



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



***FERULA ELAEOCHYTRIS* KOROVİN VE *FERULA COMMUNIS* L.
BİTKİLERİNİN FARMAKOGNOZİK AÇIDAN ARAŞTIRILMASI VE *FERULA*
ELAEOCHYTRIS KOROVİN BİTKİSİNDEN HAZIRLANAN EKSTRELERİN
EREKTİL DİSFONKSİYON ÜZERİNDE ETKİSİNİN *İN VİVO* VE *İN VİTRO*
ARAŞTIRILMASI**

Ali Rifat GÜLPINAR

**FARMAKOGNOZİ ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ**

**DANIŞMAN
Prof. Dr. Murat KARTAL**

**ANKARA
2018**

**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

***FERULA ELAEOCHYTRIS* KOROVİN VE *FERULA COMMUNIS* L.
BİTKİLERİNİN FARMAKOGNOZİK AÇIDAN ARAŞTIRILMASI VE *FERULA*
ELAEOCHYTRIS KOROVİN BİTKİSİNDEN HAZIRLANAN EKSTRELERİN
EREKTİL DİSFONKSİYON ÜZERİNDE ETKİSİNİN *İN VİVO* VE *İN VİTRO*
ARAŞTIRILMASI**

Ali Rifat GÜLPINAR

**FARMAKOGNOZİ ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ**

DANIŞMAN

Prof. Dr. Murat KARTAL

Bu araştırma Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Müdürlüğü'nün 16H0237024
proje numarası ile desteklenmiştir.

ANKARA

2018

Ankara Üniversitesi

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne,

Doktora Tezi olarak hazırlayıp sunduğum “*Ferula elaeochytris* Korovin ve *Ferula communis* L. Bitkilerinin Farmakognozik Açıdan Araştırılması ve *Ferula elaeochytris* Korovin Bitkisinden Hazırlanan Ekstrelerin Erektile Disfonksiyon Üzerinde Etkisinin *İn vivo* ve *İn Vitro* Araştırılması” başlıklı tez; bilimsel ahlak ve değerlere uygun olarak tarafımdan yazılmıştır. Tezimin hipotezi tümüyle tez danışmanım ve bana aittir. Tezde yer alan deneysel araştırma tarafımdan yapılmış olup, tüm cümleler, yorumlar bana aittir.

Yukarıda belirtilen hususun doğruluğunu beyan ederim.

Öğrencinin Adı Soyadı:

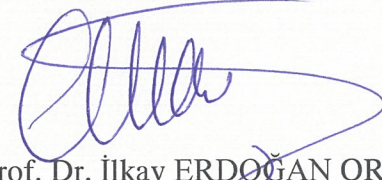
Tarih:

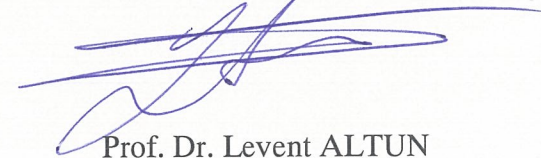
İmza:

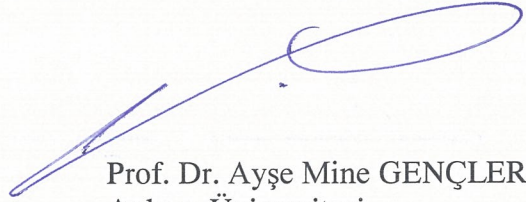
Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Farmakognozi Anabilim Dalında
Ali Rifat GÜLPINAR tarafından hazırlanan
“*Ferula elaeochytris* Korovin ve *Ferula communis* L. Bitkilerinin Farmakognozik
Açıdan Araştırılması ve *Ferula elaeochytris* Korovin Bitkisinden Hazırlanan
Ekstrelerin Erektile Disfonksiyon Üzerinde Etkisinin *İn Vivo* ve *İn Vitro*
Araştırılması” adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından DOKTORA TEZİ olarak
OY BİRLİĞİ / OY ÇOKLUĞU ile kabul edilmiştir.

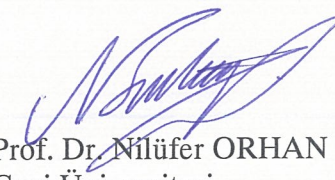
Tez savunma tarihi: 18/12/2018


Prof. Dr. Murat KARTAL
Ankara Üniversitesi
Jüri Başkanı


Prof. Dr. İlkay ERDOĞAN ORHAN
Gazi Üniversitesi
Eczacılık Fakültesi


Prof. Dr. Levent ALTUN
Ankara Üniversitesi
Eczacılık Fakültesi


Prof. Dr. Ayşe Mine GENÇLER ÖZKAN
Ankara Üniversitesi
Eczacılık Fakültesi


Prof. Dr. Nilüfer ORHAN
Gazi Üniversitesi
Eczacılık Fakültesi

Tez hakkında alınan jüri kararı, Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Yönetim Kurulu tarafından onaylanmıştır.

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

İÇİNDEKİLER

Etik Beyan	ii
Kabul ve Onay	iii
İçindekiler	iv
Önsöz	vii
Simgeler ve Kısaltmalar	x
Şekiller	xiii
Çizelgeler	xviii
1. GİRİŞ	
1.1. Genel Bilgiler	1
1.1.1. Ereksiyon Anatomisi ve Mekanizmaları	2
1.1.2. Erektile Disfonksiyonun Tanımı, Epidemiyolojisi ve Nedenleri	6
1.1.3. ED Tanısı ve Tedavi Seçenekleri	7
1.2. Botanik Bilgiler	10
1.2.1. Sistematikteki Yeri	10
1.2.2. Apiaceae Familyası	10
1.2.3. <i>Ferula</i> L. Cinsinin Genel Özellikleri	11
1.2.4. <i>Ferula</i> Türlerinin Yayılışı	12
1.2.4.1. Türkiye’de Yetişen <i>Ferula</i> Taksonları	13
1.2.5. Tez Çalışmasında Yer Alan <i>Ferula</i> Türlerinin Botanik Özelliği	14
1.2.5.1. <i>Ferula communis</i> subsp. <i>communis</i> L.	14
1.2.5.2. <i>Ferula elaeochytris</i> Korovin	15
1.3. <i>Ferula</i> Türleri Üzerinde Daha Önce Yapılan Çalışmalar	16
1.3.1. Fitokimyasal Çalışmalar	16
1.3.1.1. <i>Ferula</i> Türlerinde Bulunan Başlıca Kimyasal Bileşikler	16
1.3.1.2. <i>Ferula</i> Türlerinden Elde Edilen Seskiterpen Daukan Esterleri	18
1.3.1.3. Ferulozis Olgusu ve <i>Ferula communis</i> ’in Toksik ve Toksik Olmayan Kemotiplerinin Ayrımı	21
1.3.2. Biyolojik Aktivite Çalışmaları	23
1.3.2.1. <i>İn vitro</i> Çalışmalar	23
1.3.2.2. <i>İn vivo</i> Çalışmalar	27
1.3.2.3. Klinik Çalışmalar	34
1.4. Majör Daukan Esteri Ferutinin Biyolojik Aktivitedeki Rolü	34
2. GEREÇ VE YÖNTEM	
2.1. Gereç	39
2.1.1. Bitkisel Materyal	39
2.1.3. Kullanılan Standart Maddeler	39
2.2. Yöntem	45
2.2.1. Fitokimyasal Yöntemler	45
2.2.1.1. Açık Kolon Kromatografisi ve Biyolojik Aktivite Deneyleri İçin Ekstre Hazırlanması	45
2.2.1.2. İnce Tabaka Kromatografisi (İTK)	46
2.2.1.3. YPSK Analizleri İçin Bitkisel Materyalin Ekstraksiyonu	46
2.2.1.4. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (YPSK/HPLC) ve Yöntem Validasyonu	46

2.2.1.5.	Açık Kolon Kromatografisi	48
2.2.1.6.	Orta Basıncılı Sıvı Kromatografisi (OBSK/MPLC)	49
2.2.2.	İzolasyon ve Yapı Tayin Çalışmaları	50
2.2.2.1.	Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi – Kütle Spektrometrisi (SK- KS/LC-MS)	50
2.2.2.2.	Nükleer Manyetik Rezonans Spektroskopisi (NMR)	51
2.2.3.	Biyolojik Aktivite Çalışmaları	51
2.2.3.1.	Kullanılan Araç ve Gereçler	51
2.2.3.2.	Kullanılan Kimyasallar	52
2.2.3.3.	Deney Hayvanları	53
2.2.3.4.	<i>İn vivo</i> Deneyler	53
2.2.3.5.	<i>İn vitro</i> Deneyler	54
2.2.3.6.	Elde Edilen Verilerin İstatistiksel Analizi	55
3.	BULGULAR	
3.1.	İTK Uygulamalarına Ait Bulgular	56
3.2.	YPSK Analizleri ve Yöntem Validasyonuna Ait Bulgular	56
3.2.1.	Kalibrasyon Grafiği ve Denkleminin Oluşturulması	56
3.2.2.	Validasyon Parametreleri	58
3.2.2.1.	Sistem Uygunluk Testleri	59
3.2.2.2.	Özgüllük	60
3.2.2.3.	Doğrusallık	61
3.2.2.4.	Çalışma Aralığı	61
3.2.2.5.	Teşhis Sınırı (LOD) ve Tayin Sınırı (LOQ)	62
3.2.2.6.	Doğruluk	62
3.2.2.7.	Kesinlik	64
3.2.3.	<i>F. elaeochoytris</i> ve <i>F. communis</i> subsp. <i>communis</i> bitkilerinin farklı kısım ve ekstrelerinde YPSK ile ferutinin miktar tayini	65
3.2.4.	<i>F. elaeochoytris</i> ve <i>F. communis</i> subsp. <i>communis</i> bitkilerinin farklı kısım ve ekstrelerinde YPSK ile ferulenol teşhisi	66
3.3.	Açık Kolon Kromatografisine Ait Bulgular	68
3.6.	Orta Basıncılı Sıvı Kromatografisine (OBSK/MPLC) Ait Bulgular	71
3.6.1.	Grup 16 ile OBSK Uygulaması	72
3.6.2.	Grup 19 ile OBSK Uygulaması	72
3.7.	İzolasyon ve Yapı Tayin Çalışmalarına Ait Bulgular	74
3.7.1.	Ferutinin Bileşiği ile İlgili Yapı Tayin Bulguları	74
3.7.2.	M2 (Ferutanol p-kumarat) Bileşiği ile İlgili Yapı Tayin Bulguları	85
3.8.	<i>İn vivo</i> ve <i>İn vitro</i> Deneyler	96
3.8.1.	<i>İn vivo</i> Deneyler	96
3.8.1.1.	ICP/MAP Bulguları	98
3.8.1.2.	Toplam ICP Bulguları	102
3.8.2.	<i>İn vitro</i> Gevşeme Yanıtı Bulguları	108
4.	TARTIŞMA	115
5.	SONUÇ VE ÖNERİLER	119
	ÖZET	122
	SUMMARY	123
	KAYNAKLAR	124
	EKLER	134
	Ek-1. Bitki Toplama İzin Yazısı.	131

Ek-2. Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Kararı	132
Ek-3. Ankara Üniversitesi BAP Koordinatörlüğü Proje Rapor Kabul Yazısı	134
ÖZGEÇMİŞ	135



ÖNSÖZ

Ferula cinsi ülkemizde 20 civarında takson ile temsil edilmektedir. Bu tür ve alt türlerden bir kısmı ülkemiz halk tıbbında kadın hastalıkları, diyabet, kolesterol ve mide ağrısı ve cinsel sorunlar gibi çeşitli hastalıkların tedavisinde kullanılmaktadır. Dünyada ise geniş yayılım göstermekte ve yine benzer etkilerinden geleneksel olarak faydalanılmaktadır. Geleneksel tedavi sistemleri ve halk tababetinin yanında özellikle *F. communis* tarihsel bir öneme sahiptir. Yunan mitolojisinde, Prometheus'un tanrılar kralı Zeus tarafından yasaklanmış olmasına rağmen bilgi ateşini gövdesinin içinde saklamak suretiyle insanlığa ulaştırdığı bitkidir *F. communis*. Yunan mitolojisindeki adı ise Narteks (Narhex) olarak bilinmektedir. *F. elaeocyhtris* Hatay ili Yayladağ ilçesinde Suriye sınırında bulunan Keldağ mevkiinde yetişmekte olan ve halk arasında afrodizyak olarak bilinen ve kullanılan bir bitkidir.

Bu tez çalışmasında ülkemizde yetişen ve cinsel gücü artırmak amacıyla halk ilacı olarak yaygın bir şekilde kullanılan *F. elaeocyhtris* ve doğal habitat olarak daha geniş alana yayılan ve kültüre elverişlilik açısından önem teşkil eden *F. communis* bitkilerinin toprakaltı kısımlarının erektil disfonksiyon tedavisindeki potansiyelleri, fitokimyasal olarak ve biyoaktivite yönünden (*in vitro* ve *in vivo* testlerle) değerlendirilmiştir. Çalışmanın sonunda elde edilen bulguların öncelikle halk sağlığına, ülkemiz ekonomisine ve çağdaş bilime katkıda bulunması ümit edilmektedir.

2006 yılında henüz lisans mezunu değilken özel öğrenci olarak başladığım Farmakognozi yolculuğumda ilk günkü heyecanıma ve bugün sahip olduğum vizyona en önemli katkının sahibi değerli danışmanım, hocam, ağabeyim Sayın Prof. Dr. Murat KARTAL'a sonsuz saygılarımı ve şükranlarımı sunarım.

Yine 2006 yılından bugüne, gerek akademik gerek profesyonel hayatta bilgisini, tecrübesini ve desteğini benden esirgemeyen, değerli yardımcı danışmanım, hocam, hemşehrim, ablam Sayın Doç. Dr. Sinem ASLAN ERDEM'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Başta Anabilim Dalı Başkanımız Sayın Prof. Dr. M. Levent ALTUN olmak üzere, üzerimde emeği olan Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmakognozi ABD'nin gelmiş geçmiş tüm değerli öğretim üyelerine, değerli çalışma arkadaşlarıma, Anabilim Dalımızın geleceği olan araştırma görevlisi kardeşlerime ve idari personelimize çalışmalarındaki destekleri ve şahsıma gösterdikleri sevgi ve saygı için sonsuz saygı, sevgi ve teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışması kapsamında arazideki tecrübe ve bilgisini esirgemeyen ve doğadan toplanan bitkisel materyalin teşhisini gerçekleştiren değerli hocam Gazi Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü öğretim üyesi Sayın Prof. Dr. Hayri DUMAN'a sonsuz teşekkürlerimi ve saygılarımı sunarım.

Tez çalışmamın botanik kısmında bilgi ve tecrübesine başvurduğum Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Botanik ABD öğretim üyesi, değerli hocam Sayın Prof. Dr. Ceyda Sibel KILIÇ'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Başta Anabilim Dalı Başkanı Sayın Prof. Dr. Ayşe Mine ÖZKAN olmak üzere Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Botanik ABD'nin gelmiş geçmiş tüm değerli öğretim üyelerine, araştırma görevlilerine ve idari personeline teşekkürlerimi sunarım.

Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Herbaryumu'nda desteklerini esirgemeyen Sayın Dr. Bio. Gülderen YILMAZ'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmasında hayvan deneylerini birlikte yürüttüğümüz, değerli hocam Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmakoloji ABD öğretim üyesi Sayın Prof. Dr. Serap GÜR'e desteklerinden ve akademik gelişimime katkılarından dolayı sonsuz teşekkürlerimi sunarım. Hayvan deneylerinde beraber çalışma şansını yakaladığım deneyimi ve çalışkanlığı ile bu tez çalışmasında büyük katkısı bulunan değerli arkadaşım Sayın Dr. Ecz. Didem YILMAZ ORAL'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım. Yine hayvan deneylerinde beraber çalışma şansını yakaladığım değerli

kardeşim Sayın Ecz. Gökhan KÖROĞLU'na destekleri için teşekkür ederim. Ayrıca kendi laboratuvarımdaymışım gibi rahat bir çalışma ortamı sağlayan Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmakoloji ABD'na, tüm öğretim üyelerine, araştırma görevlilerine ve başta Sayın İsmail BAŞER olmak üzere tüm idari personeline sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Yapı tayini çalışmalarında kütle spektroskopisi ve NMR spektroskopisi konusunda bilgi ve tecrübesini esirgemeyen ve kaliteli analizler gerçekleştiren Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Merkez Laboratuvar sorumlusu Sayın Prof. Dr. Ali Hakan GÖKER'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmam boyunca desteğini ve sevgisini her zaman hissettiğim aynı zamanda akademik anlamda yeni ufuklara açılmamı sağlayan değerli eşim, ailem, Oya'mın güzel annesi Dr. Ecz. Gizem GÜLPINAR'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Yirmi yıldır babalık sorumluluğunu da yüklenerek bugünlere gelmemdeki en büyük emeğin sahibi, ilk öğretmenim, arkadaşım, değerli annem H. Nurcan GÜLPINAR'a, çok erken kaybetmiş olsam da güzel ahlak ve dürüstlüğün kıymetini bana öğreten, sevgisini taptaze kalbimde taşıdığım babam Mustafa GÜLPINAR'a, yoluma ışık olan, varlıkları ile daha güçlü hissettiğim değerli ağabeylerim Uzm. Dr. Mete GÜLPINAR'a, Doç. Dr. Kamil GÜLPINAR'a ve Doç. Dr. Ömer GÜLPINAR'a sonsuz teşekkürlerimi ve minnetlerimi sunarım.

Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Teknoloji A.D.'ndan değerli kardeşim Dr. Ecz. Umut Can ÖZ'e destekleri için sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmalarım nedeniyle eczanemden ayrılmam gerektiği zamanlarda dürüstlük ve çalışkanlıklarıyla gözümün arkada kalmamasını sağlayan değerli çalışma arkadaşlarım, Yusuf AKSAY'a, Ahmet GÜLER'e ve Ecz. Zehra TORUN'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

SİMGELER VE KISALTMALAR

-C=O	Karbonil
¹³ C-NMR	Karbon NMR Spektroskopisi
¹ H-NMR	Proton NMR Spektroskopisi
ACN	Asetonitril
AS	Adenilat Siklaz
CaCl ₂	Kalsiyum Klorür
cAMP	Siklik Adenozin Mono Fosfat
cGMP	Siklik Guanozin Mono Fosfat
CO ₂	Karbondioksit
DAD-UV	Diode Array Detector-Ultraviolet
DM	Diabetes Mellitus
EA	Elajik Asit
EC ₅₀	%50 Etkili konsantrasyon
ED	Eretil disfonksiyon
ED ₅₀	%50 Etkili Doz
EtOAc	Etil asetat
EtOH	Etil alkol
g	Gram
GK	Gaz Kromatografisi

GK/KS	Gaz Kromatografisi/Kütle Spektrometresi
GS	Guanilat Siklaz
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Correlation Spectroscopy
HSQC	Heteronuclear Single Quantum Coherence Spectroscopy
Hxn	Hekzan
i.k.	İntrakavernozal
IC ₅₀	%50 İnhibitör Konsantrasyon
ICP	İntrakavernozal Basınç
KCl	Potasyum Klorür
kg	Kilogram
KK	Korpus Kavernozum
KS	Kütle Spektrometrisi
L	Litre
M2	Madde 2
MAP	Ortalama arteriyel kan basıncı
MeOH	Metanol
MgSO ₄	Magnezyum Sülfat
MIK	Minimum İnhibitör Konsantrasyon
mL	Mililitre
mmol	Milimol
NaCl	Sodyum Klorür

NaH ₂ PO ₄	Sodyum Dihidrojen Fosfat
NaHCO ₃	Sodyum Bikarbonat
NMR	Nükleer Manyetik Rezonans Spektroskopisi
NO	Nitrik Oksit
NOS	Nitrik Oksit Sentaz
NS	Nar Suyu
O ₂	Oksijen
PE	Petrol eteri
PE⇒EtOH	Petrol Eteri Ekstraksiyonu sonrası elde edilen EtOH ekstresi
PG	Prostaglandin
Phe	Fenilefrin
SSCB	Sovyet Sosyalist Cumhuriyetler Birliği
STZ	Streptozosin
V	Volt
VIP	Vazoaktif İntestinal Polipeptit
YPSK	Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi
YPSK/KS	Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi/Kütle Spektrometrisi
δ _C	Karbon NMR kimyasal kayma
δ _H	Proton NMR kimyasal kayma
μg	Mikrogram
μL	Mikrolitre

ŞEKİLLER

Şekil 1.1.	Ereksiyonu düzenleyen ana yapılar (Kirby, 2004).	2
Şekil 1.2.	Penis ve ereksiyondan sorumlu KK'lara ait enine kesit (Kirby, 2004).	3
Şekil 1.3.	Peniste kavernoza ve dorsal arterlerin konumlanmalarını gösteren enine kesit (Kirby, 2004).	4
Şekil 1.4.	Ereksiyon mekanizmaları (Kirby, 2004).	5
Şekil 1.5.	Ferulenol	17
Şekil 1.6.	Ferprenin	17
Şekil 1.7.	Farnesol	18
Şekil 1.8.	Daukol ve karotol	19
Şekil 1.9.	3-prenil-4-hidroksi kumarin yapısı	22
Şekil 1.10.	Ferutinin ve 17 β östradiol.	35
Şekil 2.1.	<i>F. elaeochytris</i> Korovin bitkisinin doğadaki görüntüsü (Keldağ, Çandır Köyü, Yayladağ/Hatay).	40
Şekil 2.2.	<i>F. elaeochytris</i> Korovin herbaryum örneği (AEF 25881).	41
Şekil 2.3.	<i>F. communis</i> subsp. <i>communis</i> L. bitkisinin doğadaki görüntüsü (Biga-Karabiga karayolu, Çanakkale).	42
Şekil 2.4.	<i>F. communis</i> subsp. <i>communis</i> L. meyvesi herbaryum örneği-1 (AEF 26933)	43
Şekil 2.5.	<i>F. communis</i> subsp. <i>communis</i> L. yaprak herbaryum örneği (AEF 26933)	44

