kas kontraktilesi üzerine etkilerinin mekanizmasının araştırılması amacıyla L tipi  $Ca^{2+}$  kanal blokörü olan Nifedipin kullanıldı. Banyoda Nifedipin ( $10^{-7}$  M) varlığında ve yokluğunda ACh ve KCl'nin submaksimal dozları ile indüklenen kontraksiyon cevapları üzerine CP ekstraktı veya Luteolin'in en yüksek dozlarının etkileri belirlendi.

### İstatistiksel Analiz

Çalışmamızdan elde edilen verilerin istatistiksel analizleri SPSS20 istatistik programı kullanılarak yapıldı. Sonuçların değerlendirilmesinde One Way ANOVA'da Duncan testi uygulandı. Değerler, ortalama±Standard sapma (SD) olarak verildi.  $P<0.05$  değeri anlamlı kabul edildi.

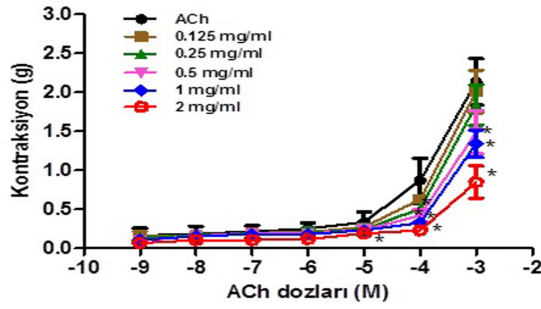
### BULGULAR

CP ekstraktının 0.125 mg/mL dozunun ACh'nin  $10^{-9}$ - $10^{-3}$  M dozları ile kümülatif indüklenen kontraksiyonlar üzerine önemli bir etkisinin olmadığı belirlendi (Tablo 1, Şekil 1,  $P>0.05$ ,  $n=10$ ). CP ekstraktının 0.25 mg/mL dozunun ACh'nin  $10^{-4}$  M dozu ile indüklenen kontraksiyon cevaplarını (Tablo 1, Şekil 1,  $P<0.05$ ,  $n=10$ ), 0.5 ve 1 mg/mL dozunun ACh'nin  $10^{-4}$  ve  $10^{-3}$  M dozları ile indüklenen kontraksiyon cevaplarını (Tablo 1, Şekil 1,  $P<0.001$ ,  $n=10$ ) ve 2 mg/mL dozunun ise ACh'nin  $10^{-6}$ ,  $10^{-4}$  ve  $10^{-3}$  M dozları ile indüklenen kontraksiyon cevaplarını önemli ölçüde azalttığı belirlendi (Tablo 1, Şekil 1,  $P<0.001$ ,  $n=10$ ).

**Tablo 1.** CP ekstraktı'nın farklı dozlarının ACh ile indüklenmiş *in vitro* mesane düz kas kontraktilesi üzerine etkisi ( $n=10$ ).

**Table 1.** The effects of different doses of CP extract on ACh-induced *in vitro* bladder smooth muscle contractility ( $n=10$ ).

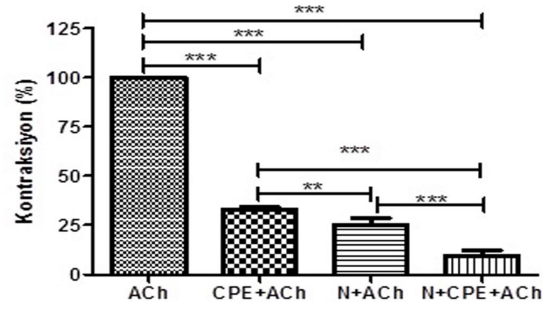
ACh Dozları	CP EKSTRAKTI					
	Kontrol $\bar{X} \pm SD$	0.125 mg/ml $\bar{X} \pm SD$	0.25 mg/ml $\bar{X} \pm SD$	0.5 mg/ml $\bar{X} \pm SD$	1 mg/ml $\bar{X} \pm SD$	2 mg/ml $\bar{X} \pm SD$
$10^{-9}$ M	0.16±0.09 <sup>a</sup>	0.15±0.06 <sup>a</sup>	0.14±0.04 <sup>a</sup>	0.1±0.03 <sup>a</sup>	0.11±0.04 <sup>a</sup>	0.07±0.04 <sup>a</sup>
$10^{-8}$ M	0.19±0.09 <sup>a</sup>	0.16±0.05 <sup>a</sup>	0.17±0.04 <sup>a</sup>	0.16±0.03 <sup>a</sup>	0.15±0.02 <sup>a</sup>	0.11±0.04 <sup>a</sup>
$10^{-7}$ M	0.21±0.07 <sup>a</sup>	0.2±0.04 <sup>a</sup>	0.19±0.03 <sup>a</sup>	0.19±0.04 <sup>a</sup>	0.18±0.04 <sup>a</sup>	0.10±0.04 <sup>a</sup>
$10^{-6}$ M	0.25±0.07 <sup>a</sup>	0.2±0.05 <sup>ab</sup>	0.2±0.6 <sup>ab</sup>	0.19±0.04 <sup>ab</sup>	0.18±0.03 <sup>ab</sup>	0.12±0.04 <sup>b</sup>
$10^{-5}$ M	0.33±0.13 <sup>a</sup>	0.27±0.07 <sup>a</sup>	0.24±0.07 <sup>a</sup>	0.23±0.05 <sup>a</sup>	0.23±0.05 <sup>b</sup>	0.19±0.05 <sup>a</sup>
$10^{-4}$ M	0.87±0.28 <sup>a</sup>	0.63±0.04 <sup>a</sup>	0.51±0.04 <sup>b</sup>	0.42±0.07 <sup>bc</sup>	0.33±0.04 <sup>c</sup>	0.23±0.05 <sup>d</sup>
$10^{-3}$ M	2.13±0.29 <sup>a</sup>	2.01±0.27 <sup>ab</sup>	1.84±0.25 <sup>ab</sup>	1.49±0.28 <sup>bc</sup>	1.34±0.17 <sup>c</sup>	0.85±0.2 <sup>d</sup>



**Şekil 1.** Banyoda CP ekstraktının farklı dozlarının varlığında ve yokluğunda ACh ( $10^{-9}$ - $10^{-3}$  M) ile indüklenen *in vitro* rat mesane düz kas kontraktilesi doz cevap eğrileri (n=10, P<0.05).