Şekil 3.1. Ferutinin, <i>F. elaeochytris</i> ve <i>F. communis</i> subsp. <i>communis</i> ekstrelerine ait İTK uygulamaları.	56
Şekil 3.2. Ferutinine ait YPSK kromatogramı DAD-UV spektrumu.	57
Şekil 3.3. Ferutinine ait kalibrasyon grafiği ve kalibrasyon denklemi	58
Şekil 3.4. Kapasite faktörünün hesaplanmasında kullanılan denklem	59
Şekil 3.5. Ayırıcılık hesaplanmasında kullanılan denklem	59
Şekil 3.6. Teorik plaka hesaplanmasında kullanılan denklem	60
Şekil 3.7. <i>F. elaeochytris</i> kök PE⇒EtOH ekstresine ait 210 nm’de ve ölçülen diğer dalga boylarına karşı ayna kromatogram	61
Şekil 3.8. Teşhis sınırının hesaplanmasında kullanılan denklem	62
Şekil 3.9. Tayin sınırının hesaplanmasında kullanılan denklem	62
Şekil 3.10. <i>F. communis</i> subsp. <i>communis</i> kök (üst), herba (orta) ve ferulenol YPSK kromatogramları ve DAD-UV spektrum çakışmaları.	67
Şekil 3.11. <i>F. elaeochytris</i> kök (üst), herba (orta) ve ferulenol YPSK kromatogramları.	67
Şekil 3.12. Açık kolon kromatografisinde 99. no’lu fraksiyona ait YPSK kromatogramı	69
Şekil 3.13. Açık kolon kromatografisinde 149. no’lu fraksiyona ait YPSK kromatogramı	70
Şekil 3.14. Açık kolon kromatografisinde birleştirilen fraksiyon gruplarına İTK uygulaması.	70
Şekil 3.15. Açık kolon kromatografisinde 16 ve 19 no’lu fraksiyon grubuna ait YPSK kromatogramları	71

Şekil 3.16. Grup 16 OBSK uygulamasında 83 no'lu fraksiyona ait YPSK kromatogramı	72
Şekil 3.17. Grup 19 OBSK uygulamasında 100 no'lu fraksiyona ait YPSK kromatogramı	73
Şekil 3.18. Ferutinine ait pozitif iyon mod (ESI+) kütle spektrumu.	76
Şekil 3.19. Ferutinine ait negatif iyon mod (ESI-) kütle spektrumu.	77
Şekil 3.20. Ferutinine ait HMBC etkileşimlerine örnekler.	80
Şekil 3.21. Ferutinine ait ^1H -NMR spektrumu.	82
Şekil 3.22. Ferutinine ait ^{13}C -NMR spektrumu.	83
Şekil 3.23. Ferutinine ait HSQC spektrumu.	84
Şekil 3.24. M2'ye (Ferutanol <i>p</i> -kumarat) ait pozitif iyon mod (ESI(+)) kütle spektrumu .	87
Şekil 3.25. M2'ye (Ferutanol <i>p</i> -kumarat) ait negatif iyon mod (ESI(-)) kütle spektrumu .	88
Şekil 3.26. M2'ye (Ferutanol <i>p</i> -kumarat) ait HMBC etkileşimlerine örnekler.	91
Şekil 3.27. M2'ye (Ferutanol <i>p</i> -kumarat) ait ^1H -NMR (CDCl_3 , 400 MHz) spektrumu.	93
Şekil 3.28. M2'ye (Ferutanol <i>p</i> -kumarat) ait ^{13}C -NMR (CDCl_3 , 400 MHz) spektrumu.	94
Şekil 3.29. M2'ye (Ferutanol <i>p</i> -kumarat) ait HSQC spektrumu.	95
Şekil 3.30. <i>In vivo</i> hayvan deneyleri, intrakavernozal uygulama.	97
Şekil 3.31. <i>F. elaeochytris</i> kök PE⇒EtOH ekstresi (5 mg/kg) ICP/MAP bulguları.	98

Şekil 3.32. <i>F. elaeochytris</i> kök PE ekstresi (5 mg/kg) toplam ICP/MAP bulguları.	99
Şekil 3.33. Ferutinin için (10-2 mmol/kg) ICP/MAP bulguları.	100
Şekil 3.34. M2 için (10-2 mmol/kg) ICP/MAP bulguları.	101
Şekil 3.35. Uygulanan ekstre ve maddelerin ICP/MAP bulgularının karşılaştırılması.	102
Şekil 3.36. <i>F. elaeochytris</i> kök PE⇒EtOH ekstresi (5 mg/kg) toplam ICP bulguları.	103
Şekil 3.37. <i>F. elaeochytris</i> kök PE ekstresi (5 mg/kg) toplam ICP bulguları.	104
Şekil 3.38. Ferutinin için (10-2 mmol/kg) toplam ICP bulguları.	105
Şekil 3.39. M2 için (10-2 mmol/kg) “toplam ICP” bulguları.	106
Şekil 3.40. Uygulanan ekstre ve maddelerin “toplam ICP” bulgularının karşılaştırılması.	107
Şekil 3.41. <i>İn vitro</i> deneylerde % gevşeme yanıtı hesaplanması.	108
Şekil 3.42. <i>İn vitro</i> organ banyosu (C) deneyleri için çıkarılan penis dokusu (A) ve bu dokudan ayrılan k.k. dokusu (B)	109
Şekil 3.43. <i>F. elaeochytris</i> kök PE⇒EtOH ekstresi <i>in vitro</i> % gevşeme yanıtı bulguları.	110
Şekil 3.44. <i>F. elaeochytris</i> kök PE ekstresi <i>in vitro</i> % gevşeme yanıtı bulguları.	111
Şekil 3.45. PE⇒EtOH ve PE ekstreleri için <i>in vitro</i> % gevşeme yanıtı bulgularının karşılaştırması.	112
Şekil 3.46. Ferutinin için <i>in vitro</i> % gevşeme yanıtı bulguları.	113
Şekil 3.47. M2 için <i>in vitro</i> % gevşeme yanıtı bulguları.	113

Şekil 3.48. Ferutinin ve M2 için *in vitro* % gevşeme yanıtı bulgularının karşılaştırması.

114



ÇİZELGELER

Çizelge 1.1.	ED’da Risk Faktörleri (Kirby, 2004).	7
Çizelge 1.2.	Ferutinol (Jeskeanadiol) yapısı ve başlıca türevleri	20
Çizelge 2.1.	Açık kolon kromatografisi uygulamasında gradient elüsyon	49
Çizelge 3.1.	Ferutinin kalibrasyon çözeltileri ve elde edilen eğri altı alan verileri	57
Çizelge 3.2.	Ferutinin için kalibrasyon denklemi hesaplamaları	58
Çizelge 3.3.	YPSK analizinde sistem uygunluk test sonuçları	60
Çizelge 3.4.	Ferutinine ait YPSK yöntemi LOD ve LOQ değerleri	62
Çizelge 3.5.	Ferutinin için doğruluk ve geri kazanım bulguları	63
Çizelge 3.6.	Ferutinin için gün içi kesinlik bulguları.	64
Çizelge 3.7.	Ferutinin için günler arası kesinlik bulguları.	65
Çizelge 3.8.	Farklı bitki kısımlarının ACN ekstralarında YPSK ile ölçülen ferutinin miktarları	66
Çizelge 3.9.	<i>F. elaeocyhtris</i> ve <i>F. communis</i> subsp. <i>communis</i> köklerinden soxhlet cihazıyla hazırlanan ekstralarda YPSK ile ölçülen ferutinin miktarları	66
Çizelge 3.10.	<i>F. elaeocyhtris</i> PE⇒EtOH ekstresinden açık kolon kromatografisi ile elde edilen fraksiyonlar. * Ferutinince zengin fraksiyonlar, ** M2’ce zengin fraksiyonlar	68
Çizelge 3.11.	Ferutinin ¹³ C (400 MHz), ¹ H (400 MHz) NMR spektroskopik değerleri.	81

Çizelge 3.12. M2 (Ferutanol *p*-kumarat) ^{13}C (400 MHz), ^1H (400 MHz) NMR spektroskopik değerleri.

92



GİRİŞ

1.1. Genel Bilgiler

Geleneksel tıp tarihine bakıldığında *Ferula* cinsine ait bitkilerin birçok hastalığın tedavisinde kullanıldığı görülmektedir. *Ferula* (Latince “çomak” anlamına gelir.) cinsi, 150’nin üzerinde türe sahiptir ve bu bitkiler çoğunlukla kurak bölgelerde yetişmektedir. *Ferula* türleri yaygın olarak Doğu Akdeniz’den Orta Asya’da dağılım göstermektedir (Nazari ve Iranshahi, 2011). Bununla birlikte *Ferula* cinsi, Orta Avrupa, Kuzey Afrika, Çin ve Kuzey Amerika’ya kadar geniş bir coğrafyada yayılış göstermektedir (Sağıroğlu, 2005). Ülkemizde de 20 kadar *Ferula* türü yetişmektedir ve genel olarak “çakşır” ya da “çakşır otu” adıyla bilinmektedir (Sağıroğlu, 2005). Bitki yetiştiği Orta Doğu ülkelerinde ve ülkemizde halk tarafından hem kadın hem de erkeklerde afrodizyak olarak kullanılmaktadır (Baytop, 1999; Sağıroğlu 2005; Tharakan ve Manyam, 2005).

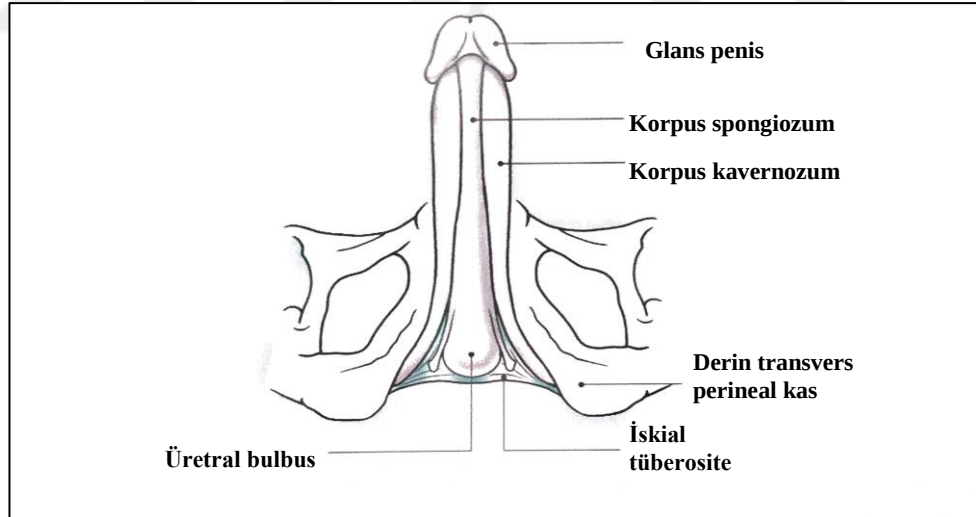
Eretil disfonksiyon (ED) terimi, erkekte cinsel ilişkiyi sağlamak için yeterli ereksiyonu oluşturmak ya da devam ettirmekte başarısız olma durumu olarak tanımlanmaktadır. Dünya genelinde milyonlarca erkek, ED’den mağdur durumdadır. Bu durum pek çok erkekte, eşi ile olan ilişkisini ciddi anlamda etkileyen psikolojik strese neden olmaktadır. Günümüzde ED’un tedavisinde çok çeşitli güvenilir ve etkili yöntemler geliştirilmiştir (Kirby, 2004).

Bununla birlikte bazı cinsel güç artırıcı bitkisel droglar da bu alanda çalışma konusu olmuştur. Son yıllarda, *Ferula* türlerinden özellikle *F. hermonis* üzerinde yapılan çalışmalarda elde edilen sonuçlar halk arasındaki kullanımını desteklemektedir (Tharakan ve Manyam, 2005). Bu durum ülkemizde de dikkatlerin “çakşır” üzerine yönelmesine neden olmuş, bitkiden görsel ve yazılı basında sıklıkla bahsedilir olmuştur.

1.1.1. Ereksiyon Anatomisi ve Mekanizmaları

İnsanoğlunun sahip olduğu temel ve en güçlü biyolojik güdülerin başında beslenme (yemek ve su) ve barınma ihtiyacı gelmektedir. Bu temel ihtiyaçlar giderildiğinde ise türlerin devamlılığı için cinsel arzu, tüm canlıların ve doğal olarak insanın da davranış ve eylemlerinde önemli bir etkiye sahiptir. Cinsel arzunun çeşitli nedenlerle tatmin edilememesi ya da kısmen tatmin edilmesi erkekte ve partnerinde mutsuzluk ya da ıstırap gibi duygularla birlikte yaşam kalitesini önemli ölçüde düşürmektedir (Andersson, 2001).

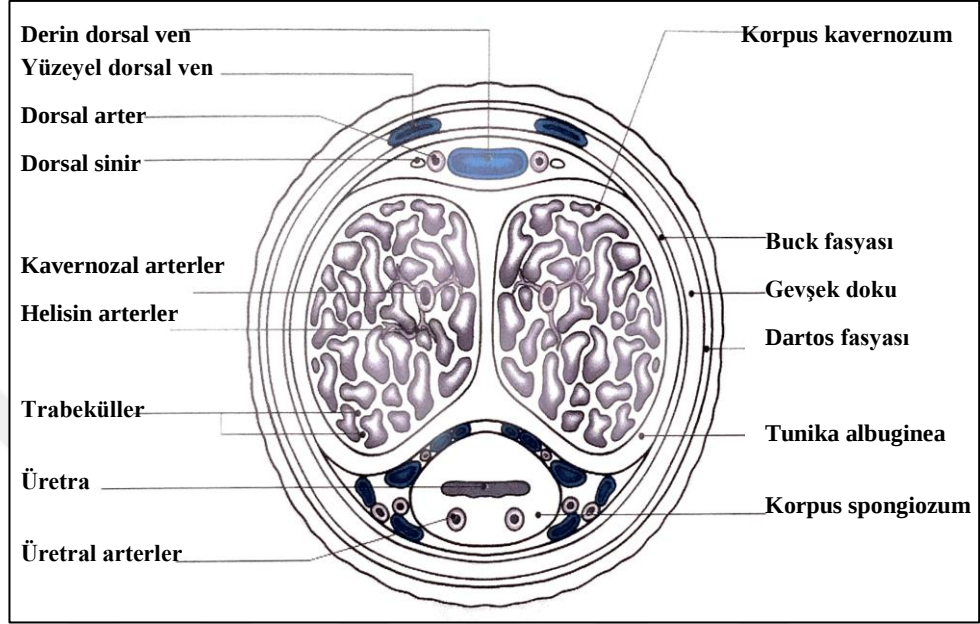
Penil ereksiyon, penis içindeki düz kasların gevşemesi sonucunda gerçekleşmektedir. Ereksiyon temel olarak, ilgili sinirlerce iletilen spinal bir refleks olup aynı zamanda görme, duyma, dokunma, koku alma ve hayal gücü gibi uyarıların varlığında gerçekleşen çok parametrelili fizyolojik bir olaydır (Andersson, 2001).



Şekil 1.1. Ereksiyonu düzenleyen ana yapılar (Kirby, 2004).

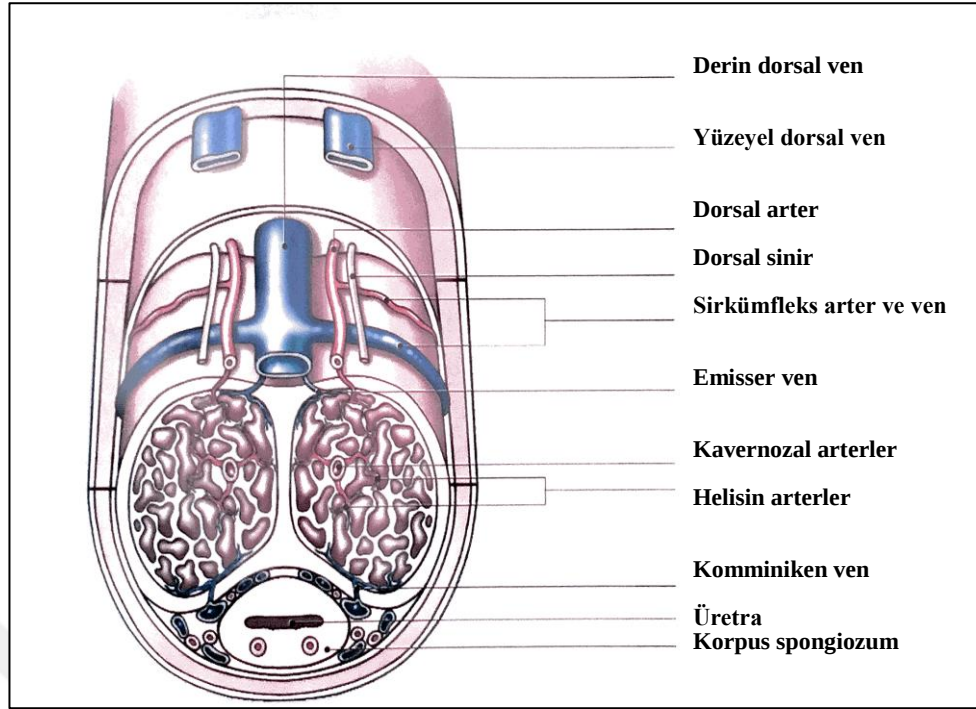
Korpus kavernozumlar (KK, erektile cisimler) erektile fonksiyonu düzenleyen asıl yapılardır (Şekil 1.1.). Bu yapılar penisin hacmini oluşturmakta ve ereksiyon sırasında basınçlı arteriyel kan ile dolmaktadır (Kirby, 2004).

Her bir KK tunika albuginea olarak bilinen kalın bir fibröz kılıfa sahiptir ve bu yapı, vasküler endotel ile birbirine bağlanan ve örtülen pek çok laküner boşluktan oluşan erektil dokuyu çevrelemektedir (Şekil 1.2.).



Şekil 1.2. Penis ve ereksiyondan sorumlu KK'lara ait enine kesit (Kirby, 2004).

Her iki KK yapısında bulunan kavernoza arterler penisin hilumunda tunika albugineaya geçmektedir. Daha sonra, her bir korpusun merkezinde, distale doğru uzanırken çok sayıda helisin dallar vermektedir. Bu tirbuşon şeklindeki kaslı damarlar doğrudan laküner boşluklara açılmaktadır (Şekil 1.3.) (Kirby, 2004).



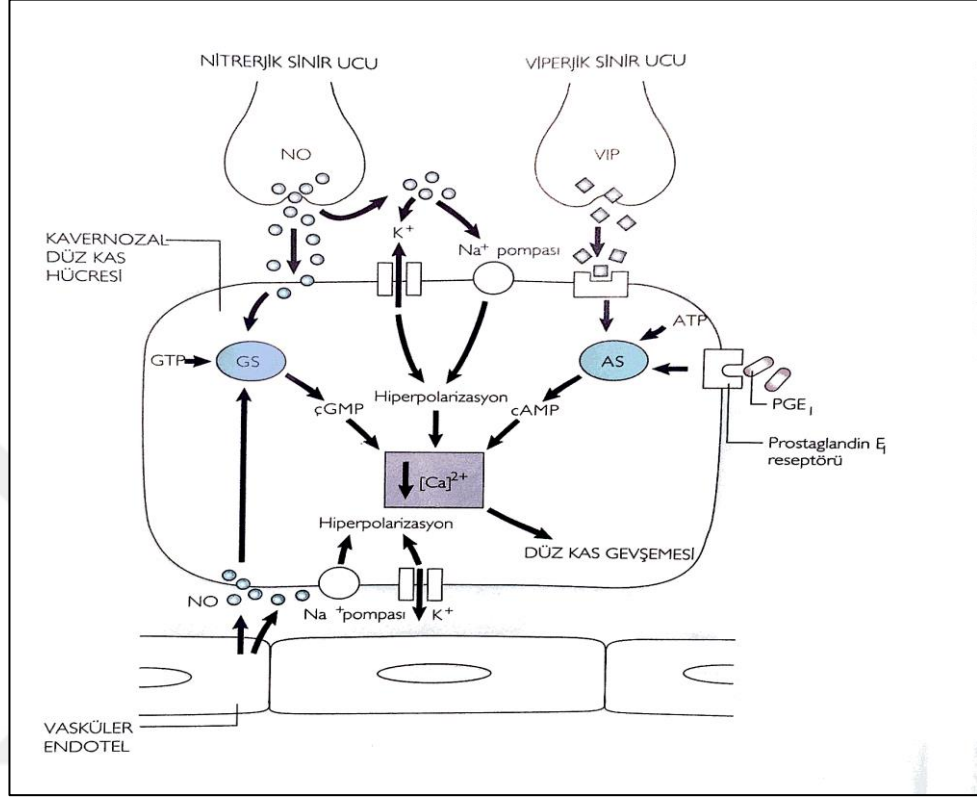
Şekil 1.3. Peniste kavernoza ve dorsal arterlerin konumlanmalarını gösteren enine kesit (Kirby, 2004).

Intrakavernoza kan akımının bilinen en önemli belirleyicisi intrakavernoza (i.k.) düz kas tonusudur. Kavernoza düz kasların aktif kontraksiyonu bir dizi faktöre bağlıdır. Bunlar: agonistlerin düzeyi (nörotransmitterler, hormonlar ve endotel kaynaklı faktörler) reseptörlerin ekspresyon düzeyi, iletim mekanizmalarının koordinasyonu, kalsiyum homeostazı, kontraktıl proteinlerin karşılıklı ilişkileri ve düz kas hücreleri arasındaki yakın hücre içi iletişimlidir (gap birleşimleri) (Kirby, 2004).

Bu tonus durumunu devam ettirebilmek için gerekli enerji harcaması neredeyse sıfırdır, ancak yüksek konsantrasyonda sitoplazmik kalsiyum gerektirmektedir. Bu nedenle, düz kas tonusunun normal bir şekilde devam ettirilebilmesi için yeterli bir kalsiyum homeostazı şarttır (Kirby, 2004).

Kavernoza düz kasların gevşemesi hücre içi kalsiyumun azaltılması ile sağlanmaktadır. Genel olarak bunu sağlayan ana mekanizmalar siklik adenoazin mono fosfat (cAMP) ya da siklik guanozin mono fosfatın (cGMP) akümülyasyonuna veya

hücre zarının hiperpolarizasyonuna yol açan potasyum kanallarının aktivasyonuna bağlıdır (Şekil 1.4.) (Kirby, 2004).



Şekil 1.4. Ereksiyon mekanizmaları (Kirby, 2004).

Nitrik oksit sentaz (NOS) tarafından substrat molekül olan *L*-arjininden üretilen nörotransmitter olan nitrik oksit (NO), KK'da düz kas hücre duvarında potasyum kanallarının hiperpolarizasyonunu ve gunanozin trifosfatın cGMP'a dönüşümünü katalizleyen guanilat siklazın (GS) aktivasyonunu sağlar. Böylece hücre içi kalsiyum düzeyinin düşürülmesi sağlanmış olur (Şekil 1.4.) (Kirby, 2004).

Diğer düz kas gevşeticiler, cAMP üzerinden etki göstermektedir ve bunların arasında prostaglandin (PG) E₁ ve vazoaftif intestinal polipeptit (VIP) gibi nörotransmitterler de bulunmaktadır. Bu maddeler de adenilat siklazı uyatarak cAMP konsantrasyonunu artırarak uyarının iletilmesini sağlarlar (Kirby, 2004).

cGMP çoğunlukla fosfodiesteraz tip 5 (PDE-5) tarafından yıkılmaktadır. Böylece sitoplazmada kalsiyum konsantrasyonu yükselerek düz kas gevşemesini inhibe etmektedir (Kirby, 2004).

1.1.2. Erektile Disfonksiyonun Tanımı, Epidemiyolojisi ve Nedenleri

ED tatmin edici cinsel performans elde edilebilmesi için, yeterli ereksiyonun oluşmasında ve sürdürülmesinde yetersizlik olarak tanımlanmaktadır. ED, hem fiziksel hem de fizikososyal etkileri olan, hastanın da partnerinin de yaşam kalitesini belirgin derecede düşüren bir tıbbi durumdur. ED'un koroner arter ve periferik vasküler hastalıkların erken habercisi olduğu yönünde kanıtlar artmaktadır (Hatzimouratidis ve ark., 2016).

ED'un görülme sıklığı yaşla beraber artmaktadır. Farklı çalışmalardan alınan verilere göre hastaların %20-40'ı, 60-69 yaşları arasındayken %50-100'ü 70-80 yaşlarındaki erkeklerden oluşmaktadır. Yaşlanma ile gelişen problemlerden başka hipertansiyon, diyabet, sigara, obezite, hiperlipidemi gibi risk faktörleri belirgin şekilde ED ile ilişkilendirilmektedir (Gandaglia ve ark., 2014).

ED'un nedenlerine bakıldığında, en çok vasküler nedenlerden söz edilmektedir. Arteriyel yetmezlik, venöz kaçak, i.k. düz kas fibrozisi ve nöroiletimdeki eksiklikler gibi durumlar ED'a neden olabilmektedir. Testosteron düzeyinin düşmesine neden olan durumlarda da (luteinizan hormon salan hormon agonistleri gibi) ED görülebilmektedir. Priapizm sonrası, tedavi gecikti ise ya da uygulanamadıysa KK dokusunda fibrozis ve sonucunda ED gelişmektedir. Bu da oluşan ED'nin tedavi edilmesini hatta penil protez uygulamasını bile olanaksız kılmaktadır. Önceleri ED'nin en önemli nedeninin psikolojik nedenler olduğu düşünülmekteydi. Psikojenik ED, genelde genç erkeklerde performans kaygısı ile ilişkilendirilmektedir. Ayrıca diğer nedenlerle oluşan ED durumlarında da psikojenik faktörlerin eşlik ettiği görülmektedir. Başarısız ereksiyonlardan sonra anksiyete ve güven kaybı, ereksiyonu daha da zorlaştırmaktadır (Kirby, 2004).

Çizelge 1.1. ED’da Risk Faktörleri (Kirby, 2004).

Yaş	Damarsal Faktörler	Metabolik Hastalıklar	Nörolojik Hastalıklar	Diğer
60-69 %20-40	Miyokard enfaktüsü	Diabetes mellitus	Multipl skleroz	AIDS
70-80 %50-100	Koroner arter by-pass cerrahisi	Böbrek yetmezliği	Multipl sistem atrofisi	İlaç Kullanımı
	Serebral vasküler olay	Tirotoksikoz	Parkinson hastalığı	
	Periferik vasküler hastalık	Hipotroidizm	Spinal kord hasarı	
	Hipertansiyon	Depresyon		
	Hiperlipidemi	Alkolizm		
	Sigara	Kronik karaciğer hastalığı		
		Adrenal bozukluklar		
		Hipogonadizm		
		Hiperprolaktinemi		

ED ve kardiyovasküler hastalık aynı sistemik bozukluğun iki farklı dışavurumu olarak görülmektedir. Bu nedenle, ED kardiyovasküler hastalığın erken habercisi olarak görülebilir (Gandaglia ve ark., 2014).

Diabetes mellitus (DM) ED’nin risk faktörlerinin (Çizelge 1.1.) arasında yer almasının yanında kardiyovasküler hastalık riskini artıran bir hastalıktır. 60 yaş üstü diyabetik hastaların yaklaşık %75’i ED’lu olup bu oran diyabetin ciddiyeti ile birlikte artmaktadır. Endotel hasarı ve penil arteroskleroz diyabetin sonucu ve ED’un nedeni olarak ortaya çıkmaktadır. Bununla beraber bu iki tıbbi durum arasındaki ilişki hormonal farklılıklar ve nöropati gibi patofizyolojik mekanizmalarla da ilgilidir (Gandaglia ve ark., 2014).

1.1.3. ED Tanısı ve Tedavi Seçenekleri

ED tanısında Uluslararası Eretil Fonksiyon İndeksi (The International Index of Erectile Function, IIEF-5) (Rosen ve ark., 1997) ve kısa versiyonu olan Erkekler

için Cinsel Sağlık Ölçeği (The Sexual Health Inventory for Men SHIM) (Cappelleri ve Rosen, 2005) gibi valide edilmiş psikometrik anketler kullanılarak belirtilerle ilgili skorlamaların olduğu anketler işleri kolaylaştırmaktadır. Tanı için dikkatli bir fiziksel muayene ile beraber hastanın şikayetleri ve mevcut risk faktörleri (Çizelge 1.1.) göz önünde tutularak laboratuvar testlerine başvurulmaktadır (Hatzimouratidis ve ark., 2016).

ED tedavisinde, ilk basamak olarak çoğunluk ED hastasında görülen sigara kullanımının azaltılması ya da bırakılması sağlanmaya çalışılmaktadır. Tedaviye testosteron azlığı gibi tedavi edilebilir nedenler ile diyabet, hipertansiyon hiperlipidemi gibi risk faktörlerinden başlanmaktadır. Hastalara düzenli fizik egzersizler ile kilo vermeleri önerilmektedir. Tedaviye eşlik edecek psikolojik danışmanlık, mümkünse hastanın eşinin/partnerinin katılımıyla da beraber medikal tedaviye eşlik edebilmektedir (Kirby 2004).

PDE-5 inhibitörleri, cGMP'ın kavernoza dokuda PDE-5 tarafından hidrolize edilmesini engellemektedir. 1990'ların sonunda oral tedavi ajanları olarak kullanıma girmişlerdir. Bu yolla düz kas gevşemesi ile beraber artan kan akımı ereksiyon oluşumunu sağlamaktadır. Avrupa İlaç Ajansı (European Medicines Agency; EMA) tarafından ED tedavisi için onaylanan 4 potent PDE-5 inhibitörü (sildenafil, tadalafil, verdanafil ve ülkemizde henüz piyasada müstahzarı bulunmayan avanafil) bulunmaktadır. (Hatzimouratidis ve ark., 2016).

Sildenafil, 1998'de pazara ilk olarak giren PDE-5 inhibitörüdür. Önerilen başlangıç dozu 50 mg olmakla beraber 100 mg'lık dozu da mevcuttur. Etki 30 ila 60 dakika arasında görülmeye başlamaktadır. Etkisi 12 saate kadar sürebilmektedir. Gıdalarla (özellikle yağlı ağır beslenmeler sonrası) alımında absorpsiyonun zorlaşması etkinin azalmasına neden olmaktadır. 24 haftalık bir çalışmada 50 mg ve 100 mg sildenafil alan hastaların sırasıyla %77 ve %84'ünün ereksiyonlarında iyileşme görülmüşken, plasebo alanların %25'inde ereksiyon iyileşmiştir (Hatzimouratidis ve ark., 2016).

Tadalafil, sildenafili takiben 2003 yılında ilaç piyasasına giriş yapmıştır. Alındıktan 30 dakika sonra etkisi başlamaktadır. En yüksek etkinliğe 2 saat sonunda ulaşılmaktadır ve etkisi 36 saate kadar sürmektedir. İlacın biyoyararlanımı diyet ile etkilenmemektedir. 12 Haftalık tedavi sonrası, 10 mg ve 20 mg tadalafil alan ED hastalarının ereksiyonları sırasıyla %67 ve %81 oranında iyileşmiştir. Plasebo alan hastaların ise %35'inde iyileşme görülmüştür (Hatzimouratidis ve ark., 2016).

Diğer bir PDE-5 inhibitörü olan vardenafil de yine 2003 yılında pazara sunulmuştur. Oral olarak alındıktan 30 dakika sonra etkisi başlamaktadır. Etkisi ağır ve yağlı yemeklerle azalmaktadır. 12 haftalık tedavi sonrası, 10 mg ve 20 mg vardenafil alan ED hastalarının ereksiyonları sırasıyla %76 ve %80 oranında iyileşmiştir. Plasebo alan hastaların ise %30'unda iyileşme gözlenmiştir (Hatzimouratidis ve ark., 2016).

Avanafil 2013 yılında piyasaya sunulmuş yüksek seçicilikte yeni bir PDE-5 inhibitörüdür. Böylece büyük önemli oranda yan etkiler minimize edilmektedir. Etki ilaç alındıktan sonra 15-30 dakika içinde başlamaktadır. Normal ED'li hastalardan 100 mg ve 200 mg avanafil alanların %58 ve %59'u başarılı cinsel birleşmeyle sonuçlanan girişimlerde bulunurken, plasebo alanların %28'inde bu durum gerçekleşebilmiştir. Yemeklerle alımı etkiyi geciktirse de aç ya da tok almak arasında bir fark bulunmamaktadır (Hatzimouratidis ve ark., 2016). Baş ağrısı ve yüzün kızarması PDE-5 inhibitörlerinin en yaygın görülen yan etkileri olmakla beraber avanafilde görülme sıklığı düşmektedir. Bununla beraber tüm PDE-5 inhibitörleri son 6 ayda miyokard enfarktüsü, inme ya da hayati tehlike yaratacak bir aritmi geçirmiş, tansiyonu düşmüş (90/50 mmHg) ya da yükselmiş (170/100 mmHg), anstabil anjinalı, cinsel ilişkide anjinası olan ya da ciddi konjestif kalp yetmezliği (Klas IV) olan hastalarda kontrendikedir. Tansiyon düşürücü ilaçlarla birlikte alındıklarında ise hipotansiyon riski taşımaktadırlar (Hatzimouratidis ve ark., 2016).

PDE-5 inhibitörleri en yaygın kullanılan oral ajanlardır. Bununla beraber PDE-5 inhibitörleri hastaların sadece bir kısmında etkili olabilmektedir. Bu nedenle vakum

cihazları, i.k. enjeksiyonlar, cerrahi yöntemler ve son olarak penil protezler tedavinin 2. ve 3. basamaklarını oluşturmaktadır (Hatzimouratidis ve ark., 2016; Kirby, 2004).

1.2. Botanik Bilgiler

1.2.1. Sistematikteki Yeri

Bölüm:	Spermatophyta
Altbölüm:	Angiospermae
Sınıf:	Dicotyledonae
Altsınıf:	Magnoliidae
Takım:	Umbellales, Apiales, Umbelliflorae
Familiya:	Apiaceae (Umbelliferae)
Alt familiya:	Apioideae
Cins:	<i>Ferula</i> L.

1.2.2. Apiaceae Familyası

Apiaceae familyası, tek yıllık veya çok yıllık bitkilerden oluşur; otsu, nadiren çalimsı bitkilerden oluşur. Yapraklar alternan dizilişli, nadiren karşılıklı veya sarmal şeklinde olabilir; genellikle stipulasız, basitten çok parçalıya değişen şekillerde olabilir; saplar genellikle geniş ve tabanda gövdeyi sarmış şekildedir/kın şeklindedir. Çiçek durumu genellikle bileşik umbelladır; nadiren basit umbella, başçık veya çok indirgenmiş simoz şeklindedir. Brakte ve brakteoller bulunur veya bulunmaz. Çiçekler epigin; hermafrodit veya tek eşeylidir (nadiren dioiktir). Sepal ya yoktur ya da çok küçüktür, genellikle düzensizdir. Petaller 5 tane, genellikle uçları içe kıvrık şekilde ikiye çatallanmış; hepsi eşit ebattadır veya dış petaller içtekilerden daha büyüktür. Petallerin rengi beyaz, sarı, sarımsı-yeşil, soluk mavi veya pembe olabilir. Stamenler 5 tanedir. Karpel (1-)2; ovüller sarkık, her lokulusta 1 tane; stilus 2 adet; genellikle genişlemiş tabanlı. Meyve kuru; olgunlukta açılmayan, silindirik veya

geniş bir ara bölge ile birbirinden ayrılmış, (1-)2 karpelden meydana gelmiş, şizokarp. Tüysüz veya tüylü, pullu, kıllı veya dikenli; merikarplar genellikle karpofor adı verilen bir sapla birbirine bağlıdır ve her bir merikarpın sırt kısmında 5 adet, “kosta” adı verilen çıkıntı bulunur; bu çıkıntılar bazen kanatlı veya ibiksi çıkıntılıdır ve “valekulum” adı verilen girintilerle birbirinden ayrılırlar. Merikarplarda “vittae” denen salgı kanalları hemen her zaman bulunur (Hernstadt ve Heyn, 1972).

Dünyada 455 cins ve 3600 civarında içeren Apiaceae familyası Türkiye’de 109 cins ve 450 tür ile temsil edilmektedir (Yaqoob ve Nawchoo, 2016).

1.2.3. *Ferula* L. Cinsinin Genel Özellikleri

Monokarpik veya polikarpik çok yıllık bitkilerdir. Kökler kalın, odunlaşmış, silindirik-oblongdur. Gövde tabanında ipliksi yaprak sapı kalıntıları mevcut olup gövde 0,2–10 cm çapında, (20-) 50–250 (-500) cm uzunluğunda genellikle sağlam yapılı, dik, silindirik, genellikle belirgin oluklu, yeşilimsi-mumsu veya menekşe renktedir. Taban yapraklarının ayası genellikle üçgenimsi-ovat, yaprak sapı genişleyerek gövdeyi sarıcı, tüylü ya da tüysüz, yaprak sapının kimsiz kısmı 0–50 cm; yaprak ayaları 3–7 pennat, yaprak segmentleri ovat-oblong, filiform-setozdan şeritsiye değişen şekillerde, segmentler 1–70 mm, tüylü ya da tüysüz, uçları akut-akuminat, segment lobları bazen 1–2 pennatisektir. Gövde yapraklarının ayaları üste doğru küçülerek devam eder, çiçeklenme bölgesinde bazen tamamen körelir. Çiçeklenme durumu panikulat-korimboz ya da bütün umbeller verimli, çiçekler genellikle hermafrodit, bazen yan umbellerde erkek organlar gelişmiştir. Dallanma seyrek ya da sık, tabana yakın ya da uzaktır. Merkezi umbel saplı veya sapsız, verimli, ışınlr genellikle dik yükselidir. Yan umbeller genellikle uzun pedinkullu, verimli ya da verimsiz, bazen yan umbel yok, umbellulalar 6–55 çiçekli, olgun meyve sapı 1–20 mm’dir. Brakte yoktur. Brekteoller birkaç tane, belirgin veya belirsiz, tüylü, tüysüz, dökülücü, bazen yoktur. Sepaller körelmiş veya yoktur. Petaller sarı renkte, tüylü veya tüsüzdür. Şizokarp meyvede merikarplar sırtta, basık şekilde yassılaştı, eliptik-oblongtan, ovat-obovata kadar, 5–20 × 3–15 mm,

olgunlaştığında kahverengiden kremi renge kadar, sırttaki kanatlar genellikle filiform, yan taraftakiler 0.3–4 mm genişliğinde, merikarplar stilopodyuma yakın tarafta şişkin veya değil, birleşme yüzeyleri genelde düz nadiren pürüzlü; stilus kalıcı veya dökülücü, genellikle başçıklı; stilopodyum konikal veya silindirik; reçine kanalları belirgin veya değil, sırt kısmındaki her valekulumda 1–6, birleşme yüzeyinde ise 2–10 reçine kanallıdır. Birleşme yüzeyindeki reçine kanalları karpofora yakın veya uzaktır (Sağıroğlu, 2005).

1.2.4. *Ferula* Türlerinin Yayılışı

Ferula L. Apiaceae familyasının üçüncü en geniş cinsidir ve 180-185 türe sahiptir. Türler çoğunlukla Orta ve Güney Batı Asya’da yayılış göstermektedir. Ayrıca Uzakdoğu, Kuzey Hindistan ve Akdeniz Havzasına kadar da yayılım göstermektedirler. Genel olarak dağlık bölgelerde yetişen *Ferula* türlerinin bir kısmına da çöllerde rastlanabilmektedir. Eski SSCB ülkelerinde 94 tür, Pakistan’da 15 tür, Hindistan’da 19 tür, Çin’de 25, Kuzey Himalayalarda 19 tür, Suudi Arabistan’da 4 tür ve İran’da 32 tür yetiştiği bildirilmektedir (Yaqoob ve Nawchoo, 2016).

Ülkemizde ise *Ferula* cinsi 13’ü endemik olmak üzere 22 türle temsil edilmektedir. Taksonlar Türkiye’nin tüm coğrafik bölgelerinde dağılım göstermiştir. Başta Adana (6 takson) olmak üzere asıl Ege (4 takson) ve Konya (4 takson) bölümleri 7’si endemik 14 taksona ev sahipliği yapmaktadır (Güner, 2012).

1.2.4.1. Türkiye’de YetiŖen *Ferula* Taksonları

1. *F. amanicola* Hub.-Mor. & PeŖmen (Endemik)
2. *F. anatolica* Boiss. (Endemik)
3. *F. brevipedicellata* PeŖmen ex. Sağıroğlu & H. Duman (Endemik)
4. *F. caspica* M. Bieb.
5. *F. communis* L.
 - subsp. *communis* L.
 - subsp. *glauca* Rouy & Camus
6. *F. coskunii* Sağıroğlu & H. Duman (Endemik)
7. *F. drudeana* Korovin (Endemik)
8. *F. duranii* Sağıroğlu & H. Duman (Endemik)
9. *F. elaeochytris* Korovin
10. *F. halophila* PeŖmen (Endemik)
11. *F. haussknetchii* H. Wolf ex Rech. f.
12. *F. hermonis* Boiss.
13. *F. huber-morathii* PeŖmen (Endemik)
14. *F. longipedunculata* PeŖmen (Endemik)
15. *F. lycia* Boiss. (Endemik)
16. *F. mervynii* Sağıroğlu & H. Duman (Endemik)
17. *F. orientalis* L.
18. *F. parva* Freyn & Bornm. ex. Freyn (Endemik)
19. *F. rigidula* Fisch. ex DC.
20. *F. szowitziana* DC.
21. *F. tenuissima* Hub.-Mor. & PeŖmen
22. *F. tingitiana* L.

(Güner, 2012).

Bu taksonlar arasında *F. communis* subsp. *communis* L. ve *F. elaeochytris* Korovin alıŖma materyali olarak seilmiŖtir.

1.2.5. Tez Çalışmasında Yer Alan *Ferula* Türlerinin Botanik Özellikleri

1.2.5.1. *Ferula communis* subsp. *communis* L.