**Figure 1.** The *in vitro* rat bladder smooth muscle contractility dose-response curves induced by ACh ( $10^{-9}$ - $10^{-3}$  M) in the presence and absence of different doses of CP extract in bath (n=10, P<0.05).

$10^{-4}$  M ACh ile indüklenen izole detrusor kontraksiyonları üzerine CP ekstraktının en yüksek dozu olan 2 mg/ml dozunun etkileri banyoda L tipi  $Ca^{2+}$  kanal blokörü olan Nifedipin varlığında ve yokluğunda belirlendi. Banyoda hem CP ekstraktı hem de Nifedipin'in ayrı ayrı varlığında ACh ile indüklenen kontraksiyonların önemli ölçüde azaldığı (Şekil 2) ve banyoya CP ekstraktı ve Nifedipin birlikte uygulandığında ACh ile indüklenen kontraksiyon cevaplarının daha fazla azaldığı tespit edildi (Şekil 2, n=10, P<0.001\*\*\*, P<0.05\*\*).



**Şekil 2.**  $10^{-7}$  M Nifedipin varlığında ve yokluğunda  $10^{-4}$  M ACh ile indüklenen *in vitro* mesane düz kas kontraksiyonları üzerine CP ekstraktının (2 mg/ml) etkisi (n=10, P<0.0001\*\*\*, P<0.01\*\*; ACh: Asetilkolin; CPE: Civanperçemi ekstraktı; N: Nifedipin).

**Figure 2.** The effect of CP extract (2 mg/ml) on *in vitro* bladder smooth muscle contractions induced by  $10^{-4}$  M ACh in the presence and absence of  $10^{-7}$  M Nifedipine (n=10, P<0.0001\*\*\*, P<0.01\*\*; ACh: Acetylcholine; CPE: Yarrow extract; N: Nifedipine).

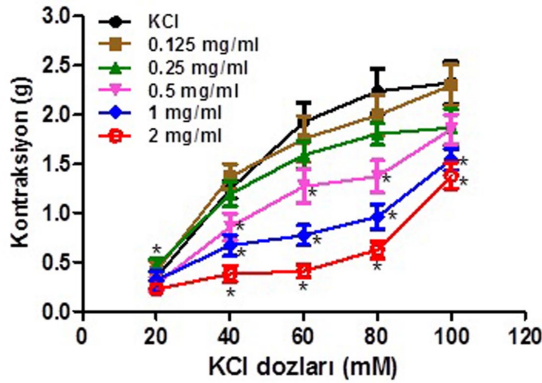
CP ekstraktının 0.125 mg/mL dozunun, KCl dozları ile kümülatif indüklenen kontraksiyonlar üzerine anlamlı bir etki oluşturmadığı gözlemlendi (Tablo 2, Şekil 3, n=10, P>0.05). CP ekstraktının 0.25 mg/mL dozunun KCl'nin 20 mM dozunun cevabını önemli ölçüde artırdığı belirlendi (Tablo 2, Şekil 3, n=10, P<0.05). 0.5 mg/mL dozunun KCl'nin 40, 60 ve 80 mM dozları ile indüklenen kontraksiyon cevaplarını anlamlı düzeyde azalttığı (Tablo 2, Şekil 3, n=10, P<0.05), 1 ve 2 mg/mL dozlarının ise KCl'nin 20 mM dozu hariç diğer tüm dozlarının kontraksiyon cevaplarını istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azalttığı belirlendi (Tablo 2, Şekil 3, n=10, P<0.05).

**Tablo 2.** CP ekstraktının farklı dozlarının KCl ile indüklenmiş *in vitro* mesane düz kas kontraktilesi üzerine etkileri (n=10).

**Table 2.** The effects of different doses of CP extract on KCl-induced *in vitro* bladder smooth muscle contractility (n=10).

KCl	CP EKSTRAKTI					
	Kontrol	0,125 mg/ml	0,25 mg/ml	0,5 mg/ml	1 mg/ml	2 mg/ml
	$\bar{X} \pm SD$	$\bar{X} \pm SD$	$\bar{X} \pm SD$	$\bar{X} \pm SD$	$\bar{X} \pm SD$	$\bar{X} \pm SD$
20 mM	0.34±0.01 <sup>a</sup>	0.41±0.10 <sup>ab</sup>	0.47±0.06 <sup>b</sup>	0.27±0.10 <sup>a</sup>	0.33±0.12 <sup>a</sup>	0.22±0.12 <sup>a</sup>
40 mM	1.24±0.19 <sup>a</sup>	1.37±0.20 <sup>a</sup>	1.19±0.22 <sup>ab</sup>	0.85±0.17 <sup>b</sup>	0.67±0.13 <sup>b</sup>	0.38±0.11 <sup>c</sup>
60 mM	1.92±0.30 <sup>a</sup>	1.75±0.40 <sup>ab</sup>	1.58±0.23 <sup>ab</sup>	1.27±0.25 <sup>b</sup>	0.77±0.18 <sup>c</sup>	0.4±0.08 <sup>d</sup>
80 mM	2.24±0.41 <sup>a</sup>	1.99±0.51 <sup>ab</sup>	1.8±0.37 <sup>ab</sup>	1.37±0.35 <sup>bc</sup>	0.96±0.18 <sup>c</sup>	0.62±0.11 <sup>d</sup>
100mM	2.32±0.33 <sup>a</sup>	2.3±0.41 <sup>a</sup>	1.86±0.31 <sup>ab</sup>	1.85±0.28 <sup>ab</sup>	1.56±0.31 <sup>b</sup>	1.38±0.22 <sup>b</sup>

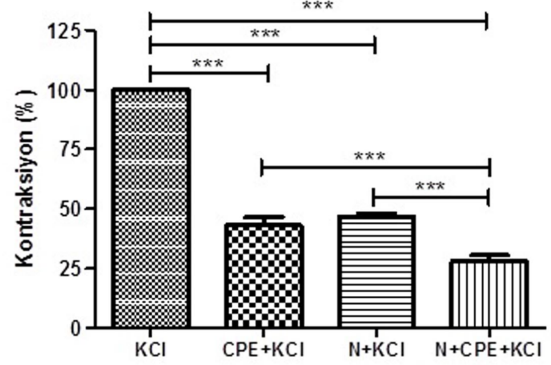
Aynı satırda farklı harflerle ifade edilen değerler arasındaki fark anlamlıdır. a, b ve a, bc: P<0.05; a, c: P<0.01.