Çok yıllık tüysüz, gövde düz ve yuvarlak, zayıfça oluklu, 2-5 m uzunlukta, tabanda en az 3 cm kalınlıktadır. Yapraklar 4-6 pinnat, dışarıdan üçgenimsi-ovat 25-45 × 20-30 cm, tüysüz; üst bölümler şeritsi ya da şeritsi-ipliksi, 10-50 × 0,3-3 mm, üstte yeşil, altta yeşil ya da mat mavi-yeşildir. Kınlar çok şişkin, sert-derimsi, amplexikaul. Çiçek durumu panikulat-korimboz, uzamış, merkezi umbeller kısa-pedinkulat ya da sapsız, ışınlar (16-)20-30(-45), hemen hemen eşit, 3-4 cm; umbellulalar 15-40 çiçekli, meyve sapı hafifçe artan, 6-10 mm; brakteoller şeritsi-subulat, dökülücü. Merikarplar eliptikten sub-orbikulara kadar, 10-16 × 7-14 mm, tabanda trunkat-retus, sırttaki kanatlar ipliksi, yanlardaki kanatlar 1-1,5 mm genişlikte; dorsal salgı kanalları vlekulum başına (1-)2-3 birleşme yüzünde 4-6 Yaprak lobları 0,3-0,8 mm genişliğinde, iki yüzde de yeşil ise **subsp. communis**, yaprak lobları (0,8-)1-3 mm genişlikte, üstte yeşil alt yüzde mat mavi-yeşil ise **subsp. glauca**'dır (Herrnstadt ve Heyn, 1972).

Monokarpik, kök silindirik, 3-14 cm çapında. Gövde tabanında ipliksi yaprak sapı kalıntıları mevcut, 2-7 cm, gövde silindirimsi, 2-5 m uzunluğunda, tabanda 3-12 cm çapında, uzunlukta, hafifçe oluklu. Taban yaprakları triangular-ovat 50-150 × 30-80 cm, tüysüz, kınsız yaprak sapı 5-10 cm, ±silindirik, tüysüz; yaprak ayası 4 pinnat, yaprakçıkların ucundaki loplar şeritsi-lanseolat, (6-)10-70 × 0,3-1 mm, düz, uçları mukronattan subulata kadar, bazen kenarları içe kıvrık. Gövde yapraklarının kınları çok sayıda (8-14), yarı zarımsı yapıda ve renkte, tüysüz, hafifçe oluklu; alt kısımdaki kınlar silindirik-lanseolat, 14-40 × 4-12 cm, zayıfça şişkin, genellikle gövdeyi sarıcı, yaprak sayısı 3-4 pinnat, belirgin, 40-70 cm; ortadaki kınlar oblong lanseolat, 8-25 × 2,5-6 cm, şişkin gövdeyi $\frac{3}{4}$ oranında sarıcı, yaprak ayası 2-3 pinnat, belirgin, 20-50 cm; üst taraftaki kınlar lanseolat, 2-10 × 0,5-4 cm, gövdeyi $\frac{1}{2}$ oranında sarıcı, çiçeklenme bölgesinde yaprakçıklar yoğun. Çiçeklenme durumu panikulat-korimboz; merkezi umbel saplı 0,7-1,5(-4) cm ya da sapsız; ışınlar (16-)20-45(-60), hemen

hemen eşit, 3-7 cm, yan umbeller 2(-4), dik, 15-35 cm, kalın ve verimsiz; umbellulalar 15-42 çiçekli, olgun meyve sapı, 7-18 mm. Brakteoller şeritsi-subulat (biz şeklinde), 1-2,5(-3) mm, 6-10 tane, dökülücü. Sepaller küçük, 0,2-0,3 mm. Petaller tüysüz, 2,5-3,5 mm, zayıfça uçtan içe kıvrık. Merikarplar orbikular-oblongdan eliptiğe kadar değişen şekillerde, $9-17 \times 6-13$ mm, olgunlaştığında kahverengi, sırttaki kanatlar ipliksi, yan kanatlar 1-1,5 mm genişliğinde; stilopodium kısa konik, stilus genellikle dökülücü, stigma başcıklı (Sağıroğlu, 2005).

1.2.5.2. *Ferula elaeochytris* Korovin

Çok yıllık hafifçe mat-yeşil (glaucous). Gövde düz ve yuvarlak, oluklu, 10-200 cm, tüysüz. Yapraklar 5-6 pinnat, dışarıdan triangular-ovat $25-50 \times 20-45$ cm, hafif sivri uçlu üst bölümler şeritsi ya da şeritsi-lanseolat, $1,5-2,5 \times 0,5$ mm, genellikle divarikat. Kınlar (6-)10-15 cm, çok şişkin, ovat-oblong, sert-derimsi, amplexikaul. Çiçek durumu panikulat-korimboz, merkezi umbeller kısa-saplı ya da sapsız, ışınlar 10-18, hemen hemen eşit, 3-4 cm; umbellulalar 8-18 çiçekli, meyve sapı 9-10 mm. Merikarplar eliptik-oblong, $9-12 \times 4-5$ mm, hafifçe mat-yeşil, sırttaki kanatlar ipliksi, yanlardaki kanatlar dar; dorsal salgı kanalları her bir vlekulumda bir adet, birleşme yüzünde 2-6 (Herrnstadt ve Heyn, 1972) .

Polikarpik çok yıllık, kök silindirik-oblong, 1-4 cm genişliğinde, tabanda ipliksi yaprak sapı kalıntıları mevcut, 2-5 cm. Gövde silindirik, tüysüz, oluklu, tabanda 0,5-3 cm çapında, 70-230 cm uzunluğunda. Taban yaprakları triangular-ovat, $25-60 \times 15-45$ cm; yaprak sapının kınısız kısmı 2-8 cm, seyrek tüylü; yaprak ayası 6-7 pinnat, ilk segmentler seyrekten skabrit tüylüye kadar değişen bir indumentuma sahip, son segmentler şeritsi lanseolat, $11-3 (-7) \times 0,2-0,7$ mm, skabrit tüylüden setüloz tüylüye kadar, lopların ucu akut-akuminat. Bütün kınlar gövdeyi sarıcı, derimsi, tüysüz, oluklu, genişçe, şişkin, bazen menekşe renkte; alt taraftaki kınlar oblong-lanseolat, $6-14 \times 1,5-3$ cm, yaprak ayası 5-6 pinnat; ortadaki kınlar genişçe oblongtan lanseolata kadar değişen şekillerde, $6-10 \times 2,5-7,5$ cm, yaprak ayası 4-5 pinnat; üst taraftaki kınlar oblong lanseolat, $6-15 \times 2,5-6$ cm, yaprak ayası 1-3 pinnat.

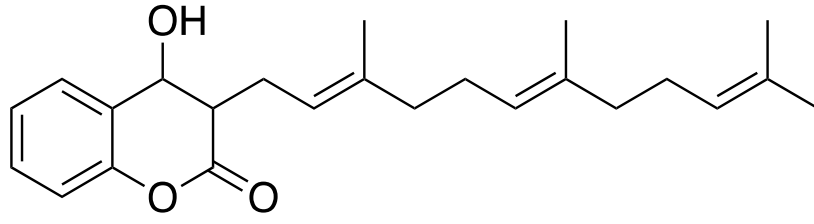
Çiçek durumu panikulat-korimboz; merkezi umbel kısa saplı (0,2-2 cm), ya da sapsız, yan umbeller genellikle verimli ışınlar (6-) 10-20, 1,5-5 cm, umbellulalardaki çiçek sayısı 8-16 (-22), olgun meyve sapı 4-10 mm. Brakteoller 4-6, şeritsi-lanseolat, 0,5-2 mm, düşücü. Sepaller 0,2-0,3 mm. Petaller sarı, 1,5-2 mm, uçtan içe kıvrık. Merikarplar eliptik-oblong, 7-15 × 4-7 mm, sırt tarafındaki kanatlar filiform, yan taraftaki kanatlar 0,5-1 mm genişliğinde, stilopodyum-konikal; olgunlaştığında kahverengi renkte; sırttaki her kanat arasında 1(-2), karın tarafında ise 2-6 reçine kanallı (Sağıroğlu, 2005)

1.3. *Ferula* Türleri Üzerinde Daha Önce Yapılan Çalışmalar

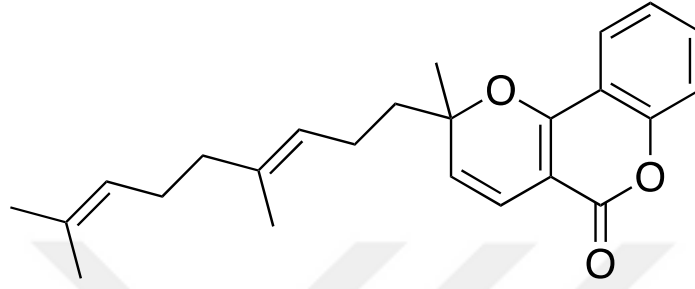
1.3.1. Fitokimyasal Çalışmalar

1.3.1.1. *Ferula* Türlerinde Bulunan Başlıca Kimyasal Bileşikler

Ferula cinsi; glukuronik asit, galaktoz, arabinoz, ramnoz, kükürt içeren türevler, kumarinler, seskiterpenler, seskiterpen kumarinler ve daukan esterleri gibi bileşikler taşır (Miski ve Marby, 1986; Nazari ve Iranshahi, 2011). *Ferula hermonis* köklerinde bulunan daukan-tipi seskiterpen alkol esterleri; ferutinol (jeskeanadiol), ferutin (ferutinol *p*-hidroksibenzoat), teferdin (teferidin, ferutinol benzoat), teferin (ferutinol vanillat) ve epoksiferutinol benzoattır (Abourashed ve ark., 2001). *F. assa-foetida* gomrezininde mikrolobiden, farnesiferol C, farnesiferol B ve kellerin (Rollinger ve ark., 2008), 10'R-karatavisinol, galbanik asit, metil galbanat, farnesiferol A, assafoetidin, feselol ve epi-konferdion gibi kumarin türevi bileşikler bulunmaktadır (Lee ve ark., 2009). *F. fukanensis* K.M. Shen köklerinden 2,3-dihidro-7-metoksi-2*S**,3*R**-dimetil-2-[4,8-dimetil-3(*E*),7-nonadienil]furo[3,2-*c*]kumarin, 2,3-dihidro-7-metoksi-2*R**, 3*R**-dimetil-2-[4,8-dimetil-3(*E*),7-nonadienil]furo[3,2-*c*]kumarin adlı kumarinler ve nerolidol isimli seskiterpen izole edilmiştir (Motai ve Kitanaka, 2006). *F. communis* C-prenil kumarin türevleri ferulenol ve ferprenin içermektedir (Rubiolo ve ark., 2006).



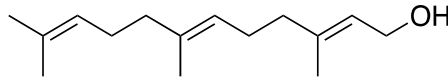
Şekil 1.5. Ferulenol



Şekil 1.6. Ferprenin

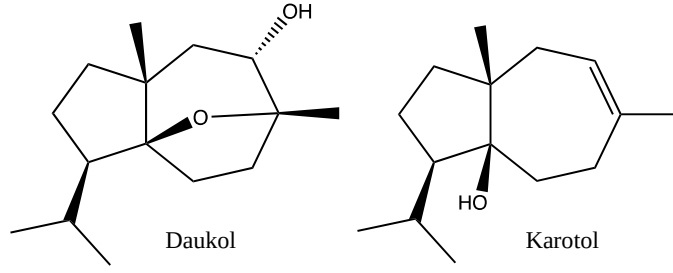
1.3.1.2. *Ferula* Türlerinden Elde Edilen Seskiterpen Daukan Esterleri

Seskiterpenler 15 karbonlu terpenik bileşiklerdir. Terpenler denince akla ilk uçucu yağlar gelmektedir. Ancak seskiterpenlerin uçucu olma özellikleri monoterpenlere göre daha düşük, kaynama noktaları ise daha yüksektir. Seskiterpenlerin biyosentezinde prekürsör farnesoldür (Sell, 2010).



Şekil 1.7. Farnesol

Daukan sınıfı seskiterpenler Apiaceae başta olmak üzere Asteraceae, Rosaceae, Bryophyta, fungi ve deniz canlılarında bulunmaktadır. *Laserpitium latifolium* L.‘dan (Apiaceae) izole edilen lazerpetin, üzerinde çalışma yapılan ilk (1865) daukan türevi bileşiktir. Yapının tamamen aydınlatılması daha basit daukan yapılarının bulunması ile beraber 1970’i bulmuştur. Bu basit yapılardan bir tanesi *Daucus carota* L. (havuç, Apiaceae) tohumlarının uçucu yağından 1909’da izole edilen daukol ve 1925’te izole edilen karotoldür. *Lasianteae fruticosa* (L.) K.M.Becker (Asteraceae) yapraklarından biyoaktivite yönlendirmeli fraksiyonlama ile izole edilmiş böcek kovucu etkili lasidiol anjelat karotol ana yapısı ile ilişkilidir. Daukan türevlerinin büyük çoğunluğu en az bir hidroksil grubunun ester yaptığı iki ya da daha fazla oksijenasyon bölgesi barındırır. Ferutinolün (jeskeanadiol) asetillenmiş türevleri bu daukan türevlerinin en çok rastlanan tipidir. Daukan türevlerine çoğunlukla Apiaceae familyasında ve özellikle *Ferula* cinsinde rastlanmaktadır. Birçok Apiaceae türünün rizomları, lateksi ve toprak üstü kısımlarından daukan türevleri izole edilmiştir (Ghisalberti, 1994).

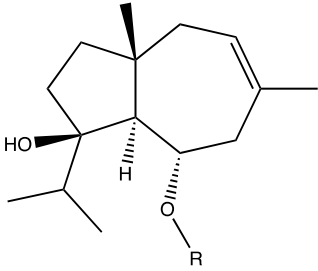
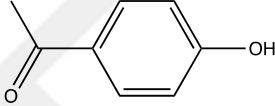
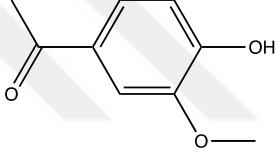
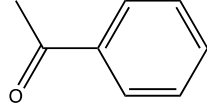
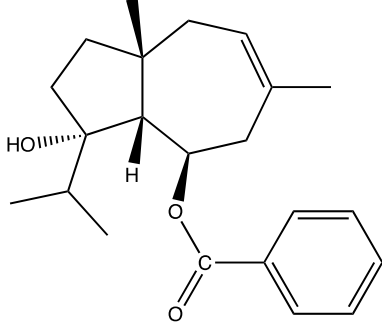


Şekil 1.8. Daukol ve karotol

Tarafımızdan yapılan literatür araştırmasında ferutinin ismine ilk defa 1973'te yayımlanmış bir çalışmada rastlanmıştır (Saidkhodzhaev ve Nikonov, 1973). *F. elaeochytris* benzen ekstresinden teferidin, ferutinin, teferin, ferutidin, ferutanol anjelat, ferutanol salisilat ve ferutanol asetilmetil salisilat izole edilmiştir (Miski ve ark., 1983). *F. tingitana*'dan hazırlanan benzen ekstresinden "tingitanol" isimli (Miski ve Ulubelen, 1984) seskiterpen esteri izole edilmiştir.

F. communis subsp. *communis* L. bitkisinin köklerinin benzen ekstresinden ferutidin (ferutanol *p*-anisat) ile birlikte çoğunlukla daukan iskeletine sahip 13 farklı seskiterpen esteri izole edilmiştir (Miski ve Marby, 1985). *F. tingitana* petrol eteri ekstresinden 14-*p*-anisoiloksi-dauk-4,8-dien, asetil tingitanol, asetildezoksodehidrolazerpitin ve 4- β -hidroksi-6- α -*p*-hidroksibenzoiloksi-10- α -anjeloiloksidauk-8-en izole edilmiştir (Miski ve Marby, 1986). *F. jaeschkeana* Vatke köklerinden hazırlanan MeOH ekstresinden 2,3-epoksi-ferutanol-5- α -vanilat, 2- β -hidroksi-3,4-epoksi-ferutanol ve lanserotol-5- α -[4-hidroksibenzoat] izole edilmiştir (Garg ve Agrawal, 1988). *F. rigidula* köklerinden hazırlanan benzen ekstresinden ferutanolün benzoat, *p*-hidroksibenzoat, *p*-anisat, salisilat, vanillat, *t*-sinnamat, *p*-kumarat, *p*-asetilkumarat esterleri epoksiferutanolün *p*-anisat ve *t*-sinnamat esterleri izole edilmiştir (Miski ve Jakupovic, 1990). *F. arrigonii* kök ve tohumlarından hazırlanan aseton ekstresinden 2- α -hidroksi-ferutidin ve 2-okso-ferutidin izole edilmiştir (Appendino ve ark., 1997).

Çizelge 1.2. Ferutanol (jeskeanadiol) yapısı ve başlıca türevleri

	
Bileşik Adı	R
Ferutanol	H
Ferutinin	
Teferin	
Teferdin	
Teferidin	

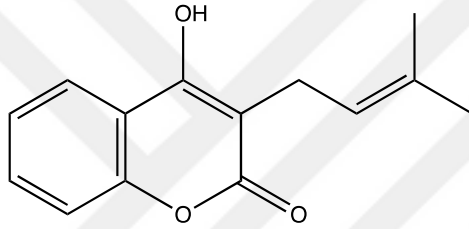
Sonraki çalışmalarda *F. sinaica*'dan 14-hidroksi-dauk-4-en (Ahmed, 1999) ve lanserotriol 9-asetat-6-*p*-hidroksibenzoat (Ahmed ve ark., 2001) izole edilmiştir. *F.*

hermonis Boiss. kökleri diklorometan ekstresinden 2,3- α -epoksijaskeanadiol 5-benzoat izole edilmiştir (Diab ve ark. 2001b). Yine *F. hermonis* köklerinden hazırlanan diklorometan ekstresinden ferutinin, teferidin, teferin ve jeskeanın izole edilmiştir (Diab ve ark. 2001a). *F. hermonis* kökleri hekzan ekstresinden sıvı-sıvı ekstraksiyonu ile alınan asetonitril ekstresinden 14-(4'-hidroksibenzoiloksi)dauk-4,8-dien ve 14-(4'-hidroksi-3'-metoksibenzoiloksi)dauk-4,8-dien izole edilmiştir (Galal ve ark., 2001). *F. kuhistanica* Korovin meyvelerinden hazırlanan etil asetat ekstresinden kuhistanikol H, I ve J isimli daukan türevleri izole edilmiştir (Tamemoto ve ark., 2001). *F. vesceritensis* Coss. & Durieu ex Trab. toprak üstü kısımları diklorometan ekstresinden 10-hidroksilanserodiol-6-anisat, 2,10-diasetil-8-hidroksiferutriol-6-anisat, 10-hidroksilanserodiol-6-benzoat, veskeritenon ve epoksi-veskeritenol izole edilmiş ve yapıları aydınlatılmıştır (Oughlissi-Dehak ve ark., 2008)

1.3.1.3. Ferulozis Olgusu ve *Ferula communis*'in Toksik ve Toksik Olmayan Kemotiplerinin Ayrımı

Ferulozis Sardunya Adası ve Fas'ta *Ferula communis*'in besi hayvanları tarafından tüketilmesiyle ortaya çıkan hemorajik bir tablodur. Toksisitenin kaynağı bitkide bulunan 3-prenil-4-hidroksi kumarinler olarak belirlenmiştir. Bu kimyasal yapıdaki bileşiklerin K vitamini karşıtı etkinlik gösterdiği deneysel yöntemlerle tespit edilmiştir. Ferulozis insanlarda görülmektedir. Toksik *Ferula*'ların yetiştikleri alanda non-toksik *Ferula*'ların da olması ve bunların morfolojik olarak ayırt edilememesi araştırmaların ilerlemesini yavaşlatmıştır. Toplanan birçok bitkide 3-prenil-4-hidroksi kumarinlerin bulunmadığı ve yerlerini daukan esterlerinin aldığı bildirilmiştir (Marchi ve ark., 2003). *F. communis* lateksi EtOAc ile seyreltilerek İTK plağına uygulanmış ferutinin ve ferulenol ise sırasıyla non-toksik ve toksik kemotipleri belirleyebilmek için şahit olarak uygulanmıştır. Takiben plaklardaki lekeler %5 H₂SO₄'in MeOH'deki çözeltisi püskürtülmesi ve ısı uygulanması sonucu belirgin hale getirilmiştir. Non-toksik olarak tanımlanan bitkilerin lateksi yüksek oranda ferutinin içerirken (EtOAc çözünür kısmının %9-18'i), zehirli bitkilerde

ferulenol ana bileşen olarak (EtOAc çözünür kısmının %9-15'i) karşımıza çıkmaktadır. ω -Hidroksi ferulenol ise toksik bitkilerde ferulenol ile birlikte tespit edilmiştir. Ayrıca *F. communis* petiolleri üzerinde yapılan UV mikroskobisinde (365 ve 436 nm) morfolojik olarak ayırt edilemeyen bu iki kemotipin farklı floresans verdiği bildirilmiştir (Sacchetti ve ark., 2003). Marchi ve ark. (2003) çalışmalarında bu iki kemotip arasındaki genetik farklılıkları açıklamayı amaçlamıştır. Araştırmacılar iki kemotip arasında bulunan anlamlı genetik farklılığın ($p < 0,00001$) coğrafyadan bağımsız bir olgu olduğu sonucuna varmış ve gen alışverişini engelleyen bir mekanizmanın muhtemel varlığına işaret etmişlerdir (Marchi ve ark., 2003).