**Şekil 3.** KCl'nin kümülatif dozları (20-100 mM) ile indüklenen *in vitro* mesane düz kas kontraktilesi üzerine CP ekstraktının farklı dozlarının etkisi (n=10, P<0.05).

**Figure 3.** Effect of different doses of CP extract on *in vitro* bladder smooth muscle contractility induced by cumulative doses (20-100 mM) of KCl (n=10, P<0.05).

60 mM KCl ile indüklenen kontraksiyonlar üzerine CP ekstraktının en yüksek dozu olan 2 mg/ml dozunun etkileri banyoda L tipi  $Ca^{2+}$  kanal blokörü olan Nifedipin varlığında ve yokluğunda belirlendi. Banyoda hem CP ekstraktı hem de Nifedipin'in ayrı ayrı varlığında KCl (60 mM) ile indüklenen kontraksiyonların önemli ölçüde azaldığı, CP ekstraktı ve Nifedipin'in birlikte uygulanmasının sadece Nifedipin'e kıyasla KCl ile indüklenen kontraksiyon cevaplarını daha güçlü bir şekilde baskıladığı tespit edildi (Şekil 4, n=10, \*\*\*: P<0.001).



**Şekil 4.**  $10^{-7}$  M Nifedipine'nin varlığında ve yokluğunda 60 mM KCl ile indüklenen *in vitro* mesane düz kas kontraksiyonları üzerine CP ekstraktının (2 mg/ml) etkisi (n=10, P<0.001\*\*\*; KCl: Potasyum klorür; CPE: Civanperçemi ekstraktı; N: Nifedipin).

**Figure 4.** The effect of CP extract (2 mg/ml) on *in vitro* bladder smooth muscle contractions induced by 60 mM KCl in the presence and absence of  $10^{-7}$  M Nifedipine (n=10, P<0.001\*\*\*; KCl: Potassium chloride; CPE: Yarrow extract; N: Nifedipine).

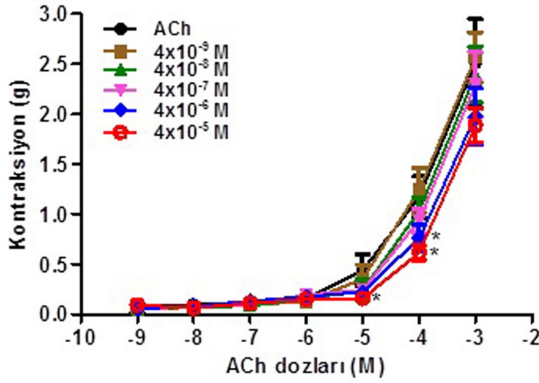
Luteolin'nin  $4 \times 10^{-9}$ ,  $4 \times 10^{-8}$  ve  $4 \times 10^{-7}$  M dozlarının, ACh'nin  $10^{-9}$ - $10^{-3}$  M dozları ile kümülatif indüklenen kontraksiyon cevaplarını kontrole kıyasla istatistiksel olarak anlamlı düzeyde değiştirmediği belirlendi (Tablo 3, Şekil 5, n=10, P>0.05). Luteolin'nin  $4 \times 10^{-6}$  M dozu  $10^{-4}$  M ACh ile indüklenen kontraksiyonları ve Luteolin'in  $4 \times 10^{-5}$  M dozu ise  $10^{-5}$  ve  $10^{-4}$  M ACh ile indüklenen kontraksiyon cevaplarını önemli ölçüde azalttı (Tablo 3, Şekil 5, P<0.05, n=10).

**Tablo 3.** ACh'nin kümülatif dozları ile indüklenmiş *in vitro* rat mesane düz kas kontraktilesi üzerine Luteolin'in farklı dozlarının etkileri (n=10).

**Table 3.** The effects of different doses of Luteolin on *in vitro* rat bladder smooth muscle contractility induced by cumulative doses of ACh (n=10).

ACh (log)	LUTEOLİN					
	Kontrol $\bar{X} \pm SD$	$4 \times 10^{-9}$ M $\bar{X} \pm SD$	$4 \times 10^{-8}$ M $\bar{X} \pm SD$	$4 \times 10^{-7}$ M $\bar{X} \pm SD$	$4 \times 10^{-6}$ M $\bar{X} \pm SD$	$4 \times 10^{-5}$ M $\bar{X} \pm SD$
$10^{-9}$ M	0.07±0.05 <sup>a</sup>	0.05±0.01 <sup>a</sup>	0.05±0.01 <sup>a</sup>	0.05±0.02 <sup>a</sup>	0.05±0.02 <sup>a</sup>	0.09±0.01 <sup>a</sup>
$10^{-8}$ M	0.09±0.05 <sup>a</sup>	0.07±0.02 <sup>a</sup>	0.07±0.01 <sup>a</sup>	0.07±0.02 <sup>a</sup>	0.08±0.02 <sup>a</sup>	0.06±0.02 <sup>a</sup>
$10^{-7}$ M	0.10±0.05 <sup>a</sup>	0.09±0.03 <sup>a</sup>	0.08±0.02	0.1±0.03 <sup>a</sup>	0.13±0.04 <sup>a</sup>	0.11±0.02 <sup>a</sup>
$10^{-6}$ M	0.15±0.04 <sup>ab</sup>	0.13±0.02 <sup>a</sup>	0.15±0.02 <sup>a</sup>	0.19±0.02 <sup>a</sup>	0.17±0.03 <sup>a</sup>	0.15±0.03 <sup>a</sup>
$10^{-5}$ M	0.42±0.15 <sup>a</sup>	0.35±0.14 <sup>a</sup>	0.24±0.10 <sup>ab</sup>	0.24±0.08 <sup>ab</sup>	0.23±0.07 <sup>ab</sup>	0.15±0.03 <sup>b</sup>
$10^{-4}$ M	1.16±0.2 <sup>a</sup>	1.24±0.32 <sup>ab</sup>	1.02±0.16 <sup>ab</sup>	0.93±0.12 <sup>ab</sup>	0.76±0.17 <sup>bc</sup>	0.61±0.07 <sup>c</sup>
$10^{-3}$ M	2.51±0.78 <sup>a</sup>	2.56±0.57 <sup>a</sup>	2.37±0.58 <sup>a</sup>	2.28±0.64 <sup>a</sup>	1.96±0.44 <sup>a</sup>	1.94±0.19 <sup>a</sup>

Aynı satırda farklı harflerle ifade edilen değerler arasındaki fark anlamlıdır. <sup>a, b, c</sup>: P<0.05; <sup>a, c</sup>: P<0.01.