Şekil 1.9. 3-prenil-4-hidroksi kumarin yapısı

İki kemotipi ayırmak için yukarıda belirtilen yöntemlerin yanında yüksek performanslı sıvı kromatografisi/kütle spektroskopisi (YPSK/KS) ve gaz kromatografisi/kütle spektrometrisi (GK/KS) yöntemlerinden de yararlanılmıştır. Özellikle GK/KS yöntemi ile yapılan analizde toksik ve non-toksik kemotiplerin uçucu bileşenleri arasında da ayırt edici kompozisyon farklılıkları gözlenmiştir. Toksik kemotipte ana bileşen olarak aristolen (%47,1) ve (*E,E*)-farnesol (%21,12) öne çıkmaktadır. Non-toksik kemotipte ise uçucu yağ bileşimi ana bileşen allohedikaryol (%53), α -kadinol (%4,2), bisiklogermakren (%2,9) ve ferutinol (%2,2) ile karakterizedir. α -Pinen toksik kemotipin uçucu yağında %0,6 oranında bulunurken non-toksik kemotipte %3,3 oranında bulunmaktadır (Rubiolo ve ark., 2006).

1.3.2. Biyolojik Aktivite Çalışmaları

1.3.2.1. *İn Vitro* Çalışmalar

F. kuhistanica Korovin meyvelerinden izole edilen seskiterpenlerin antibakteriyel etkinliği disk difüzyon tekniği kullanılarak araştırılmıştır. Sonuçlar ampicilin (A) ve kloramfenikole (K) karşı minimum inhibitör konsantrasyon (MİK) değerleri hesaplanarak değerlendirilmiştir. Ferutinin (F) ve teferin (T) metisiline duyarlı *Staphylococcus aureus* (A= 1 µg/mL, K= 4 µg/mL, F= 8 µg/mL, T= 16 µg/mL) ve metisiline dirençli *Staphylococcus aureus* (A= 2 µg/mL, K= 16 µg/mL, F= 16 µg/mL, T= 16 µg/mL), *S. epidermidis* (A= <0,125 µg/mL, K= 2 µg/mL, F= 16 µg/mL, T= 31 µg/mL), *Enterococcus faecalis* (A= 1 µg/mL, K= 2 µg/mL, F= 31 µg/mL, T= 31 µg/mL) ve *Bacillus subtilis*'e (A= <0,125 µg/mL, K= 2 µg/mL, F= 16 µg/mL, T= 31 µg/mL) karşı diğer izole edilen bileşiklere göre daha yüksek, ampicilin ve kloramfenikole yakın antibakteriyel etkinlik göstermiştir (Tamemoto ve ark., 2001)

F. halophila Peşmen toprak altı ve toprak üstü kısımlarının antimikrobiyal etkinliğini değerlendirmek amacıyla sulu ve metanollü ekstraktlar hazırlanmıştır. Metanollü ekstraktan elde edilen, kloroformlu, EtOAc'lı, butanollü fraksiyonlar ve kalan kısım, disk difüzyon yöntemiyle farklı mikroorganizmalara karşı test edilmiştir. Ekstrelerin etkinliği, standart olarak sefazolin, siprofloksasin ve flukonazol kullanılarak değerlendirilmiştir. Deneyde mikroorganizma olarak *S. aureus*, metisiline dirençli *S. aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus cereus*, *B. subtilis*, *Enterococcus faecalis* ve *Candida albicans* kullanılmıştır. Toprak altı kısımların kloroformlu ekstresi, Gram (+), metisiline dirençli *S. aureus*, *S. aureus*, *B. cereus* ve *B. subtilis*'e karşı zayıf antimikrobiyal etkinlik göstermiştir (Baldemir ve ark., 2006).

F. hermonis Boiss. köklerinden hareketle izole edilen 17 daukan tipi seskiterpen bileşiğin antimikrobiyal etkinliği *P. aeruginosa* PAO1, *E. coli*, *B. subtilis*

ATCC6633, *Mycobacterium bovis* BCG Pasteur, *M. tuberculosis* H37Rv, *S. aureus* ATCC6538) ve *C. albicans* SC5314 suşlarına karşı MİK ölçülerek araştırılmıştır. İzole edilen bileşiklerden ferutinin, teferin ve teferidin (Td) *S. aureus* (F= <0,39 µg/mL, T= 1,56 µg/mL, Td= 0,78 µg/mL), *B. subtilis* (F= <0,39 µg/mL, T= 1,56 µg/mL, Td= <0,39 µg/mL), *M. tuberculosis* (F= 2 µg/mL, T= 8 µg/mL, Td= 0,69 µg/mL), *M. bovis* (F= 1,56 µg/mL, T= 6,25 µg/mL, Td= 3,125 µg/mL) karşısında güçlü bir etkinlik göstermiştir. Hiçbir bileşik belirgin bir antifungal etkinlik gösterememiştir (Ibraheim ve ark., 2012).

F. hermonis toprak altı kısımlarından hazırlanan hekzanlı, diklorometanlı, metanollü ve sulu ekstraktların antifungal etkisi disk difüzyon yöntemiyle incelenmiştir. Mikroorganizma olarak *Aspergillus fumigatus* CECT 2071, *A. niger* CECT 2574, *Candida albicans* CECT 1394, *C. lactis-condensi* CECT 1075, *Microsporum gypseum* CECT 2908, *Penicillium purpurogenum* CECT 20436, *Saccharomyces cerevisiae* CECT 1324 ve *Trichophyton mentagrophytes* CECT 2795 suşları kullanılan deneyde amfoterisin B, nistatin, ketokonazol ve klotrimazol standart olarak kullanılmıştır. Çalışmada MİK ve minimum fungusidal konsantrasyon (MFK) ölçülmüştür. Biyoaktivite yönlendirmeli olarak ilerleyen çalışmada elde edilen ferutinin ve teferidinin de antifungal etkileri değerlendirilmiştir. Hekzan ekstresi *T. mentagrophytes* (MİK= 32 µg/mL, MFK= 64 µg/mL) ve *M. gypseum* (MİK= 128 µg/mL, MFK= 256 µg/mL) suşlarına karşı antifungal etkinlik göstermiştir. Yine diklorometan ekstresi de *T. mentagrophytes* (MİK= 32 µg/mL, MFK= 32 µg/mL) ve *M. gypseum* (MİK= 128 µg/mL, MFK= 256 µg/mL) suşlarına karşı antifungal etki göstermiştir. Ferutinin *C. lactis-condensi* (MİK= 32 µg/mL, MFK= 32 µg/mL), *T. mentagrophytes* (MİK= 8 µg/mL, MFK= 16 µg/mL) ve *M. gypseum* (MİK= 16 µg/mL, MFK= 16 µg/mL) suşlarına karşı etkili olmuştur. *T. mentagrophytes* tüm ekstraktlarla birlikte ferutinin ve teferidine karşı da en hassas mantar suşları olmuştur (Al-Ja'fari ve ark., 2013).

Ferula assa-foetida L.'dan elde edilen gomrezin ve gomrezinden izole edilen bileşiklerin antirinoviral etkinlikleri değişik HRV (Human Rhino Virus) serotipleri (1A, 2, 14 ve 16) üzerinde araştırılmıştır. Hem gomrezin (%50 inhibitör

konsantrasyon(IC_{50})= 11 μ g/mL) hem de izole edilen bileşiklerden farnesiferol C (IC_{50} = 2,5 μ g/mL) ve farnesiferol B (IC_{50} = 2,6 μ g/mL) özellikle serotip 2 üzerinde konsantrasyona bağlı etkinlik göstermiştir (Rollinger ve ark., 2008).

F. assa-foetida reçinesinin kloroformlu ekstresinden izole edilen seskiterpen kumarinlerin influenza A (H_1N_1)'e karşı antiviral etkinliği araştırılmış ve 10'R-karatavisinol, galbanik asit, metil galbanat, farnesiferol C, farnesiferol A, farnesiferol B, asafoetidin, feselol, *epi*-konferdion (IC_{50} = 0,26–0,86 μ g/mL) amantadine göre (IC_{50} = 0,92 μ g/mL) daha güçlü etkinlik göstermiştir (Lee ve ark., 2009).

F. communis'ten izole edilen ferulenolün tümör hücrelerinde mikrotübüler sistemi bozduğu tespit edilmiştir. Ferulenolün ve paklitakselin tubulin polimerizasyonu üzerindeki etkisi benzerlik göstermiştir. Her ikisinin de 10 μ M ve 10 nM'lık çözeltilerine ait reaksiyonlar süresince 350 nm'deki absorpsiyonların birbirlerine çok yakın olduğu tespit edilmiştir. Ferulenol 100 nM ve 1 μ M konsantrasyonlarda insan meme (MCF-7, yaklaşık %50, $p<0,01$), kolon (Caco-2, yaklaşık %50, $p<0,001$), over (SK-OV-3, yaklaşık %50, $p<0,05$, $p<0,01$) ve lösemi (HL-60, yaklaşık %60, $p<0,01$) kanser hücrelerine karşı belirgin inhibitör etki göstermiştir (Bocca ve ark., 2002).

F. assa-foetida toprak üstü kısımlarının metanollü ekstresinin antioksidan kapasitesi; DPPH (1-1-difenil-2-pikrilhidrazil) radikal süpürücü etkinlik, indirgeme gücü, NO süpürücü etkinlik, metal şelasyon etki ve demir tiyosiyanat (FTC) testleri ile değerlendirilmiştir. DPPH radikal süpürücü etkinlik testinde IC_{50} = 380 $\pm$ 12 mg/mL bulunmuş referans olarak askorbik asit (IC_{50} = 1,26 $\pm$ 0,11 mg/mL), kersetin (IC_{50} = 1,32 $\pm$ 0,07 mg/mL) ve butil hidroksi anisol (BHA, IC_{50} = 13,49 $\pm$ 1,04 mg/mL) kullanılmıştır. Metal-şelasyon etkinlik testinde IC_{50} = 0,57 $\pm$ 0,02 mg/mL bulunmuş standart olarak etilendiaminteraasetikasit (EDTA, IC_{50} = 18 mg/mL) kullanılmıştır. NO-süpürücü etkinlikte IC_{50} = 270 $\pm$ 3 mg/mL olarak bulunmuş referans olarak kersetin (IC_{50} = 17,01 $\pm$ 0,03 mg/mL) kullanılmıştır. İndirgeme gücü 25-800 μ g/mL konsantrasyon aralığında test edilmiş, sonuçların askorbik asit ile karşılaştırılamayacak kadar düşük olduğu tespit edilmiştir ($p<0,01$). FTC testinde

ekstre 24. saatte %82, 72. saatte %88 inhibisyon sergilemiş ancak etkinliğin askorbik asit ve BHA'ya göre belirgin olarak düşük olduğu tespit edilmiştir ($p<0,01$) (Dehpour ve ark., 2009).

F. hermonis köklerinden izole edilen 17 duken seskiterpen bileşiğin antioksidan etkinliği DPPH radikal süpürücü etki yöntemiyle değerlendirilmiştir. Askorbik asitin referans olarak ($IC_{50}= 12,5 \mu M$) kullanıldığı deneyde, en yüksek etkinliği ferutinin ($IC_{50}= 13,2 \mu M$), teferidin ($IC_{50}= 17,3 \mu M$) ve teferin ($IC_{50}= 11,5 \mu M$) göstermiştir (İbraheim ve ark., 2012)

F. fukanensis K.M. Shen kökleri %80'lik metanol ekstresinden 6 seskiterpen türevi izole edilmiş ve RAW 264.7 hücrelerinde NO salımı üzerine etkileri ve sitotoksiteleri değerlendirilmiştir. İzole edilen bileşiklerden 2,3-dihidro-7-metoksi-2*S**,3*R**-dimetil-2-[4,8-dimetil-3(*E*),7-nonadienil] furo [3,2-*c*]kumarin ($IC_{50}= 33,5 \mu M$), 2,3-dihidro-7-metoksi-2*R**,3*R**-dimetil-2-[4,8-dimetil-3(*E*),7-nonadienil]furo[3,2-*c*]kumarin ($IC_{50}= 36,9 \mu M$) ve nerolidol ($IC_{50}= 25,4 \mu M$) NO üretimini ve uyarılabilir NOS salımını sitotoksiteler göstermeden inhibe etmiştir (Motai ve Kitanaka, 2006).

F. assa-foetida gomrezini asetonlu ekstresinden izole edilen seskiterpen yapıları bileşiklerin NF- κ B inhibitör özellikleri değerlendirilmiş ve 8-asetoksi-5-hidroksiumbellipreninin NF- κ B kaynaklı lusiferaz salınmasını spesifik olarak inhibe ettiği bulunmuştur ($IC_{50}= 15,09 \mu M$) (Appendino ve ark., 2006).

Ferutininin iki östrojen reseptörüne ($ER\alpha$ ve $ER\beta$) karşı agonist/antagonist olup olmadığı, bağlanma afinitesi testi ile 17 β -östradiol'e (%100, $ER\alpha$: $IC_{50}= 3,2 nM$, $ER\beta$: $IC_{50}= 14,6 nM$) karşı değerlendirilmiştir. Ferutinin $ER\alpha$ için agonist (%9,72 $IC_{50}= 33,1 nM$), $ER\beta$ içinse agonist/antagonist (%8,07 $IC_{50}= 180,5 nM$) etkinlik göstermiştir (Ikeda ve ark., 2002).

F. hermonis köklerinden izole edilen ferutinin, östrojen reseptörleri üzerindeki

agonist etkileri nedeniyle, Sprague-Dawley sıçanlarından alınan Median eminens (ME) parçacıklarına uygulanmış ve NOS (nitrik oksit sentaz) uyarımı incelenmiştir. 17β -östradiol, sıçan hipotalamusunda NO salınmasını hızlıca stimüle edebilmektedir. Sonuçlar, ferutininin sıçan ME'inde NO sentaz aktivitesini, 100 µg/mL konsantrasyonda, %49 oranında artırdığını göstermiştir (Colman-Saizarbitoria ve ark., 2006).

F. assa-foetida zamlarından 10 g tartılarak 100 mL distile suda bir gece oda ısısında bekletilmiştir. Süre sonunda ekstre süzöldükten sonra çözünmeden kalan kısım 4,7 g olarak tartılmıştır. Hazırlanan ekstre asetilkolin, histamin ve KCl (Potasyum klorür) ile kasılma oluşturulmuş izole kobay ileumuna 3 mg/mL konsantrasyonda uygulandığında, spontan kasılmalarda kontrol grubuna göre %54 azalma gözlenmiştir. İndometazin, propanolol, atropin ve klorfeniramin ile ön inkübasyon yapılmış dokularda herhangi bir gevşeme etkisi gözlenmemiştir (Fatehi ve ark., 2004).

F. assa-foetida tohumlarından elde edilen etanollü ekstre (98 mg) ve köklerinden elde edilen %50'lik etanollü ekstresinden (63 mg) hazırlanan "Maskülin" adı verilen tablet formundaki preparatın vazodilatör etkinliği, Sprague-Dawley sıçanlardan çıkarılan arteriyel halkalar üzerinde araştırılmıştır. Sıçanlardan alınan iki arteriyel halkadan birinin endoteli çıkarılmıştır. Endotelli ve endoteli alınmış arteriyel halkalardan oluşan gruplara maskülin, 0,2 mg/mL konsantrasyonda uygulanmıştır. Endotelli halkalarda maskülin uygulamasında kontrol grubuna göre anlamlı bir gevşeme cevabı alınmıştır ($p<0,05$) (Kassis ve ark., 2009).

1.3.2.2. *In vivo* Çalışmalar

F. hermonis köklerinden izole edilen ferutinin, teferin ve teferidin'in antienflamatuvar etkileri karagen ile oluşturulmuş pençe ödem testiyle 100 mg/kg oral dozda Wistar sıçanlarına verilerek değerlendirilmiştir. %5 Tween 80 içeren suda çözölen örnekler referans olarak 100 mg/kg asetilsalisilik asit ve kontrol grupları ile

karşılaştırılmıştır. Karagen enjeksiyonunu takiben 2. saatte ödem miktarındaki artış ferutinin grubunda %5-6 ve teferin grubunda %13-14 olarak gerçekleşmiştir. Ferutinin kontrol grubuna ve aspirine göre belirgin etkinlik göstermiştir ($p<0,05$). Teferidin grubunda ise 2. saatte %20; 3. saatte ise %30 ödem artışı kontrol grubunun üzerinde gözlenmiştir. Teferidin belirgin proenflamatuvar etki göstermiştir ($p<0,05$) (Geroushi ve ark., 2011).

Suudi Arabistan'dan toplanan *F. assa-foetida* reçinesinden hazırlanan dekoksasyon 14 gün boyunca, günlük 0,2 g/kg dozda, normal ve alloksan ile oluşturulmuş diyabetik sıçanlara enjekte edilmiştir. Deney sonunda tedavi grubunda hayvanların ortalama vücut ağırlıkları başlangıçta 195 ± 11 g iken deney sonunda 196 ± 6 g olarak hesaplanmıştır. Diyabetik kontrol grubunda başlangıçta 210 ± 7 g olan ortalama vücut ağırlığı 14 gün sonunda 186 ± 9 g olarak hesaplanmıştır. Bununla beraber tedavi grubunda ortalama serum glukoz seviyesi 6,75 mmol/L olarak ölçülmüş ve sonuçlar diyabetik kontrol grubuna göre ($10,28\pm0,2$ mmol/L) belirgin bir şekilde düşük bulunmuştur ($p<0,05$). Ortalama serum insülin seviyeleri tedavi grubunda ($0,48\pm0,05$) diyabetik kontrol grubuna göre ($0,33\pm0,06$ mmol/L) belirgin bir şekilde düşük bulunmuştur ($p<0,05$) (Abu-Zation, 2010).

N-metil-*N*-nitrozüre (MNU) ile oluşturulmuş meme kanser epitelindeki değişiklikleri gözlemek amacıyla Sprague-Dawley sıçanlara, diyetlerinde tek doz MNU (+normal beslenme) ya da tek doz MNU ile birlikte %1,25 (MNU + %1,25) ve %2,5 (MNU + %2,5) h/h dozda *F. assa-foetida* gomrezini verilmiştir. MNU grubunda ilk tümörün görülmesi ortalama olarak 3,55 hafta olarak tespit edilmiştir. MNU + %1,25 ve MNU + %2,5 gruplarında ise ilk tümörün görülmesi ortalama 4,7 hafta olarak tespit edilmiş ve bu sonuç istatistiksel açıdan anlamlı ($p<0,005$) bulunmuştur. MNU grubunda 109 tümör tespit edilmiş, MNU + %1,25 (72) ($p<0,005$) ve MNU + %2,5 (46) ($p<0,001$) gruplarında ise tümör sayısının belirgin şekilde düşük olduğu belirlenmiştir. Tümör yükü değerlendirildiğinde MNU + %1,25 grubunda %66, MNU + %2,5 grubunda %43'lük belirgin bir azalma ($p<0,005$) tespit edilmiştir. Deneyde oluşan tümör hacimleri de ölçülmüş ve her iki denek grubunda da tümör hacimlerinin anlamlı biçimde düşük olduğu (MNU= $3,2\pm0,6$;

MNU + %1,25= $1,9\pm0,8$ ($p<0,005$), MNU + %2,5= $1,3\pm0,6$ ($p<0,001$) tespit edilmiştir (Mallikarjuna ve ark., 2003).

F. assa-foetida zambının sulu ekstresi, hipotansif etkisinin araştırılması amacıyla anestezi altındaki Sprague-Dawley (250-300 g) sıçanlara 0,3-2,2 mg/100 g vücut ağırlığı dozda verilmiştir. Sıçanların bazal kan basınçları ortalaması 109 ± 7 mmHg olarak ölçülmüştür. Tedavi gruplarında doza bağlı olarak ortalama kan basınçları 29-69 mmHg arasında düşüş gözlenmiştir (Fatehi ve ark., 2004).

F. gummosa tohumlarından elde edilen aseton, MeOH ve EtOAc ekstraktlarının antikonvülzan etkinliği ve toksisitesi erkek fareler üzerinde araştırılmıştır. Deneylerde sadece asetonlu ekstrede etki tespit edilmiştir. Tohumların asetonlu ekstresi, fareleri maksimum elektroşok (ED_{50} (%50 etkili doz)= 198,3 mg/kg) ve pentilentetrazol (ED_{50} = 55 mg/kg) ile oluşturulmuş konvülsiyonlardan korumuştur. Hayvanlarda ekstre uygulanması neticesinde oluşan sedasyon ve motor bozukluk rotarod testi ile ölçülmüştür (TD_{50} (%50 toksik doz)= 375,8 mg/kg). Asetonlu ekstrenin LD_{50} 'si ise 1720,7 mg/kg olarak tespit edilmiştir (Sayyah ve ark., 2002).

F. jaeschkeana Vatke bitkisinin toprak üstü kısımlarından hazırlanan hekzanlı ekstre, olgunlaşmamış dişi Sprague-Dawley sıçanlara verilmiş, üreme organlarında meydana gelen morfolojik ve fonksiyonel değişimler araştırılmıştır. Ekstre, 50 mg/kg dozda, arap zambkı süspansiyonu içinde oral olarak sıçanlara uygulanmıştır. Sıçanlar 15, 30 ve 45 gün boyunca ekstre uygulanacak üç gruba ayrılmıştır. Sıçan overleri üzerinde yapılan morfometrik analizlerde gelişen ortalama folikül sayıları 30 gün ve ($2,2\pm0,4$) 45 gün ($0,8\pm0,5$) gruplarında kontrol grubuna göre belirgin bir düşüş gözlenmiştir ($p<0,05$). Yine sıçan overlerindeki olgun folikül sayıları 30 gün ve ($0,5\pm0,2$) 45 gün ($1,3\pm0,4$) gruplarında kontrol grubuna göre belirgin bir düşüş ve neticesinde korpus luteum oluşumu gözlenmiştir ($p<0,05$). Ortalama korpus luteum sayıları 30 gün grubunda $2,4\pm0,1$, 45 gün grubunda ise $3,1\pm0,1$ olarak tespit edilmiştir ($p<0,05$). Ortalama yaş uterus ağırlıklarında her üç tedavi grubunda da belirgin bir artış (15, 30 ve 45 gün sırasıyla; 276 ± 11 , 287 ± 15 , 298 ± 14 mg/100g, $p<0,05$) gözlenmiştir. 45 günlük ekstre uygulaması vajinanın açılmasına ve

kornifikasyonuna neden olmuştur. Ayrıca, 45 günlük uygulama grubundaki sıçan overleri korpus luteuma çok benzer bir yapılanma göstermiştir (Prakash ve Sharma, 1997).