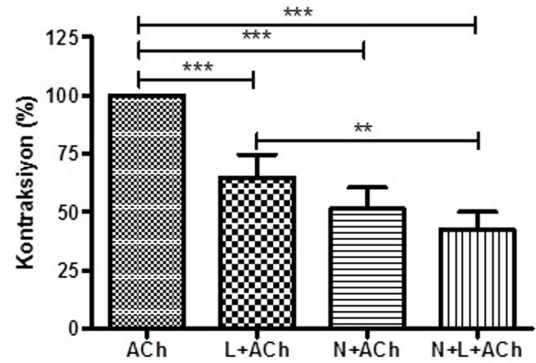


**Şekil 5.** ACh'nin  $10^{-9}$ - $10^{-3}$  M dozları ile indüklenen *in vitro* mesane düz kas kontraksiyonları üzerine Luteolin'in farklı dozlarının etkileri (n=10, P<0.05).

**Figure 5.** Effects of different doses of Luteolin on *in vitro* bladder smooth muscle contractility induced by  $10^{-9}$ - $10^{-3}$  M doses of ACh (n=10, P<0.05).

$10^{-4}$  M ACh ile indüklenen izole detrusor kontraksiyonları üzerine Luteolin'in  $4 \times 10^{-5}$  M dozunun etkileri banyoda Nifedipin varlığında ve yokluğunda belirlendi. Banyoda hem CP ekstraktı hem de Nifedipin'in ayrı ayrı varlığında ACh ile indüklenen kontraksiyonların önemli ölçüde azaldığı gözlemlendi (Şekil 6, n=10, P<0.001). Banyoda Luteolin varlığında elde edilen kontraksiyon cevapları ile Luteolin ve Nifedipin'in birlikte varlığında alınan kontraksiyon cevapları arasında istatistiksel olarak

anlamlı farklılık olduğu tespit edildi (Şekil 6, n=10, P<0.001\*\*\*, P<0.01\*\*).



**Şekil 6.**  $10^{-7}$  M Nifedipine'nin varlığında ve yokluğunda  $10^{-4}$  M ACh ile indüklenen *in vitro* rat mesane düz kas kontraksiyonları üzerine Luteolin'in ( $4 \times 10^{-5}$  M) etkisi (n=10, p<0.001\*\*\*, P<0.01\*\*; ACh: Asetilkolin; L: Luteolin; N: Nifedipin).

**Figure 6.** The effect of Luteolin ( $4 \times 10^{-5}$  M) on *in vitro* bladder smooth muscle contractions induced by  $10^{-4}$  M ACh in the presence and absence of  $10^{-7}$  M Nifedipine (n=10, P<0.001\*\*\*, P<0.01\*\*; ACh: Acetylcholine; L: Luteolin; N: Nifedipine).

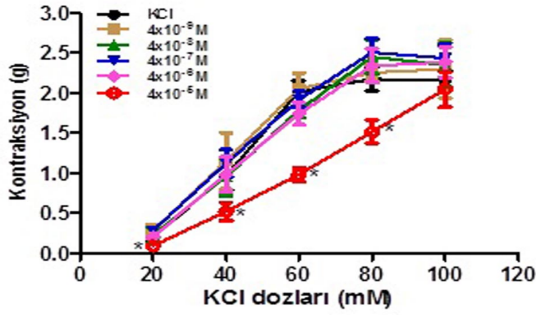
KCl dozları ile kümülatif indüklenen kontraksiyon cevapları üzerine Luteolin'in  $4 \times 10^{-9}$ - $4 \times 10^{-6}$  M dozlarının, anlamlı bir etkilerinin olmadığı belirlendi (Tablo 4, Şekil 7, n=10, P>0.05). Luteolin'in  $4 \times 10^{-5}$  M dozu ise, KCl'nin 20, 40, 60 ve 80 mM dozları ile indüklenen kontraksiyonları önemli ölçüde azalttı (Tablo 4, Şekil 7, n=10, P<0.05).

**Tablo 4.** KCl'nin kümülatif dozları ile indüklenmiş *in vitro* rat mesane düz kas kontraktilitesi üzerine Luteolin'in farklı dozlarının etkileri (n=10).

**Table 4.** The effects of different doses of Luteolin on *in vitro* rat bladder smooth muscle contractility induced by cumulative doses of KCl (n=10).

KCl	LUTEOLİN					
	Kontrol $\bar{X} \pm SD$	$4 \times 10^{-9}$ M $\bar{X} \pm SD$	$4 \times 10^{-8}$ M $\bar{X} \pm SD$	$4 \times 10^{-7}$ M $\bar{X} \pm SD$	$4 \times 10^{-6}$ M $\bar{X} \pm SD$	$4 \times 10^{-5}$ M $\bar{X} \pm SD$
20 mM	0.20±0.08 <sup>ab</sup>	0.27±0.1 <sup>a</sup>	0.22±0.09 <sup>ab</sup>	0.28±0.07 <sup>a</sup>	0.2±0.05 <sup>a</sup>	0.09±0.05 <sup>b</sup>
40 mM	0.96±0.31 <sup>a</sup>	1.15±0.42 <sup>a</sup>	0.95±0.23 <sup>a</sup>	1.12±0.25 <sup>a</sup>	0.98±0.29 <sup>a</sup>	0.52±0.11 <sup>b</sup>
60 mM	2.02±0.42 <sup>a</sup>	2.04±0.33 <sup>a</sup>	1.78±0.24 <sup>a</sup>	1.91±0.28 <sup>a</sup>	1.73±0.33 <sup>a</sup>	0.98±0.11 <sup>b</sup>
80 mM	2.17±0.63 <sup>ab</sup>	2.25±0.43 <sup>a</sup>	2.44±0.45 <sup>a</sup>	2.58±0.51 <sup>a</sup>	2.33±0.41 <sup>a</sup>	1.51±0.18 <sup>b</sup>
100 mM	2.15±0.59 <sup>a</sup>	2.21±0.48 <sup>a</sup>	2.35±0.35 <sup>a</sup>	2.43±0.42 <sup>a</sup>	2.38±0.34 <sup>a</sup>	2.04±0.28 <sup>a</sup>

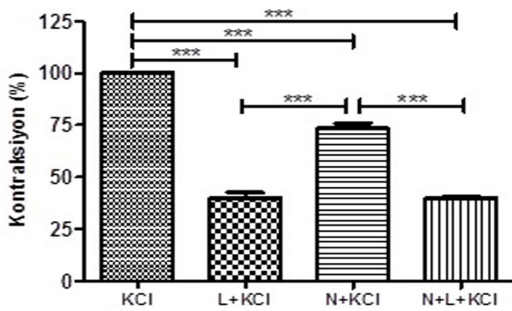
Aynı satırda farklı harflerle ifade edilen değerler arasındaki fark anlamlıdır, <sup>a,b</sup>: P<0.05.



**Şekil 7.** KCl'nin kümülatif dozları (20-100 mM) ile indüklenen *in vitro* mesane düz kas kontraktilesi üzerine Luteolin'in farklı dozlarının etkileri (n=10, P<0.05).

**Figure 7.** Effects of different doses of Luteolin on *in vitro* bladder smooth muscle contractility induced by cumulative doses (20-100 mM) of KCl (n=10, P<0.05).

60 mM KCl ile indüklenen kontraksiyonlar üzerine Luteolin'in  $4 \times 10^{-5}$  M dozunun etkileri banyoda Nifedipin varlığında ve yokluğunda belirlendi. Banyoda hem Luteolin'in hem de Nifedipin'in ayrı ayrı varlığında KCl ile indüklenen kontraksiyonların önemli ölçüde azaldığı görüldü (Şekil 8, n=10, P<0.001,). Luteolin'in 60 mM KCl ile indüklenen kontraksiyonları Nifedipin'e kıyasla daha güçlü bir şekilde baskıladığı, Nifedipin ile Luteolin'in birlikte uygulamasının ise Luteolin'e göre daha güçlü bir etki oluşturmadığı belirlendi (Şekil 8, n=10, \*\*\*: P<0.001).



**Şekil 8.**  $10^{-7}$  M Nifedipin'in varlığında ve yokluğunda 60 mM KCl ile indüklenen *in vitro* mesane düz kas kontraksiyonları üzerine Luteolin'in ( $4 \times 10^{-5}$  M) etkisi (n=10, P<0.001\*\*\*; KCl: Potasyum klorür; L: Luteolin; N: Nifedipin).

**Figure 8.** The effect of Luteolin ( $4 \times 10^{-5}$  M) on *in vitro* bladder smooth muscle contractions induced by 60 mM KCl in the presence and absence of  $10^{-7}$  M Nifedipine (n=10, P<0.001\*\*\*; KCl: Potassium chloride; L: Luteolin; N: Nifedipine).

## TARTIŞMA ve SONUÇ

CP alternatif tıp alanında yaygın olarak kullanılan çok yıllık bir bitki türüdür (5). Yapısında yüzden fazla biyolojik aktif bileşik bulunduğu rapor edilen (6) CP'nin biyoaktivitesi ile ilgili yapılan araştırmalarda CP ekstraktlarının antimikrobiyal, antiflojistik ve hepatoprotektif aktivitelere sahip olduğu belirlenmiştir (8). CP sulu ekstraktının doza bağımlı olarak *in vitro* fare ve insan midesi antrumunda düz kas kontraksiyonlarını indüklediği rapor edilmiştir (13). CP'nin yapısında bulunan flavonoidlerin ileum üzerinde gevşetici etkili oldukları, aynı zamanda bu flavonoidlerin izole kobay ileumunda  $Ca^{2+}$ un hücre içine akımını bloke ederek spazmolitik etki gösterdikleri belirlenmiştir (14,15). Yaptığımız bu çalışmada, ACh ve KCl ile indüklenen *in vitro* rat mesanesi düz kas kontraktilesi üzerine CP metanol ekstraktı ve CP'nin yapısında bulunan Luteolin bileşiğinin muhtemel etkileri araştırıldı.

Çalışmamızda KCl'nin farklı dozları ile kümülatif indüklenen kontraksiyon cevaplarının CP metanol ekstraktının bazı dozları tarafından inhibe edildiği belirlendi. CP ekstraktının farklı dozlarının KCl ile indüklenen kontraksiyon cevaplarını azaltıcı etkisinin voltaja duyarlı L tipi  $Ca^{2+}$  kanalları üzerinden olduğu düşünülmektedir. Çünkü düz kas kontraksiyonları KCl ile indüklendiği zaman ortamda potasyum ( $K^+$ ) yoğunluğunun artmasına bağlı olarak kas fiberlerinde depolarizasyon oluşmaktadır. Kas fiberlerinde meydana gelen depolarizasyon voltaja duyarlı L tipi  $Ca^{2+}$  kanallarının açılmasına sebep olur. Voltaja duyarlı  $Ca^{2+}$  kanallarının açılması aracılığı ile de ekstrasellüler alandan hücre içine  $Ca^{2+}$  girişi meydana gelmektedir (24). Ayrıca hücre içi  $Ca^{2+}$  konsantrasyonunun artmasına bağlı olarak hücre içi  $Ca^{2+}$  depoları olan sarkoplazmik retikulumlardan  $Ca^{2+}$  serbest bırakılarak hücre içi  $Ca^{2+}$  konsantrasyonu daha da artırılmaktadır (25). Bu olaylar sonucunda düz kasta kasılma meydana gelmektedir. KCl'nin etkisini özellikle  $Ca^{2+}$  kanalları üzerinden gerçekleştiğinden ve CP ekstraktı KCl ile indüklenen kontraksiyonları inhibe ettiğinden çalışmamızda Nifedipin pozitif kontrol olarak kullanıldı ve Nifedipin

ile CP ekstraktının, KCl ile indüklenen mesane düz kas kontraksiyon cevaplarını eşit derecede azalttıkları görüldü. Nifedipin ile CP ekstraktının en yüksek dozunu banyoya birlikte uyguladığımızda, KCl ile indüklenen kontraksiyon cevaplarını daha güçlü bir şekilde azalttıkları belirlendi. Bu durumda CP ekstraktı ile Nifedipin'in birlikte kullanımının etki güçlenmesine neden olabileceği düşünüldü. Bulgularımıza paralel olarak Moradi ve ark. (26) CP etanol ekstraktının 60 mM KCl ile indüklenen izole rat ileum düz kas kontraksiyon cevaplarını azalttığını belirlemişler ve bu etkinin voltaja duyarlı L tipi  $Ca^{2+}$  kanalları üzerinden olduğunu belirtmişlerdir.