F. assa-foetida etanolü ekstresi (400 mg/kg, oral) ve *Melia azedarach* kloroform fraksiyonunun (250 mg/kg, oral) gebelik üzerindeki etkileri Sprague-Dawley sıçanlarında araştırılmıştır. Dişiler bir gece erkek sıçanlarla aynı kafeste tutulmuş ve sabahında birleşme olduğu gözlemlendiğinde gebeliğin 1. günü olarak kabul edilmiştir. Deney gebeliğin 1. gününde başlanmış ve 7. günde bitirilmiş, hayvanlar 10. günde otopsiye alınarak gebelik durumları incelenmiştir. *F. assa-foetida* grubunda %67; *M. azedarach* grubunda ise %83 oranında gebeliğin oluşmadığı belirlenmiştir (Keshri ve ark., 2004).

Overektomili dişi sıçanlarda *F. hermonis* asetonlu ekstresinin cinsel proseptif ve reseptif davranışlar üzerindeki akut ve subkronik etkileri araştırılmıştır. Deney hayvanlarına normal cinsel fonksiyon gösterebilmeleri için subkütan yolla östradiol benzoat ve progesteron verilmiştir. Bu yolla hayvanlarda östrus sağlandıktan sonra ekstreler oral yoldan belirlenen doz ve sürelerde verilmiştir. Akut tedavi dozu 30 ve 60 mg/kg olarak belirlenmiştir. Subkronik dozlar ise 1 ve 10 mg/kg olarak 10 gün boyunca uygulanmıştır. 60 mg/kg akut doz lordoz katsayısını, ($p<0,001$) ve lordoz oranını ($p<0,001$) belirgin şekilde düşürmüştür. Subkronik dozlarda lordoz katsayısında (LK) ($p<0,001$) ve lordoz oranında (LO) ($p<0,005$) belirgin bir düşüş gözlenmiştir. Yine proseptif davranışlarda 60 mg/kg grubunda ($p<0,05$) belirgin bir azalma gözlenmiştir. Subkronik dozlarda da ($p<0,05$) proseptif davranışların belirgin olarak azaldığı tespit edilmiştir (Zanoli ve ark., 2005). Takip eden bir başka çalışmada overektomili dişi sıçanlara ekstre yerine *F. hermonis* içeriğinde bulunan ferutinin, teferin ve teferidin (2,5 mg/kg) oral yolla verilmiş ve cinsel davranışlardaki değişiklikler bir dizi test ile izlenmiştir. Sadece ferutinin LK ve LO değerlerinde belirgin bir düşüşe ($p<0,001$) neden olmuştur. Diğer testlerde hiçbir bileşik deney hayvanlarının cinsel davranışlarında değişiklik oluşturmamıştır (Zavatti ve ark., 2006)

Ferutininin kronik uygulamasının overektomili (östrojen tedavisi uygulanmamıştır) dişi sıçanların cinsel davranışları üzerindeki etkisini araştırmak amacıyla deney hayvanlarına 4 hafta boyunca günlük 0,2 ve 0,5 mg/kg oral dozda ferutinin verilmiştir. Etkinliği karşılaştırmak amacıyla hayvan başına haftada iki kere 1,5 µg subkütan östradiol benzoat (ÖB) enjekte edilmiştir. Hayvanlara 1, 2 ve 3. haftalarda eş seçimi, reseptivite, proseptivite ve 4. haftada denetimli çiftleşme testleri uygulanmıştır. Eş seçimi testinde 3. haftada seçim skorları 0,2 mg/kg ($0,74 \pm 0,05$), 0,5 mg/kg ($0,74 \pm 0,05$) ve ÖB grubunda ($0,70 \pm 0,08$) kontrol grubuna göre anlamlı bir artış göstermiştir ($p < 0,05$). Reseptivite testinde LK (Lordoz katsayısı) ve LO (Lordoz oranı) hesaplanmıştır. 1 ve 2. haftalarda tedavi grupları ($p < 0,01$) ve ÖB grubu ($p < 0,001$) LK değerleri kontrol grubuna göre anlamlı şekilde yükselmiştir. 3. Haftada ise en yüksek LK değerlerine ulaşılmıştır ($p < 0,001$). Tedavi ve ÖB gruplarında LO değerlerinde her üç haftada da kontrol grubuna göre belirgin bir artış ($p < 0,001$) tespit edilmiştir. 1. Haftada tedavi grupları PK ve PO değerlerinin ÖB grubuna göre anlamlı olarak daha düşük olduğu tespit edilmiş ($p < 0,01$) 2. haftada anlamlı farklılık gözlenmemiştir. 3. haftada ise sadece 0,2 mg/kg grubunda düşük PK ve PO değerinde ÖB grubuna göre anlamlı fark gözlenmiştir ($p < 0,05$). Hayvanların dakikadaki proseptif davranış sayıları ÖB grubunda her 3 haftada da (1.hafta= $4,24 \pm 0,6$, 2.hafta= $6,09 \pm 1,49$, 3.hafta= $5,97 \pm 0,89$) kontrol grubuna ($0,28 \pm 0,08$) göre anlamlı bir artış ($p < 0,01$, $p < 0,001$) gözlenmiştir. Ferutinin 0,2 mg/kg ve 0,5 mg/kg grupları proseptif davranışları 3. haftada sırasıyla $2,57 \pm 0,38$ ve $2,45 \pm 0,53$ 'e yükselmiş ve kontrol grubuna göre anlamlı ($p < 0,05$) olarak yükselme göstermiştir. Denetimli çiftleşme testlerinde temas-dönüş gecikmesi ve ortam terk etme yüzdeleri ölçülmüştür. Her iki değerlendirmede biniş, intromisyon ve ejakülasyon davranışları gözlenmiştir. Denetimli çiftleşme testinde tedavi grupları ve ÖB grubu arasında anlamlı bir fark oluşmamıştır (Zavatti ve ark., 2009).

Bir başka çalışmada overektomili sıçanlarda 0,5 mg/kg dozda ferutinin etkinliği bu sefer ÖB (östradiol benzoat) ile birlikte (F+ÖB) veya tek başına ferutinin verilerek kontrol ve sadece ÖB tedavisi alan deney gruplarıyla karşılaştırılarak araştırılmıştır. Uygulamanın 2, 3 ve 4. haftalarında hayvanların cinsel davranışları değerlendirilmiştir. Tüm tedavi grupları tüm tedavi boyunca kontrol grubuna göre

belirgin şekilde yüksek LK (Lordoz katsayısı) sonuçları vermiştir ($p<0,001$; 4. hafta F+ÖB için $p<0,01$). 2. haftada ferutinin grubunda LK 40 ($p<0,001$) altındayken F+ÖB grubunda 50 ($p<0,01$) civarında seyretmiş ve bu sonuçlar tüm haftalık ölçümlerde 80'e yakın LK değeri veren ÖB grubundan belirgin şekilde düşük bulunmuştur. 4. hafta değerlendirmesinde ferutinin grubunda LK 60'a yükselirken F+ÖB grubunda 40'ın altına inmiştir. LO (Lordoz oranı) değerlerine bakıldığında yine tüm tedavi gruplarının kontrol grubundan anlamlı olarak yüksek sonuç verdiği tespit edilmiştir ($p<0,001$). 2. Haftada ferutinin grubunda 1'e yakın seyreden LO 4. haftada 1.5 seviyesine yaklaşmış olsa da 2'ye yakın LK veren ÖB grubuna göre anlamlı olarak düşük kalmıştır ($p<0,01$). F+ÖB LK değeri 2. haftada 1.5'a yakın iken 4. haftada düşüş göstermiştir. 2. haftada ÖB grubuyla anlamlı bir fark yokken 4. haftada anlamlı olarak daha düşük LK değeri ölçülmüştür ($p<0,001$). Proseptif davranış sayısı açısından 2. haftada ÖB ($p<0,01$) ve F+ÖB ($p<0,05$), 3. haftada ÖB ($p<0,001$) ve F+ÖB ($p<0,05$) ve 4. haftada sadece ÖB ($p<0,001$) grupları kontrol grubuna göre anlamlı bir artış sağlamıştır. Proseptif davranış sayıları 4. haftada ferutinin ve F+ÖB gruplarında 2 civarında iken bu değer 6'nın üzerine çıktığı ÖB grubuna göre anlamlı bir fark oluşmuştur ($p<0,001$) Deneylerin sonunda hayvanların yaşamlarına son verilerek hipotalamusları çıkartılmış ve östrojen reseptör- α (ER α) seviyeleri ölçülmüştür. Ferutinin ve F+ÖB gruplarında ER α seviyeleri yaklaşık %50 civarında bir artış göstererek kontrol grubundan anlamlı ölçüde yüksek bulunmuştur ($p<0,05$). ÖB grubu ise %200 civarında bir artış göstermiş ve diğer tedavi grupları ile aralarındaki fark anlamlı bulunmuştur ($p<0,01$). Ferutinin tek başına uygulandığında ER α salınmasında artış ve cinsel davranışlarda gelişme sağlamıştır. Ancak östradiol ile verildiğinde östradiole cevabı azaltarak antiöstrojenik etkinlik göstermiştir (Zanoli ve ark., 2009)

Ferula hermonis tohumlarından elde edilen sabit yağın erkek sıçanlarda erektile fonksiyon artırıcı etkinliği ve toksisitesi araştırılmıştır. Erektile fonksiyon etkinliği, Penil Ereksiyon İndeksi hesaplanarak değerlendirilmiştir. Çalışma sonunda ED₅₀ değeri (12,03 mg/kg), LD₅₀ değerinden (10,6 g/kg) 880 kere düşük bulunmuştur. Sıçanlar 28 gün boyunca değişen dozlarda tohum yağına maruz bırakılmıştır. 0,05 ve 0,5 g/kg dozlarda tedavi kaynaklı hiçbir ölüm gerçekleşmemiştir. 2 g/kg dozda ise 28

günlük periyotta 10 sıçanın 7'sinde ölüm görülmüş, bunlardan 5'nin tedavi kaynaklı olduğu tespit edilmiştir. Bu nedenle *F. hermonis* tohum yağının sıçanlarda erektile fonksiyonu güçlendirebileceği, ancak uzun kullanımında bazı toksisitelerin oluşabileceği sonucuna varılmıştır (El-Thaher ve ark., 2001).

F. hermonis köklerinden hazırlanan PE, EtOAc, MeOH ve sulu ekstrelerin sıçanlara 600 mg/kg dozda, oral yolla uygulandığı çalışmada, sıçanların cinsel aktivitelerindeki değişimler, biniş ve birleşme davranışları gözlemlenerek incelenmiştir. Deneyde ekstre, kontrol grubunun yanında sildenafil sitrat (30 mg/kg dozda) ile de karşılaştırılmıştır. Ekstreler içinde sadece MeOH ekstresi alan sıçanlarda dakikadaki biniş sayısı $5 \pm 1,6 \text{ dak.}^{-1}$ ile sildenafil ($1 \pm 0,5 \text{ dak.}^{-1}$) ve kontrol ($3 \pm 1,2 \text{ dak.}^{-1}$) grubuna göre belirgin şekilde artmıştır ($p < 0,05$). Sildenafil grubunda ereksiyon süresi uzamış olsa da erkek sıçanlar dişiye yönelmek yerine erekte penislerini yalamayı tercih etmişlerdir. PE ve EtOAc gruplarında kontrol grubuyla karşılaştırıldığında dakikada biniş sayısı (PE= $1 \pm 0,4$, EtOAc = $1 \pm 0,4 \text{ dak.}^{-1}$) ve intromisyon sayısında (PE= $0,05 \pm 0,01$, EtOAc = $0,1 \pm 0,03 \text{ dak.}^{-1}$) belirgin düşüş ve intromisyon gecikmesinde (PE= $20 \pm 3,4$, EtOAc = $10 \pm 0,4 \text{ dak.}$) belirgin artış gözlenmiştir ($p < 0,05$) (Hadidi ve ark., 2003).

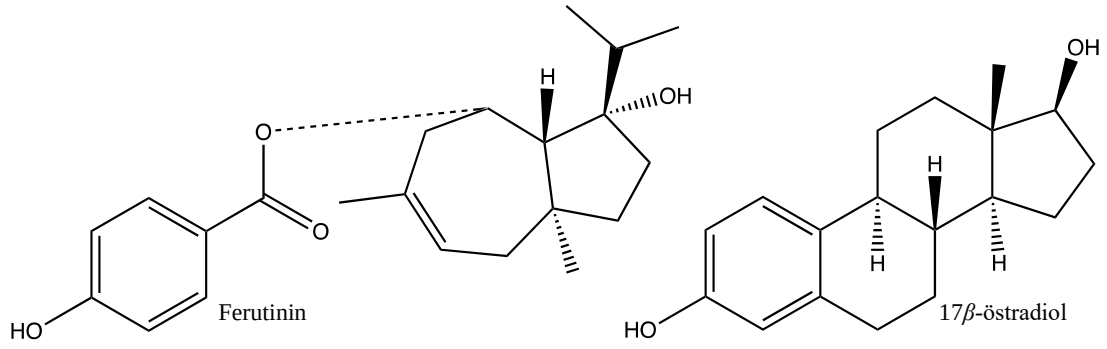
F. assa-foetida tohumlarından elde edilen etanollü ekstre (98 mg) ve köklerinden elde edilen %50'lik etanollü ekstresinden (63 mg) hazırlanan "Maskülin" adı verilen tablet formundaki preparatın ereksiyon üzerindeki etkileri, Sprague-Dawley sıçanlar üzerinde araştırılmıştır. Bir hafta boyunca 200 mg/kg günlük tek doz halinde maskülin uygulanan erkek sıçanların bulunduğu kafesin yanında bulunan kafesin yanına üç aktif dişi yerleştirilmiş ve cinsel istek uyanması sağlanmıştır. Bu işlemi takiben 30 dakika sonra tedavi grubuna oral gavaj ile 500 mg/kg ekstre verilirken kontrol grubu normal yem ile beslenmiştir. Ereksiyon sayıları 1., 2. ve 3. saatlerde kontrol grubunda sırasıyla yaklaşık 4,7, 4 ve 4 ereksiyon gözlenirken, tedavi grubunda sırasıyla 19,1, 23 ve 22 ereksiyon gözlenmiş ve aradaki farkın anlamlı olduğu tespit edilmiştir ($p < 0,05$). Maskülin LD₅₀ değeri 5 g/kg olarak tespit edilmiştir (Kassis ve ark., 2009).

1.3.2.3. Klinik Çalışmalar

F. assa-foetida tohumlarından elde edilen etanollü ekstre ve köklerinden elde edilen %50'lik etanollü ekstreden hazırlanan preparatın, erkek fertilitesi, libidosu ve erektil fonksiyonunun güçlendirilmesindeki etkinlik ve güvenilirliği, hem insan hem de sıçanlar üzerinde araştırılmıştır. Tablet formunda ve "Maskülin" adı verilen bu preparat, tablet başına 98 mg kurutulmuş tohum ekstresi, 63 mg kurutulmuş kök ekstresi, 4,1 mg E vitamini ve 144,9 mg trikalsiyum fosfat içermektedir. Üç ay boyunca günde bir adet maskülin tablet alan sağlıklı erkekten oluşan iki gruba çalışılmış, maskülin tüm erkekler tarafından iyi tolere edilmiş ve hiçbir yan etki bildirilmemiştir. İlk grup azospermili hastalardan (n= 60), ikinci grup ise ED'lu ve tedavisi olmayan nedenlerden impotanslı hastalardan (n=25) oluşturulmuştur. Azospermili gruptan 10 (%17) hastanın sperm sayısı 3 aylık tedavi sonrası 0'dan 0,8 milyon/mL'ye yükselmiştir ($p<0,004$). Sperm motiliteleri ise %19'a yükselmiştir ($p<0,007$). Ek olarak ikinci grupta belirgin şekilde libido ve erektil fonksiyon artışı gözlenmiştir. İkinci grupta sperm sayıları 2,2'den 2,8 milyon/mL'ye ($p<0,0001$) sperm motilitesi ise %23,8'den %43,2'ye ($p<0,0001$) yükselmiştir (Kassis ve ark., 2009).

1.4. Majör Daukan Esteri Ferutininin Biyolojik Aktivitedeki Rolü

Fitoöstrojenler, östrojenik ya da antiöstrojenik özellik gösteren maddelerdir. Etkilerinin 17β -östradiol ile işlev ve yapı açısından benzemelerinden dolayı östrojen reseptörlerine kolay bağlanmaları yoluyla ortaya çıkmaktadır (Büyüktuncer ve Başaran, 2005). *F. hermonis* köklerinde majör daukan esterisi olarak bulunan ferutinin, östrojen reseptörlerinden $ER\alpha$ için agonist, $ER\beta$ içinse agonist/antagonist etkili potent bir fitoöstrojendir (Ikeda ve ark., 2002). Ana poliol yapısı olan ferutinol inaktiftir ve östrojenik aktivite yapısındaki *p*-hidroksibenzoat parçasının bağlanmasıyla ortaya çıkmaktadır (Greige-Gerges ve ark., 2008).



Şekil 1.10. Ferutinin ve 17β östradiol.

Ülkemizde ve dünyada gün geçtikçe artan bir şekilde bitkiler ve bunlardan hazırlanan ürünler (fitofarmasötik) çeşitli hastalıkların tedavisinde kullanılmaktadır. Ancak yetkin olmayan, bilgisiz kişilerin fırsatçılıkları, ulusal kanallar ve internet üzerinden satışlarla birlikte ortaya çıkan bilgi kirliliği halk sağlığı açısından ciddi bir tehdit unsurudur. Bu durum çoğu hekimin fitofarmasötiklerin tedavi amaçlı kullanımına önyargılı yaklaşmasına neden olmaktadır. Zengin bir floraya sahip olan ülkemizde tıbbi bitkiler üzerinde yapılacak kapsamlı bilimsel çalışmalar, daha fazla fitofarmasötiğin tedavi ve/veya tamamlayıcı tedavi olarak seçenek haline gelmesine ön ayak olacaktır. Bu tür çalışmalar gerek halk sağlığı gerek ülke ekonomisi açısından önem arz etmektedir. ED (Bölüm 1.1.2.) hem fiziksel hem de fizikososyal etkileri olan, hastanın da partnerinin de yaşam kalitesini belirgin derecede düşüren bir tıbbi durumdur. ED'un koroner arter ve periferik vasküler hastalıklarının erken habercisi olduğu yönünde kanıtlar artmaktadır (Hatzimouratidis ve ark., 2016). ED görülme sıklığının yaşla beraber arttığı, yaşlanma ile birlikte gelen problemlerin ötesinde hipertansiyon, diyabet, sigara, obezite, hiperlipidemi gibi risk faktörlerinin belirgin şekilde ED ile bağlantılı olduğu bildirilmiştir (Gandaglia ve ark., 2014). ED tedavisinde birinci basamak tedavi ajanı olan PDE-5 inhibitörleri ED tedavisinde yeni bir dönem açmışlardır (Mcmahon, 2002). Ne var ki sildenafilin N(G)-nitro-L-arjinin metil ester (L-NAME) ile hipertansiyon oluşturulmuş ratlarda ereksiyon için önemli bir nörotransmitter olan NO eksikliğini gideremediği daha önce bildirmiştir (Gur ve ark., 2010). Bir başka çalışmada ise *Punica granatum* (nar) meyve suyu (NS) ve majör fenoliklerinden elajik asitin (EA) KK dokusu üzerinde gevşetici etkisi (%94 ve %51) bildirilmiş ve bu etkinin L-NAME varlığında da devam ettiği görülmüştür (Oztekin ve ark., 2014). Diyabetik erkeklerde, ED görülme sıklığı