Ürinsasyon esnasında parasempatik kolinerjik sinirlerden, mesane düz kasındaki muskarinik reseptörler üzerindeki bazı bölgelerden ve ürotelyum içinde bulunan non-nöronal hücrelerden ACh salınımı olmaktadır. ACh'nın salınımı sonucunda mesane düz kasında güçlü kontraksiyonlar meydana gelmektedir (27). ACh salınımı, presinaptik sinir terminallerinde bulunan muskarinik 1 ( $M_1$ ) reseptörlerinin uyarılması sonucunda artarken, muskarinik 2 ( $M_2$ ) ve muskarinik 4 ( $M_4$ ) reseptörlerinin uyarılması ile azalmaktadır (28). ACh salınımına neden olan bir diğer etken ise ürotelyumun gerilmesidir. Mesanenin dolma fazında ürotelyum belli bir gerime ulaştığı zaman, ACh salınımı olmakta ve ürinsasyon kontraksiyonları başlatılmaktadır. ACh, muskarinik 3 ( $M_3$ ) reseptörlerine bağlandığı zaman fosfolipaz C aktive olarak inozitol trifosfat (IP3) oluşumuna neden olmaktadır. IP3 ise sarkoplazmik retikulumdan  $Ca^{2+}$  salınımını uyararak kalmodulinin konformasyonel değişime uğramasına yol açmaktadır. Kalmodulinin konformasyonel değişime uğraması sonucunda mesane düz kasında kasılma meydana gelmektedir. Bu mekanizmanın yanı sıra, ACh  $M_3$  reseptörlerine bağlandığı zaman, voltaja duyarlı L tipi  $Ca^{2+}$  kanallarından hücre içine  $Ca^{2+}$  girişini artırarak, mesane düz kasının kasılmasını sağlamaktadır (29). Çalışmamızda, CP metanol ekstraktının en düşük dozunun, ACh dozlarının cevaplarını önemli ölçüde değiştirmedeği tespit edildi. Niazmand ve Saberi (30) yaptıkları çalışma neticesinde CP aköz-etanolik

ekstraktının 0.125 mg/ml dozunun izole rat kalp kası kontraktilitelerini önemli bir şekilde azalttığını belirlemişlerdir. Çalışmamızda CP metanol ekstraktının diğer üç dozunun ise ACh'nın bazı dozlarının cevaplarını azalttıkları belirlendi. Babaei ve ark. (16) yapmış oldukları çalışma ile CP'nin hidroalkolik ekstraktının farklı dozlarının, *in vitro* kobay ileum düz kas kontraksiyonlarını doza bağımlı olarak baskıladıklarını belirlemişlerdir. Borrelli ve ark. (12) ise, CP sulu ekstraktının *in vitro* fare antrum mide düz kas kontraktilitelerini indüklediğini rapor etmişlerdir. Moradi ve ark. (26) CP etanol ekstraktının ACh ile indüklenen izole rat ileum düz kas kontraksiyon cevaplarını azalttığını belirlemişlerdir. CP ekstraktının farklı dozlarının ACh cevaplarını azaltıcı etkisi  $M_3$  reseptör yolağı, voltaja duyarlı L tipi  $Ca^{2+}$  kanalı yolağı veya her iki yolak üzerinden olabilir. CP ekstraktının voltaja duyarlı L tipi  $Ca^{2+}$  kanalları üzerinden etkili olabileceği, KCl ile indüklenen mesane düz kas kontraksiyonları üzerine CP ekstraktının etkisi çalışılarak belirlendi. CP ekstraktının voltaja duyarlı L tipi  $Ca^{2+}$  kanalları üzerinden etkisinin olmasının yanı sıra,  $M_3$  reseptör yolağı üzerinden de etkili olarak ACh ile indüklenen mesane düz kas kontraksiyon cevaplarını azalttığını belirlemek için voltaja duyarlı L tipi  $Ca^{2+}$  kanal blokörü Nifedipin kullanıldı. Nifedipin ile  $Ca^{2+}$  kanalları kapatılarak  $M_3$  yolağı açık bırakıldı. Böylece CP ekstraktının  $M_3$  reseptör yolağı üzerinden de etkili olması durumunda, CP ekstraktının ACh ile indüklenen mesane düz kas kontraksiyon cevapları üzerine Nifedipin'nin etkisinden daha fazla bir gevşetici etki göstermesi beklendi. Banyoda  $10^{-7}$  M Nifedipin varlığında  $10^{-4}$  M ACh'ya verilen cevapla, banyoda Nifedipin+CP ekstraktı varlığında ACh cevapları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olduğu belirlendi. Dolayısıyla, CP ekstraktının ACh ile indüklenen mesane düz kas kontraktıl cevaplarını azaltıcı etkisinin, voltaja duyarlı L tipi  $Ca^{2+}$  kanallarının yanı sıra  $M_3$  reseptör yolağı üzerinden de olabileceği düşünüldü.

Luteolin'in en yüksek dozunun KCl ile indüklenen kontraksiyon cevaplarını ekseriyetle



azalttığını belirledik. KCl ile indüklenen kontraksiyonlar üzerine Luteolin'in etki mekanizmasının da araştırıldığı çalışmamızda Nifedipin pozitif kontrol olarak kullanıldı ve KCl ile indüklenen mesane düz kas kontraksiyon cevaplarını Luteolin'in Nifedipin'den daha fazla azalttığı belirlendi. Ayrıca Nifedipin ile Luteolin'in birlikte kullanımının herhangi bir etki güçlenmesine neden olmadığı görüldü. Daha önce yapılmış bir çalışmada Luteolin'in *in vitro* rat vaz deferensinde, kobay ileumu ve trakeasında antispazmodik aktiviteye sahip olduğu belirlenmiştir (31). Luteolin'in ratlarda kan basıncını düşürücü etkisinin olduğu (32) ve köpeklerde koroner arter direncini azaltarak koroner arterlere kan akışını artırdığı (33) bilinmektedir. Yine Luteolin'in rat torasik aortasında vazodilatasyonu indüklediği ifade edilmektedir (34). Başka bir çalışmada ise, Luteolin'in KCl ile indüklenen *in vitro* rat aort düz kas şeritlerinde kontraksiyon cevaplarını azalttığı ve vazodilatatör etkiye sahip olduğu belirlenmiştir. Bu etkinin ise hücre dışından hücre içine  $Ca^{2+}$  alımının azalmasından olabileceği ifade edilmiştir (35). Bu çalışmaya benzer farklı bir araştırmada ise, Luteolin'in rat torasik aortasında vazorelaksasyona neden olduğu ve bu etkinin Luteolin'in  $K^+$  kanallarının aktivasyonunu ve sarkolemmal  $Ca^{2+}$  kanallarını inhibe ederek gerçekleştirdiği belirlenmiştir (36). Bizim çalışmamızın bulguları literatüre paralel olarak Luteolin'in kontraksiyonları inhibe edici etkisinin  $Ca^{2+}$  kanalları aracılığıyla olduğu belirlenmiştir.

Luteolin'in bazı dozlarının ACh cevaplarını azalttığını belirlediğimiz bu çalışmamıza benzer şekilde yapılan başka bir çalışmada, Luteolin'in ACh ile indüklenen *in vitro* kobay ileum düz kas kontraksiyon cevaplarını %45 civarında azalttığı belirlenmiştir. Yine bu çalışmada Luteolin'in baryum iyonu tarafından indüklenen *in vitro* kobay trakea düz kas kontraksiyon cevaplarını doza bağlı olarak azalttığı rapor edilmiştir (37). Luteolin'in, ACh cevaplarını azaltıcı etkisinin muhtemel mekanizmalarından birisi Luteolin'in  $M_3$  reseptör yolağını inhibe ederek kontraksiyon cevaplarını

azaltmasıdır. Bunun yanı sıra Luteolin voltaja duyarlı L tipi  $Ca^{2+}$  kanallarını bloke ederek ekstrasellüler bölgeden hücre içine  $Ca^{2+}$  girişini veya sarkolemmal  $Ca^{2+}$  kanallarını inhibe ederek hücre içi  $Ca^{2+}$  depolarından  $Ca^{2+}$  salınımını engelleyebilir. Luteolin'in, voltaja duyarlı L tipi  $Ca^{2+}$  kanalları üzerinden etkili olabileceği, KCl ile indüklenen mesane düz kas kontraksiyonları üzerine Luteolin'in etkisi çalışılarak belirlendi. Luteolin'in voltaja duyarlı L tipi  $Ca^{2+}$  kanalları üzerinden etkisinin olmasının yanı sıra,  $M_3$  reseptör yolağı üzerinden de etkili olup olmadığını belirlemek için, voltaja duyarlı L tipi  $Ca^{2+}$  kanal blokörü Nifedipin kullanıldı. Nifedipin ile  $Ca^{2+}$  kanalları kapatılarak  $M_3$  yolağı açık bırakıldı. Böylece Luteolin'in  $M_3$  reseptör yolağı üzerinden etkili olması durumunda, ACh ile indüklenen mesane düz kas kontraksiyon cevapları üzerine Nifedipin'in etkisinden daha fazla bir gevşetici etki göstermesi beklendi. Banyoda Nifedipin varlığında alınan ACh cevapları ile Luteolin ve Nifedipin'in birlikte varlığında alınan cevaplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığı belirlendi. Dolayısıyla, Luteolin'in ACh ile indüklenen *in vitro* mesane düz kas kontraktıl cevaplarını azaltıcı etkisinin,  $M_3$  reseptör yolağı üzerinden olamayacağı kanısına varıldı.

Sonuç olarak hem CP ekstraktının hem de Luteolin'in bazı dozlarının ACh ve KCl ile indüklenen izole detrüsor düz kas kontraksiyon cevaplarını anlamlı ölçüde inhibe ettikleri, CP ekstraktının bu etkisini L tipi  $Ca^{2+}$  kanalları ve  $M_3$  reseptör yolağı üzerinden, Luteolin'in ise kontraksiyonları inhibe edici etkisini L tipi  $Ca^{2+}$  kanalları üzerinden gerçekleştirdiği belirlendi.

#### KAYNAKLAR

1. Passalacqua N., Guarrera P., De Fine G., 2007. Contribution to the knowledge of the folk plant medicine in Calabria region (Southern Italy). *Fitoterapia*, 78, 52-68.
2. Pieroni A., Quave CL., 2005. Traditional pharmacopoeias and medicines among Albanians and Italians in southern Italy: A comparison. *J Ethnopharmacol*, 101, 258-270.

3. Judzentiene A., 2016. Atypical Chemical Profiles of Wild Yarrow (*Achillea millefolium* L.) Essential Oils. *Rec Nat Prod*, 10, 262-268.
4. Nematy M., Mazidi M., Jafari A., Baghban S., Rakhshandeh H., Norouzy A., Esmaily H., Etemad L., Patterson M., Mohammadpour AH., 2017. The effect of hydro-alcoholic extract of *Achillea millefolium* on appetite hormone in rats. *Avicenna J Phytomed*, 7, 10-15.
5. Lakshmi T., Geetha R., Roy A., Aravind Kumar S., 2011. Yarrow (*Achillea millefolium* Linn.) A Herbal Medicinal Plant with Broad Therapeutic Use-A Review. *Int J Pharm Sci Rev Res*, 9, 136-141.
6. Nemeth E., Bernath J., 2008. Biological activities of yarrow species (*Achillea* spp.). *Curr Pharm Des*, 14, 3151-3167.
7. Barut N., Barut B., Engin S., Yıldırım S., Yaşar A., Türkiş S., Özel A., Sezen FS., 2017. Antioxidant capacity, anti-acetylcholinesterase activity and inhibitory effect on lipid peroxidation in mice brain homogenate of *Achillea millefolium*. *Turk J Biochem*, 42, 493-502.
8. Ahmadi-Dastgerdi A., Ezzatpanah H., Asgary S., Dokhani S., Rahimi E., 2017. Phytochemical, antioxidant and antimicrobial activity of the essential oil from flowers and leaves of *Achillea millefolium* subsp. *millefolium*. *J Essent Oil Bear PI*, 20, 395-409.
9. Yaeesh S., Jamal Q., Khan AU., Gilani AH., 2006. Studies on hepatoprotective, antispasmodic and calcium antagonist activities of the aqueous-methanol extract of *Achillea millefolium*. *Phytother Res*, 20, 546-551.
10. Khan AU., Gilani AH., 2011. Blood pressure lowering, cardiovascular inhibitory and bronchodilatory actions of *Achillea millefolium*. *Phytothe Res*, 25, 577-583.
11. Ali SI., Gopalakrishnan B., Venkatesalu V., 2017. Pharmacognosy, phytochemistry and pharmacological properties of *Achillea millefolium* L.: A Review. *Phytother Res*, 31, 1140-1161.
12. Borrelli F., Romano B., Fasolino I., Tagliatella-Scafati O., Aprea G., Capasso R., Capasso F., Coppola Bottazzi E., Izzo A., 2012. Prokinetic effect of a standardized yarrow (*Achillea millefolium*) extract and its constituent choline: studies in the mouse and human stomach. *J Neurogastroenterol Motil*, 24,164-190.
13. Benedek B., Gjoncaj N., Saukel J., Kopp B., 2007. Distribution of phenolic compounds in middleeuropean taxa of the *Achillea millefolium* L. aggregate. *Chem Biodivers*, 4, 849-857.
14. Barnes J., Anderson LA., Phillipson JD., 2003. *Herbal Medicines: A Guide for Healthcare Professionals*. Pharmaceutical Press, London.
15. Lemmens-Gruber R., Marchart E., Rawnduzi P., Engel N., Benedek B., Kopp B., 2006. Investigation of the spasmolytic activity of the flavonoid fraction of *Achillea millefolium* on isolated guinea-pig ilea. *Arzneimittelforschung*, 56, 582-588.
16. Babaei M., Abarghoei ME., Akhavan MM., Ansari R., Vafaei AA., Taherian AA., Mousavi S., Toussy J., 2007. Antimotility effect of hydroalcoholic extract of yarrow (*Achillea millefolium*) on the guinea-pig ileum. *Pak J Biol Sci*, 10, 3673-3677.
17. Packer L., Sies H., 2001. *Flavonoids and Other Polyphenols: Methods in Enzymology*. Academic Press, Cambridge, Massachusetts.
18. Kasala ER., Bodduluru LN., Barua CC., Gogoi R., 2016. Antioxidant and antitumor efficacy of Luteolin, a dietary flavone on benzo (a) pyrene-induced experimental lung carcinogenesis. *Biomed Pharmacother*, 82, 568-577.
19. Naso LG., Lezama L., Valcarcel M., Salado C., Villace P., Kortazar D., Ferrer EG., Williams PA., 2016. Bovine serum albumin binding, antioxidant and anticancer properties of an oxidovanadium (IV) complex with luteolin. *J Inorg Biochem*, 157, 80-93.
20. Lemanska K., van der Woude H., Szymusiak H., Boersma MG., Gliszczynska-Swiglo A., Rietjens IM., Tyrakowska B., 2004. The effect of catechol O-methylation on radical scavenging characteristics of quercetin and Luteolin-A