%50'dir (Thorve ve ark., 2011). ED, diyabetik hastalarda sağlıklı bireylerden 10 yıl önceden görülmeye başlamaktadır. Yapılan klinik çalışmalarda, ED'lu diyabetik erkeklerde sildenafil tedavisinin %60 ve %75 civarında iyileşme sağladığı bildirilmiştir (Phe ve Roupret, 2012). Önceki bir meta-analiz ise sildenafilin diyabetik erkeklerde cinsel fonksiyonu %60 oranında düzelttiği gözlenmiştir. Non-diyabetiklerde sildenafil tedavisine yanıtın belirgin (%83) olarak daha yüksek olduğu bulunmuştur (Fink ve ark., 2002). Yüksek etkinlik ve tolerabiliteye karşın, PDE-5 inhibitörleri kullanan hastaların, %20-30'u tedaviden fayda göremezken, diyabet hastalarında bu oran %40'lara yaklaşmaktadır. Bu durum tedavide yeni alternatiflerin araştırılması gerekliliğini güncel tutmaktadır. Cinsel gücü artırmak amacıyla, halk arasında ve geleneksel tıpta kullanılan bitkiler genellikle afrodizyak etkiye sahiptirler. Afrodizyak terimi antik Yunan'da aşk ve romantizm tanrıçası Afrodit'ten gelmektedir. Günümüzde cinsel fonksiyon bozukluğunun tedavisinde veya cinsel gücün artırılmasında etkili maddeler "afrodizyak" olarak tanımlanmaktadır. Cinsel istek, merkezi sinir sistemi tarafından yönetilmektedir. Afrodizyak maddeler ise özgül nörotransmitterlerin ya da özgül eşey hormonlarının seviyelerini düzenleyerek cinsel isteğin artırılmasında etkinlik gösterirler (Patel ve ark., 2011). Chen ve Chiu (2006) *Epimedium brevifolium* yapraklarından hazırlanan sulu ekstrenin erkek Sprague-Dawley (300-450 g v.a.) sıçanlara i.k. yolla uygulanarak ereksiyon üzerindeki etkisini *in vivo* olarak araştırmıştır. Ekstre 6,5 mg ve üstü dozlarda ereksiyon üzerinde anlamlı artış bir sağlamıştır. Veriler L-NAME varlığında anlamlı bir değişiklik göstermemiştir. Aynı zamanda stereotaksik yolla hayvanların beyinlerinin belli bölgelerine (hipotalamus, hipokampus gibi) de ekstre uygulaması yapılmıştır. Beynine *Epimedium brevifolium* yaprak ekstresi uygulanan hayvanlarda ereksiyon üzerinde anlamlı bir etki farkı tespit edilememiştir. Hatay ilinden toplanan *Ferulago syriaca* köklerinden hazırlanan sulu ekstrenin fenilefrin (Phe) ile kastırılmış insan KK dokusu üzerindeki gevşeme etkileri *in vitro* organ banyosunda araştırılmıştır. Ekstre doza bağlı olarak gevşeme yanıtı (%17-87) oluşturmuştur. Ekstre uygulaması ile alınan gevşeme yanıtlarında L-NAME varlığında sadece düşük ekstre konsantrasyonlarında inhibisyon oluşurken, oksadiazolo[4,3- α]kinoksalin-1-on varlığında tüm konsantrasyonlarda inhibisyon gözlenmiştir. Elde edilen veriler ışığında, araştırmacılar *Ferulago syriaca* sulu ekstresinin insan KK dokusu

üzerindeki gevşetici etkisinin NO uyarımı ve cGMP üzerinden gerçekleştiği sonucuna varmıştır (Ozturk ve ark., 2012). Literatürden verilen yukarıdaki örnekler, bitkilerin afrodizyak olma potansiyellerinin yanında PDE-5 inhibitörleri gibi ereksiyona doğrudan penil mekanizmalar üzerinden etki edebileceği yönünde kanıtlar sunmaktadır. Cinsel fonksiyon üzerine *Ferula* taksonları ile daha önce yapılan biyolojik aktivite çalışmaları ekstre ve/veya saf maddelerin oral yolla verilmesi ve cinsel birleşme davranışlarının gözlemlenmesi yoluyla verilerin elde edildiği çalışmalardır. NO uyarımı ile ilgili tek çalışmada, *F. hermonis* köklerinden izole edilen ferutinin, östrojen reseptörleri üzerindeki agonist etkileri nedeniyle, Sprague-Dawley sıçanlarından alınan median eminens parçacıklarına uygulanmış ve NOS uyarımı incelenmiştir. 17β -Östradiol, sıçan hipotalamusunda NO salınmasını güçlü bir şekilde stimüle etmektedir. Sonuçlar, ferutininin sıçan median eminensinde NOS aktivitesini, 100 µg/mL konsantrasyonda, %49 oranında artırdığını göstermiştir (Colman-Saizarbitoria ve ark., 2006).

Bu tez çalışmasında amacımız, öncelikle ülkemizde yetişen ve cinsel gücü artırmak amacıyla halk ilacı olarak kullanılan *F. elaeochoytris*'in ve doğal habitat olarak daha geniş alana yayılan ve kültüre elverişlilik açısından uygun olabilecek *F. communis* subsp. *communis*'in ED tedavisindeki potansiyelinin ve güvenilirliğinin gerek fitokimyasal açıdan, gerekse *in vitro* ve *in vivo* modellerle araştırılmasıdır. Rubiolo ve ark. (2006) *F. communis* kemotipleri üzerinde yaptıkları çalışmada toksik ve non-toksik kemotipleri birbirinden ayırma için analizler yapmıştır. Bu analizlerde, toksik kemotipin ferulenol ve türevlerini içerirken ferutinin ve ferutinine benzer yapıdaki daukan seskiterpenleri çok daha düşük miktarda ya da hiç içermediği tespit edilmiştir. Bu nedenle çalışmanın yapılacağı bitkilerde ferulenol ve ferutinin varlığının tespiti güvenlik açısından önem taşımaktadır. Bu doğrultuda çalışmada kullanılacak olan bitkilerin kimyasal içeriğinin ve zehirli kumarin türevlerinin bitkilerde bulunup bulunmadığının araştırılması, farklı çözücülerle ekstraktlar hazırlanması, etkiden sorumlu muhtemel bileşiklerin izolasyonu ve bitkilerde bulunan ferutinin miktarının YPSK yöntemi ile belirlenmesi hedeflenmektedir. Fitokimyasal çalışmalar sonrasında hazırlanan ekstraktların ve izole edilen bileşiğin/bileşiklerin diyabetik sıçanlarda gelişen ED üzerinde düzeltici etkisinin

olup olmadığının araştırılması amaçlanmıştır. Önceki çalışmalar *Ferula* türleri ve bunlardan izole edilen ferutin bileşiğinin merkezi etkisi ve deney hayvanlarının cinsel birleşme davranışları üzerinde gerçekleştirilmiştir (Colman-Saizarbitoria ve ark., 2006; Hadidi ve ark., 2003). Literatürde KK üzerine etkilerine ilişkin *Ferula* türleri ve ferutin ile yapılmış çalışma bulunmamaktadır. Cinsel fonksiyon üzerinde yapılan etkinlik çalışmaları özellikle Lübnan'da doğal olarak yetişen bir tür olan *F. hermonis* türü üzerinde yapılmıştır (El-Thaher ve ark., 2001; Hadidi ve ark., 2003). Ancak bilindiği gibi tıbbi bitkilerin fitokimyasal içerikleri ve dolayısıyla bunlardan hazırlanacak halk ilacı ya da ekstrelerin biyolojik etkinlikleri türden türe farklılık gösterebilmektedir. Araştırmalarda kullanılacak bitkilerin (aynı tür olsalar dahi) yetiştikleri coğrafi bölge, iklim şartları, toplanma zamanı ve kurutma-depolama yöntemleri de araştırma sonuçlarına etki eden faktörlerdendir (Rubiolo ve ark., 2006). Lübnan'da ya da dünyanın hatta Türkiye'nin başka bölgelerinde yetişmiş aynı cinse ait farklı türler üzerindeki çalışmalara ait veriler ancak araştırmaya rehberlik edebilir. Araştırmanın yapılmasındaki en önemli gerekçelerden birisi budur. Sardunya Adası'nda *Ferula communis* iki kemotip (aynı türün farklı kimyasal içerik göstermesi durumu) olarak yetişmektedir. Bunlardan biri toksik değilken, diğeri ferulozis denen toksik bir tablo sergilemektedir (Rubiolo ve ark., 2006). Yapılan çalışmalarda toksik kemotipin toksik olmayana göre genetik farklılıklar gösterdiği ortaya konmuştur (Marchi ve ark., 2003). Toksik olan ile toksik olmayan kemotipleri ayırt edebilmek için YPSK, İTK ve UV mikroskopisi gibi yöntemlere ihtiyaç duyulmaktadır (Sacchetti ve ark., 2003). *F. elaeochytris*'in halk ilacı olarak kullanılmasının yanında bu tür bir toksik tabloya neden olduğuna dair literatürde henüz herhangi bir veriye rastlanmamıştır.

2. GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. Gereç

2.1.1. Bitkisel Materyal

Bu tez çalışmasında kullanılmış olan bitkisel materyal, T.C. Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı, Tarımsal Araştırmalar ve Politakalar Genel Müdürlüğü tarafından verilmiş olan 05.11.2015 tarih ve 50955690-335.1-8254 sayılı araştırma izni (EK-1) kapsamında toplanmıştır.

F. elaeochytris, Hatay ilinin Yayladağ ilçesi Çandır köyü Keldağ mevkiinden toplanmış olup toprakaltı ve topraküstü kısımlar materyal olarak kullanılmıştır. *F. elaeochytris* bitkisinden hazırlanan herbaryum örneğinin teşhisi Gazi Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü öğretim üyesi Prof. Dr. Hayri DUMAN tarafından yapılarak Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Herbaryumu'na AEF-25881 numarasıyla kaydedilmiştir.

F. communis subsp. *communis* ise Çanakkale ili Biga-Karabiga karayolu mevkiinden toplanmış olup çalışmalarda toprakaltı ve topraküstü kısımlar materyal olarak kullanılmıştır. *F. communis* subsp. *communis* bitkisinden hazırlanan herbaryum örneğinin teşhisi Gazi Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü öğretim üyesi Prof. Dr. Hayri DUMAN tarafından yapılarak Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Herbaryumu'na AEF-26933 numarasıyla kaydedilmiştir.

2.1.3. Kullanılan Standart Maddeler

Fitokimyasal çalışmalarda Enzo® marka ferutinin (ALX-350-098-M010) ve Enzo® marka ferulenol (ALX-350-124-M001) kullanılmıştır.



Şekil 2.1. *F. elaeochytris* Korovin bitkisinin doğadaki görüntüsü (Keldağ, Çandır Köyü, Yayladağ/Hatay).



Şekil 2.2. *F. elaeochoytris* Korovin herbarium örneği (AEF 25881).



Şekil 2.3. *F. communis* subsp. *communis* L. bitkisinin doğadaki görüntüsü (Biga-Karabiga karayayolu, Çanakkale).



Şekil 2.4. *F. communis* subsp. *communis* L. meyvesi herbarium örneği-1 (AEF 26933)



Şekil 2.5. *F. communis* subsp. *communis* L. yaprak herbaryum örneği (AEF 26933)

2.2. Yöntem

2.2.1. Fitokimyasal Yöntemler

2.2.1.1. Açık Kolon Kromatografisi ve Biyolojik Aktivite Deneyleri İçin Ekstre Hazırlanması

Köklerin ekstraksiyonunda Hadidi ve ark. (2003) izledikleri yol modifiye edilerek kullanılmıştır. Buna göre bitkide bulunan gomrezinin fitokimyasal çalışmalar sırasında güçlük çıkarmaması adına bitki önce petrol eteri (PE) ile ekstre edilerek gomrezinin ortamdan uzaklaştırılması yoluna gidilmiştir. Bu doğrultuda kurutulmuş ve 640 g toz edilmiş *F. elaeochytris* kökleri öncelikli olarak 9 L petrol eteri ile 16 saat boyunca soxhlet cihazında ekstre edilmiştir. Bu sayede gomrezin uzaklaştırılmıştır. Takiben PE sonrası kökler kurutulup tekrar soxhlet cihazında 8 L etil alkol (EtOH) ile 25 saat boyunca ekstre edilmiştir (PE⇒EtOH). Elde edilen ekstraterler çözücülerini rotavapor yardımıyla uçurulduktan sonra liyofilize edilerek kurutulmuştur.

Ekstraksiyon işlemleri sonucunda 640 g kurutulmuş *F. elaeochytris* 49,15 g PE (%7,68) ve 56,05 g PE⇒EtOH (%8,76) ekstresi elde edilmiştir. PE⇒EtOH ekstresinin 20 g'ı açık kolon kromatografisi için kullanılmış, kalanı ise biyolojik aktivite deneyleri için ayrılmıştır.

Aynı şekilde 318,50 g kurutulmuş ve toz edilmiş *F. communis* subsp. *communis* kökleri 2,5 L. PE ile 16 saat boyunca soxhlet cihazında ekstre edilmiştir. Takiben PE sonrası kökler kurutulup tekrar soxhlet cihazında 2,5 L etil alkol (EtOH) ile 25 saat boyunca ekstre edilmiştir (PE⇒EtOH). Ekstraksiyon işlemleri sonucunda 318,5 g kurutulmuş *F. communis* subsp. *communis* 13,61 g PE (%4,27) ve 44,09 g PE⇒EtOH (%13,84) ekstresi elde edilmiştir. Ancak bu ekstre izolasyon çalışmalarında kullanılmamıştır.

2.2.1.2. İnce Tabaka Kromatografisi (İTK)

Hazırlanan *F. elaeochytris* ve *F. communis* subsp. *communis* ekstrelerinin birbirleri ile karşılaştırılması ve ferutinin içerip içermediklerini saptamak için İTK yöntemi kullanılmıştır. İTK analizlerinde standart olarak ferutinin ve her iki bitkiden hazırlanan PE, PE⇒EtOH (soxhlet) ve ACN (ultrasonik) ekstreleri kullanılmıştır. Sabit faz olarak Merck marka TLC Silica gel 60 F₂₅₄ (Ürün Kodu: 1.05554.0001) hazır İTK plakları kullanılmıştır. Hareketli faz olarak hekzan ve EtOAc'ın farklı oranlardaki karışımları kullanılmıştır (Hekzan:EtOAc 80:20, 70:30, 65:35, 60:40 ya da 50:50) (Colman-Saizarbitoria ve ark., 2006). İTK plakları 254 ve 366 nm UV altında ve %10 H₂SO₄ ve vanilin-sülfürik asit belirteçleri kullanılarak incelenmiştir.

2.2.1.3. YPSK Analizleri İçin Bitkisel Materyalin Ekstraksiyonu

YPSK analizleri için bitkisel materyalin ekstraksiyonu Rubiolo ve ark. (2006) tarafından açıklanmış şekilde gerçekleştirilmiştir. Kurutulmuş ve toz edilmiş *F. elaeochytris* ve *F. communis* subsp. *communis* kök ve toprak üstü kısımları 0,5 g tartılarak 100 mL'lik bir erlene alınmış, 8'er mL asetronitril (ACN) ile 3 kez 10'ar dakika ultrasonik banyoda ekstre edilmiştir. Ekstre her defasında süzülmüş, süzüntüler 25 mL'lik balon jöjeye aktarılmıştır. Ekstrenin oda sıcaklığına kadar soğuması beklendikten sonra balon jöjedeki sıvı hacmi ACN ile 25 mL'ye tamamlanmıştır. Bu işlem her iki bitkinin toprakaltı ve topraküstü kısımları için uygulanmıştır. Bu şekilde hazırlanan ekstreler 0,45 µ membran filtreden geçirilerek viyallere aktarılmış ve analiz için YPSK cihazına yerleştirilmiştir.

2.2.1.4. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (YPSK/HPLC) ve Yöntem Validasyonu

Hedeflenen kimyasal maddelerin bitki ekstrelerinde teşhisi ve miktar tayini için hazırlanan ekstreler YPSK ile analiz edilmiştir. YPSK tekniğinden ayrıca kolon

kromatografisinden elde edilen fraksiyonların kimyasal profillerinin belirlenmesinde, izole edilen bileşiklerin saflıklarının ve yapılarının tayininde faydalanılmıştır. YPSK analizinde cihaz ve yöntemle ilişkin bilgiler aşağıda verilmiştir:

Cihaz:	Agilent
Dedektör:	DAD-UV (Diode Array Detector-Ultraviolet)
Dalga boyu:	210 nm, 254 nm ve 330 nm
Enjeksiyon hacmi:	10µL
Kolon:	Agilent Eclipse XDB-C18, 5 µm, 4,6×150 mm
Çözücü sistemi (A):	Su (%0,1 o-fosforik asit)
Çözücü sistemi (B):	Asetonitril (%0,1 o-fosforik asit)
Akış Hızı:	1 mL/dak.
Akış tipi:	Gradient
Gradient akış:	Başlangıç: B: %75
	0-15. dak: B: %75
	15-25. dak. B: %100
Analiz süresi:	25 dak.
Bekleme süresi:	2 dak.

Miktar tayini için satın alınan ferutinin (Enzo® ALX-350-098-M010) hassas terazide 9,9300 mg tartılarak 10 mL balon jojeye konulmuştur. Balon jojeye ACN eklenerek ferutininin çözülmesi sağlanmış ardından hacim 10 mL'ye tamamlanarak 0,9930 mg/mL stok çözelti elde edilmiştir. Stok çözeltiden seyreltilerek elde edilen kalibrasyon çözeltileri aşağıdaki gibidir:

Stok çözelti:	0,9930 mg/mL
1. Dilüsyon:	0,4965 mg/mL
2. Dilüsyon:	0,0993 mg/mL
3. Dilüsyon:	0,04965 mg/mL
4. Dilüsyon:	0,02483 mg/mL
5. Dilüsyon:	0,00497 mg/mL
6. Dilüsyon:	0,0248 mg/mL

Ferulenol teşhisi için satın alınan ferulenol (Enzo® ALX-350-124-M001) standardından küçük bir miktar bir viyale konarak ACN ile çözülmüştür.

2.2.1.5. Açık Kolon Kromatografisi

Açık kolon kromatografisinde bitkisel materyalden PE sonrası EtOH çözücüsü ile elde edilen liyofilize edilmiş kuru ekstre ilk olarak apolardan polara kadar çözücüler ile fraksiyonlanmıştır. Yapılan kalitatif YPSK analizlerinde hem PE hem de PE⇒EtOH ekstralarında ferutinin tespit edilmiştir. Ancak fiziksel özellikleri daha uygun olması nedeniyle PE⇒EtOH ekstresi izolasyon çalışmaları için tercih edilmiştir. Fraksiyonlama her aşamada YPSK ve İTK analizleriyle kontrol edilerek hedeflenen bileşiklerin saf olarak elde edilmesine doğru sistem ve yöntem geliştirilmiştir.

Ana fraksiyonlama işleminde sabit faz olarak silika jel; hareketli faz olarak düşük polariteden yüksek polariteye doğru gradient akışlı hekzan:EtOAc sistemi kullanılmıştır (Colman-Saizarbitoria ve ark., 2006).

Kolon fiziksel olarak uygun şekilde sabitlenmiştir. Dip kısmı uygun kesilmiş süzgeç kağıdı ve üzerine pamuk ile kapatılarak sabit fazın akışı engellenmiştir. Boş kolondan hekzan geçirilerek pamuk ve süzgeç kağıdı ıslatılmış, musluğun sorunsuz çalışıp çalışmadığı denetlenmiş ve bu bölümlerdeki hava boşlukları giderilmiştir. 2 L'lik behere daha önce tartılan 300 g silika jel konup üzerine hekzan eklenmiştir. Silika jel hekzan karışımının bir cam baget yardımıyla sürekli karıştırılarak akışkanlığını kaybetmeden dikkatlice kolon içine uygun biçimde yerleşmesi sağlanmıştır. Tüm silika jel kolon içine aktarıldıktan sonra kolon çeperinde biriken silika taneleri de pastör pipeti yardımıyla hekzan ile yıkanarak sisteme dahil edilmiştir. Sistemin düzgün çalışıp çalışmadığının denetlenmesi ve oturması amacıyla 8 saat boyunca kolon sadece hekzan ile yıkanmıştır. Kolona uygulanacak olan ekstre slurry yöntemi ile hazırlanmıştır: 20 g liyofilize *F. elaeochytris* PE⇒EtOH ekstresi eşit miktarda silika jel 60 (Merck 1.07734.2500; 70-230 mesh)

ile uygun bir kapsül içinde homojen olana dek dikkatlice karıştırılmıştır. Ekstre kolona dikkatlice, düz bir yüzey oluşturacak şekilde yüklenmiştir. Ekstrenin üstü 1 cm civarında silika jel eklenerek kapatılmıştır. Elüsyon %100 hekzan ile başlatılmıştır. Sistemden yaklaşık 2 L hekzan geçirildikten sonra İTK ve YPSK analizinde herhangi maddeyle karşılaşılması nedeniyle hekzan:EtOAc (90:10) karışımı ile elüsyona devam edilmiştir. Sisteme hekzan:EtOAc (90:10) eklendiği sırada kolon çıkışındaki 100 mL erleninde toplanmakta olan fraksiyon 1. Fraksiyon (**Fr.1**) olarak kabul edilmiştir. Takip eden fraksiyonlar İTK ve YPSK ile kalitatif olarak analiz edilmiştir.

Çizelge 2.1. Açık kolon kromatografisi uygulamasında gradient elüsyon

Fraksiyon No.	Hekzan:EtOAc	EtOAc:MeOH	MeOH:H ₂ O
0	100:0	-	-
1	90:10	-	-
179	85:15	-	-
188	80:20	-	-
206	70:30	-	-
233	60:40	-	-
241	40:60	-	-
250	20:80	-	-
260	0:100	-	-
270	-	80:20	-
280	-	40:60	-
290	-	10:90	-
300	-	0:100	-
325-345	-	-	70:30

2.2.1.6. Orta Basıncılı Sıvı Kromatografisi (OBSK/MPLC)

Açık kolon kromatografisini takiben elde edilen ana fraksiyonlardan öncelikle yüksek miktarda ferutinin içeren seçilerek OBSK sisteminde saflaştırma ve izolasyon çalışmaları devam etmiştir. OBSK sistemine ilişkin özellikler aşağıda verilmiştir.

Pompa	: Master Flex L/S 7524-45 Digital Economy Drive
Kolon	: Spectra/Chrom™ LC Column (30 × 2,5 cm)
Sabit Faz	: LiChroprep RP-18 (25-40 µm, Merck)
Hareketli Faz	: MeOH:Su
Akış Hızı	: 1,5 mL/dak.