- mechanistic insight. *Free Radic Res*, 38, 639-647.
21. Qi L., Pan H., Li D., Fang F., Chen D., Sun H., 2011. Luteolin improves contractile function and attenuates apoptosis following ischemia-reperfusion in adult rat cardiomyocytes. *Eur J Pharmacol*, 668, 201-207.
  22. Philyppov IB., Paduraru ON., Gulak KL., Skryma R., Prevarskaya N., Shuba YM., 2016. TRPA1-dependent regulation of bladder detrusor smooth muscle contractility in normal and type I diabetic rats. *J Smooth Muscle Res*, 52, 1-17.
  23. Şengül E., Çelebi F., Gelen V., Çınar A., 2017. The effects of *rosmarinus officinalis* (rosemary) aqueous extract on smooth muscle contractions in isolated rat urinary bladder. *Atatürk Üniversitesi Vet Bil Derg*, 12, 130-136.
  24. Karaki H., Ozaki H., Hori M., Mitsui-Saito M., Amano KI., Harada KI., Miyamoto S., Nakazawa H., Won KJ., Sato K., 1997. Calcium movements, distribution, and functions in smooth muscle. *Pharmacol Rev*, 49, 157-230.
  25. Anderson KE., 1993. Pharmacology of lower urinary tract smooth muscles and penile erectile tissues. *Pharmacol Rev*, 45, 253-308.
  26. Moradi M., Rafieian-Koupaei M., Imani-Rastabi R., Nasiri J., Shahrani M., Rabiei Z., Alibabaei Z., 2013. Antispasmodic effects of yarrow (*Achillea millefolium* L.) extract in the isolated ileum of rat. *Afr J Tradit Complement Altern Med*, 10, 499-503.
  27. Abrams P., Andersson KE., Buccafusco JJ., Chapple C., Groat WC., Fryer AD., Kay G., Laties A., Nathanson NM., Pasricha PJ., 2006. Muscarinic receptors: Their distribution and function in body systems, and the implications for treating overactive bladder. *Br J Pharmacol*, 148, 565-578.
  28. Chess-Williams R., 2002. Muscarinic receptors of the urinary bladder: detrusor, urothelial and prejunctional. *Auton Autacoid Pharmacol*, 22, 133-145.
  29. Andersson KE., Wein AJ., 2004. Pharmacology of the lower urinary tract: basis for current and future treatments of urinary incontinence. *Pharmacol Rev*, 56, 581-631.
  30. Niazmand S., Saberi Z., 2010. The chronotropic and inotropic effects of aqueous-ethanolic extract of *Achillea millefolium* on rat's isolated heart. *Pharmacologyonline*, 3, 791-798.
  31. Van Den Broucke C., Lemli J., 1983. Spasmolytic activity of the flavonoids from *Thymus vulgaris*. *Pharm Weekbl*, 5, 9-14.
  32. Wang L., Han C., Wang P., 1986. Experimental study on hypotensive effect of semi-synthesis luteolin. *Chin Pharmacol Bull*, 2, 34-36.
  33. Wang L., Han C., Wang P., 1992. Experiment research on luteolin affecting coronary circulation dynamics. *Chin Pharmacol Bull*, 8, 388-390.
  34. Chan EC., Pannangpetch P., Woodman OL., 2000. Relaxation to flavones and flavonols in rat isolated thoracic aorta: mechanism of action structure-activity relationships. *J Cardiovasc Pharmacol*, 35, 326-333.
  35. Duarte J., Vizcaino FP., Utrilla P., Jimenez J., Tamargo J., Zarzuelo A., 1993. Vasodilatory effects of flavonoids in rat aortic smooth muscle. Structure-activity relationships. *Gen Pharmacol: The Vascular System*, 24, 857-862.
  36. Jiang H., Xia Q., Wang X., Song J., Bruce IC., 2005. Luteolin induces vasorelaxation in rat thoracic aorta via calcium and potassium channels. *Pharmazie - Int J Pharm Sci*, 60, 444-447.
  37. Fleer H., Verspohl E., 2007. Antispasmodic activity of an extract from *Plantago lanceolata* L. and some isolated compounds. *Phytomedicine*, 14, 409-415.