Akış tipi : Gradient
Gradient akış : 70:30 100 mL
75:25 100 mL
80:20 100 mL
85:15 100 mL
90:10 100 mL
95:5 100 mL
MeOH ile yıkama
Fraksiyon Hacmi : 5 mL

2.2.2. İzolasyon ve Yapı Tayin Çalışmaları

2.2.2.1. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi – Kütle Spektrometrisi (SK-KS/LC-MS)

SK-KS analizleri için izole edilen bileşikler Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Merkez Laboratuvarı'nda bulunan Waters Alliance-Waters Micromass ZQ marka SK-KS cihazına elektron sprey iyon pozitif ve negatif (ESI (+), ESI (-)) modda verilmiştir.

Kolon: XTerra® MS C-18 (4.6 ×250 mm,5 µm)
Hareketli Faz A: Metanol:Su (50:50)
Hareketli Faz B: Asetonitril
Akış Hızı: 0,5 mL/dak
Sıcaklık: 25°C
Enjeksiyon Hacmi: 10 µL

2.2.2.2. Nükleer Manyetik Rezonans Spektroskopisi (NMR)

İzolasyon çalışmalarının sonucu olarak saf olarak elde edilen maddeler dötoro kloroformda (CDCl₃) çözülmüş, yapı tayini için ¹H-NMR ve ¹³C-NMR teknikleri kullanılarak NMR spektrumları alınmıştır. Ayrıca 2 boyutlu NMR yöntemlerinden HMBC (Heteronuclear Multiple Bond Correlation/Heteronükleer Çoklu Bağ Korelasyonu) ve HSQC (Heteronuclear Single Quantum Correlation/Heteronükleer Tekli Kuantum Korelasyonu) yöntemlerinden de faydalanılmıştır. Analiz Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Merkez Laboratuvarında bulunan Varian Mercury 400, 400 MHz High Performance Digi marka NMR spektrometresi ile gerçekleştirilmiştir.

2.2.3. Biyolojik Aktivite Çalışmaları

In vivo ve *in vitro* deneylerde sadece *F. elaeochytris* PE ve PE⇒EtOH (soxhlet) ekstreleri ve PE⇒EtOH ekstresinden izole edilen ferutinin ve M2 kullanılmıştır. Bunun nedeni *F. communis* subsp. *communis* bitki kısımlarında ferulenol tespit edilmiş olmasıdır. Daha önce de belirtildiği gibi ferulenol varlığı, ferulozis denen iç kanamalara neden olan toksik bir tabloya yol açabilmektedir (Rubiolo ve ark., 2006). Ayrıca *F. communis* subsp. *communis* bitki kısımlarında ferutinin tespit edilememiştir. En az sayıda deney hayvanı kullanılarak en iyi sonuca varmak amacıyla *F. communis* subsp. *communis* ekstreleri bu deneylerde kullanılmamıştır.

2.2.3.1. Kullanılan Araç ve Gereçler

- MAY recorder equipment computer system (Commat Ltd. Ankara, TÜRKİYE).
- MP35 Biopac Student Lab Pro, Veri Kayıt ve Analiz Sistemi.

- %95 oksijen, %5 karbondioksit gaz karışım tüpü.
- Kaba terazi (Scaltec, SBA 61 Heiligenstadt, ALMANYA).
- Hassas terazi (Scaltec, SBA 31 Heiligenstadt, ALMANYA).
- Çeşitli hacim aralıklarında otomatik pipetler (Eppendorf, Hamburg, ALMANYA).
- Pipet uçları (Standart ve RNase free özellikte).
- Cerrahi makas ve pensler.
- Çeşitli hacim ve boyutlarda enjektörler.
- Cerrahi flaster.
- Sıçan yemi (Optima Yem, Lüleburgaz, TÜRKİYE).
- Şeker ölçüm cihazı ve çubukları (Accu-Check Performa Nano Roche®)

2.2.3.2. Kullanılan Kimyasallar

- Ketamin (Ketasol, Richterpharma ag)
- Ksilazin (Basilazin, baVet)
- Krebs çözeltisi (NaCl, 113 mmol/L; KCl, 4,7 mmol/L; NaH₂PO₄, 1,4 mmol/L; NaHCO₃, 16,3 mmol/L; MgSO₄, 0,6 mmol/L; CaCl₂, 2,5 mmol/L ve glukoz, 7,7 mmol/L)
- KCl (Potasyum klorür) (Merck, ALAMANYA)
- Absolü etanol (Riedel, 32221, Sigma-Aldrich, St. Louis, MISSOURİ, A.B.D.)
- Asetilkolin (Sigma, A7000-5G, St. Louis, MISSOURİ, A.B.D)
- Fenilefrin (Sigma, P6126-5G, St. Louis, MISSOURİ, A.B.D.)
- Heparin (Nevaparin 25000 IU, Mustafa Nevzat, TÜRKİYE)
- İzotonik sodyum klorür solüsyonu 1000 mL (İ.E. Ulugay, TÜRKİYE)
- Streptozosin (STZ) (Sigma, S0130-1G, St. Louis, MISSOURİ, A.B.D.)

2.2.3.3. Deney Hayvanları

Bu tez çalışmasında yapılan hayvan deneyleri Ankara Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu tarafından alınan 08/06/2016 tarihli ve 2016-13-136 numaralı karar kapsamında gerçekleştirilmiştir (Ek-2). Deney hayvanı olarak Bilkent Üniversitesi Fen Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü Deney Hayvanları Ünitesi'nden temin edilen dört haftalık (200-300 g) Sprague-Dawley tipi 30 adet erkek sıçan kullanılmıştır. Deney hayvanları Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Deney Hayvanları Ünitesi'nde barındırılmıştır. Barınak ortam sıcaklığı $22\pm1^{\circ}\text{C}$ olacak şekilde, ışıklandırılması ise 7.00-19.00 saatleri arası aydınlık, 19.00-7.00 saatleri arası karanlık olacak şekilde kontrol altında tutulmuştur.

Deney hayvanları kontrol (n=15) ve diyabet [40 mg/kg, intraperitoneal (i.p.) streptozotosin (STZ)] (n=15) grubu olarak iki gruba ayrılmıştır.

Hayvanlarda diyabet oluşturabilmek amacıyla 40 mg/kg dozda STZ intraperitoneal yola verilmiş ve takip eden dördüncü günde kuyruk veninden kan alınarak kan şekeri ölçümleri alınmıştır. Tüm hayvanların kan şekeri düzeyi 250 mg/dL'nin üzerinde ölçüldüğü için çalışmada tüm hayvanlar kullanılmıştır. STZ verilen hayvanlarda sekiz haftanın sonunda diyabet oluşumu tamamlanmış ve deneylere başlanmıştır.

Hayvanların beden ağırlıkları her hafta ölçülmüş, ani hipoglisemi riskine karşı STZ uygulamasını takiben bir gün boyu %5 glukoz içeren içme suyu ile takviye edilmişlerdir.

2.2.3.4. *İn vivo* Deneyler

Hayvanlar ketamin (100 mg/kg) ve ksilazin (10 mg/kg) ile anestezi edilmiş ve erektil fonksiyonu ölçmek için sıçanların i.k. basınçları (intracavernosal pressure, ICP) monitörize edilmiştir. Arteriyel kan basıncını (mean arterial pressure, MAP)

ölçmek için karotis arteri hafifçe kesilerek PE-240 tüp yardımıyla kanüle edilmiştir. 250 U/ml heparin içeren polietilen tüpe (PE-50) bağlı 25G kanül, penisin sağ krurasına yerleştirilmiş ve bir basınç dönüştürücüsü ile sürekli ICP ölçülmüştür. Bitkisel ekstreler ve bu ekstrelerden izole edilen maddeler sırasıyla i.k. olarak verilmiştir. Bazal ICP ve izole maddeler ve ekstreler varlığındaki ICP değerleri ölçülmüştür. Sonrasında, sağ major pelvik gangliyon ve kavernoza sinir tanımlandıktan sonra prostatın arkasından aşağı ilerleyerek paslanmaz çelik iki uçlu kanca elektrod yerleştirilmiştir. Kavernoza sinir, 2,5 V, 5 V ve 7,5 V düzeylerinde (1.5 Hz, 30 milisaniye sinyal genişliği olacak şekilde) uyarılmıştır (Grass Instruments). i.k. olarak bitki ekstreleri (5 mg/kg) ile izole edilen maddeler (10^{-2} mmol/kg) enjekte edilerek çalışmalar yapılmıştır. Toplam ICP, eğri altındaki alanın (area under curve, AUC mmHg/s) hesaplanmasıyla elde edilmiştir. Yine bitkisel ekstreler ve bu ekstrelerden izole edilen maddeler varlığında ICP tekrar ölçülmüştür. ICP/MAP örnekten alınan en yüksek ICP değerinin o esnadaki arteriyel kan basıncına bölünmesiyle hesaplanır. Tüm ekstre ve izole maddelerde ICP/MAP ölçümleri de yapılmıştır. Çalışma sonunda sıçanlar, karbon dioksit solutarak öldürülmüştür. Hayvanların izole KK'ları *in vitro* deneyler için organ banyosuna yerleştirilmiştir.

2.2.3.5. *İn vitro* Deneyler

İzometrik basıncı ölçmek için, her gruptaki sıçanlarda *in vitro* organ banyosu deneyleri yapılmıştır. Anestezi sonrası penis çıkarılacak ve Krebs-bikarbonat solüsyonu içeren cam petriye koyularak %95 O₂ - %5 CO₂ ile sürekli havalandırılmıştır. Kavernoza doku stripleri (1×1×6 mm), 1 g denge gerilimi altında, bir ucu elektrod tutucusuna diğer ucu da transdusera bağlanmış biçimde 20 ml'lik organ banyosuna konulmuştur. Dokular, 37°C'de, 60 dakika dengelenmeye bırakılmıştır. Mekanik aktiviteler "MAY recorder equipment computer system" kullanılarak kaydedilmiştir.

Dokular Phe ile kastırıldıktan sonra bitki ekstreleri ve izole edilen maddelere ilişkin gevşeme yanıtları alınmıştır. 20 mL'lik organ banyosuna ekstreler 0,1 mg (0,005 mg/mL), 1 mg (0,05 mg/mL) ve 5 mg (0,25 mg/mL) dozda uygulanırken izole bileşikler 10^{-5} M, 10^{-4} M ve 5×10^{-4} M konsantrasyonda uygulanmıştır.

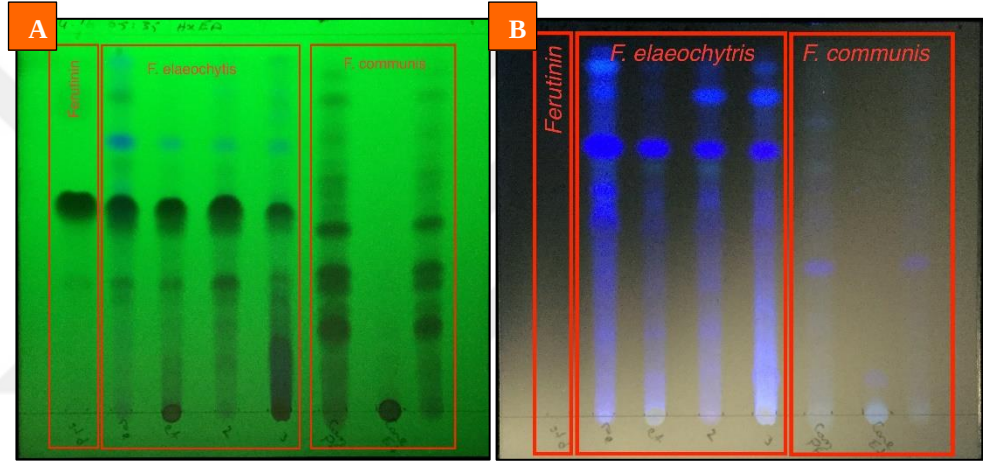
2.2.3.6. Elde Edilen Verilerin İstatistiksel Analizi

Hayvan deneyleri kontrol ve diyabetik isimleri verilen iki grup hayvanla yapılmıştır. Gruplardan elde edilen verilerin dağılımları birbirleri arasında karşılaştırılmıştır. Ayrıca *in vivo* deneylerde dışarıdan uygulanan elektrik akımından alınan cevapların dağılımı hem gruplar arası hem de grup içi değişen voltajlarda karşılaştırılmıştır. Veri dağılımının karşılaştırılmasında ANOVA (Benferroni post hoc) testi kullanılmış, $p < 0,05$ değeri veren farklar istatistiksel açıdan anlamlı olarak kabul edilmiştir. İstatistiksel analizler “GraphPad InStat” ve grafikler “Microsoft Office Excel” programları kullanılarak yapılmıştır.

3. BULGULAR

3.1. İTK Uygulamalarına Ait Bulgular

Şekil 3.1.'de bulunan İTK plağında uygulanan örneklerden ilki ferutinin, takip eden 4 uygulama *F. elaeochoytris*, son 3 uygulama ise *F. communis* subsp. *communis* ekstrelerine aittir. İTK uygulamalarında iki tür arasında farklı profillerle karşılaşmış ve *F. communis* subsp. *communis* ekstrelerinde ferutinin tespit edilememiştir.



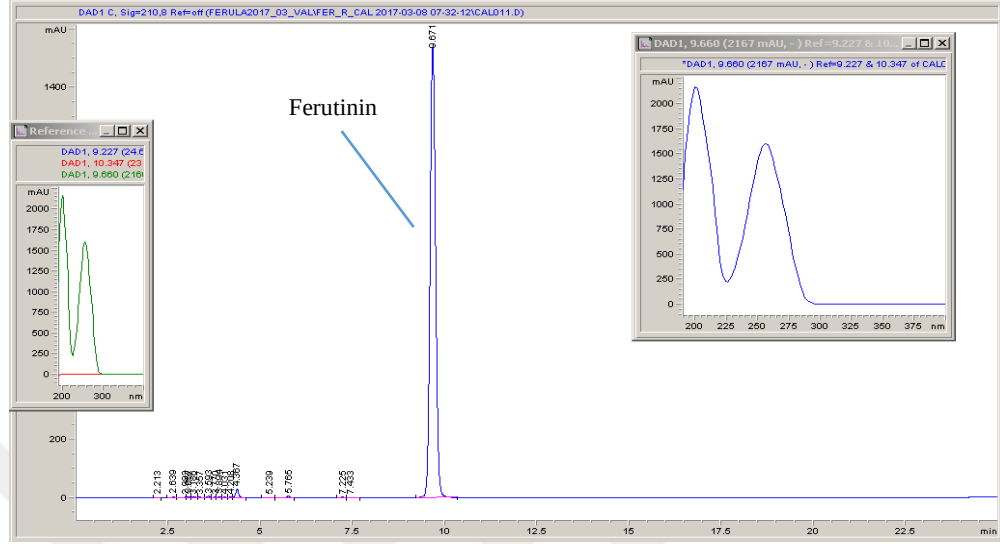
Şekil 3.1. Ferutinin, *F. elaeochoytris* ve *F. communis* subsp. *communis* kök ekstrelerine ait İTK uygulamaları. Hekzan:EtOAc (7:3), 254 (A) ve 366 (B) nm'de. Uygulamalar sırasıyla; ferutinin, *F. elaeochoytris* PE, PE⇒EtOH, PE⇒EtOH (soxhlet) ve ACN (ultrasonik) ve *F. communis* subsp. *communis* PE, PE⇒EtOH (soxhlet), ACN (ultrasonik)

3.2. YPSK Analizleri ve Yöntem Validasyonuna Ait Bulgular

3.2.1. Kalibrasyon Grafiği ve Denkleminin Oluşturulması

F. elaeochoytris ve *F. communis* subsp. *communis* kök ve herba örneklerinden ultrasonik banyoda hazırlanan ACN ekstreleri ve biyolojik aktivite çalışmaları için köklerden hazırlanan soxhlet cihazında elde edilen PE ve PE⇒EtOH ekstrelerinin

ferutinin miktarının YPSK ile tayini için hazırlanan kalibrasyon çözeltileri 3'er enjeksiyonla sisteme uygulanmıştır (Şekil 3.2.).



Şekil 3.2. Ferutinine ait YPSK kromatogramı DAD-UV spektrumu.

Dilüsyonlardaki ferutinin piklerine ait eğri altı alanlar kaydedilmiştir (Çizelge 3.1.)

Çizelge 3.1. Ferutinin kalibrasyon çözeltileri ve elde edilen eğri altı alan verileri

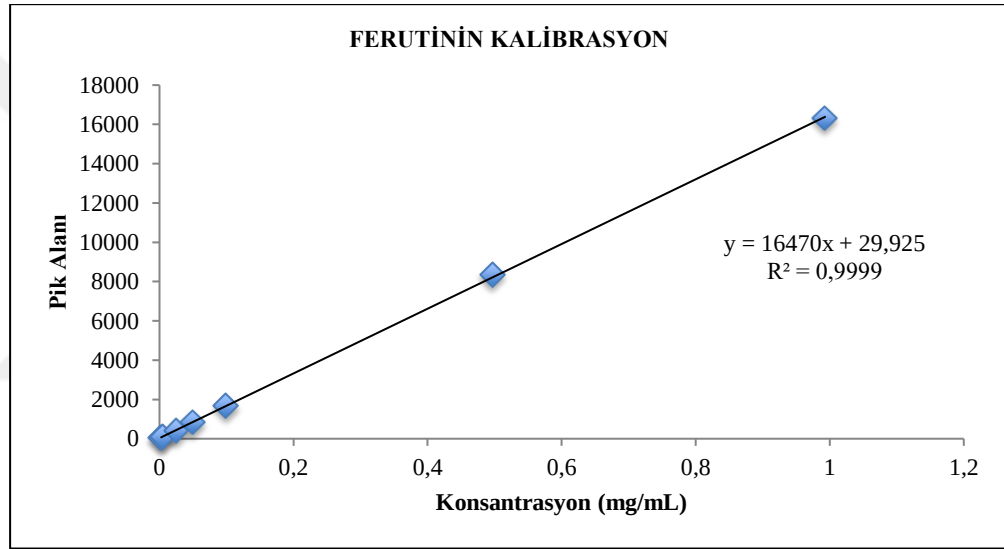
Konsantrasyon (mg/mL)	ALAN 1	ALAN 2	ALAN 3
0,0024825	48,80	48,50	47,90
0,004965	89,30	89,50	89,70
0,024825	418,30	418,00	419,70
0,04965	820,10	843,90	832,20
0,0993	1666,50	1671,60	1664,20
0,4965	8373,20	8347,80	8363,30
0,9930	16287,80	16327,50	16311,40

Elde edilen eğri altı alan verileri Microsoft Excel programı kullanılarak ilgili konsantrasyonlara karşı girilmiş ve kalibrasyon denklemi oluşturulmuştur (Çizelge 3.2.).

Çizelge 3.2. Ferutinin için kalibrasyon denklemi hesaplamaları

	Eğim	Kesişim	Regresyon Katsayısı (R ²)
1. Enjeksiyonlar	16458	29,673	0,99983
2. Enjeksiyonlar	16479	30,636	0,99989
3. Enjeksiyonlar	16473	29,465	0,99986
Ortalamalar	16470±10,81	29,925±0,6247	0,99986±0,0005

Oluşturulan kalibrasyon denklemi ile kalibrasyon grafiği de elde edilmiş ve regresyon katsayısı hesaplanmıştır (Şekil 3.3.).



Şekil 3.3. Ferutinine ait kalibrasyon grafiği ve kalibrasyon denklemi

3.2.2. Validasyon Parametreleri

YPSK yönteminin geçerliliğinin ortaya konması amacıyla aşağıdaki parametrelerinden faydalanılmıştır.

3.2.2.1. Sistem Uygunluk Testleri

Sistem uygunluk testleri validasyon işlemlerine başlamadan önce YPSK cihazı ve yöntemin kabul edilebilir kalitede veri elde edebilme yeteneğinin incelenmesi amacıyla yapılır (Shabir, 2003). Bu amaçla kapasite faktörü (k'), enjeksiyon kesinliği [%Bağıl standart sapma (BSS)], ayırıcılık (Resolution, R_s), asimetri faktörü (T) ve teorik plaka sayısı (N) hesaplanmıştır.

Kapasite faktörü kromatogramdaki her maddenin kendine özgüdür. Kromatogramdaki ilk pike ait (t_0) alıkonma zamanı ve analizi yapılan maddenin alıkonma zamanı (t_R) kullanılarak hesaplanabilir.

$$k' = \frac{t_R - t_0}{t_0}$$

Şekil 3.4. Kapasite faktörünün hesaplanmasında kullanılan denklem

Enjeksiyon kesinliği aynı örneğin en az 5 ($n \geq 5$) enjeksiyon sonrası alınan sonuçların tekrar edilebilirliğini gösterir. Elde edilen verilerin %BSS değeri hesaplanarak değerlendirilir.

Ayırıcılık iki pikin birbirlerinden ayrımını gösteren parametredir. İki pik arası zaman farkının pik genişliklerinin (w) ortalamasına bölümüyle hesaplanır.

$$R_s = \frac{t_2 - t_1}{(w_2 + w_1) / 2}$$

Şekil 3.5. Ayırıcılık hesaplanmasında kullanılan denklem

Asimetri faktörü bir pikin asimetrisini, yani şeklen ne kadar düzgün olduğunu belirtir. Asimetri faktörünü YPSK cihazında yüklü bulunan yazılım tarafından otomatik hesaplanmaktadır.

Teorik plaka sayısı kolon etkinliğini gösterir.

$$N = 16x \frac{t_R}{w^2}$$

Şekil 3.6. Teorik plaka hesaplanmasında kullanılan denklem

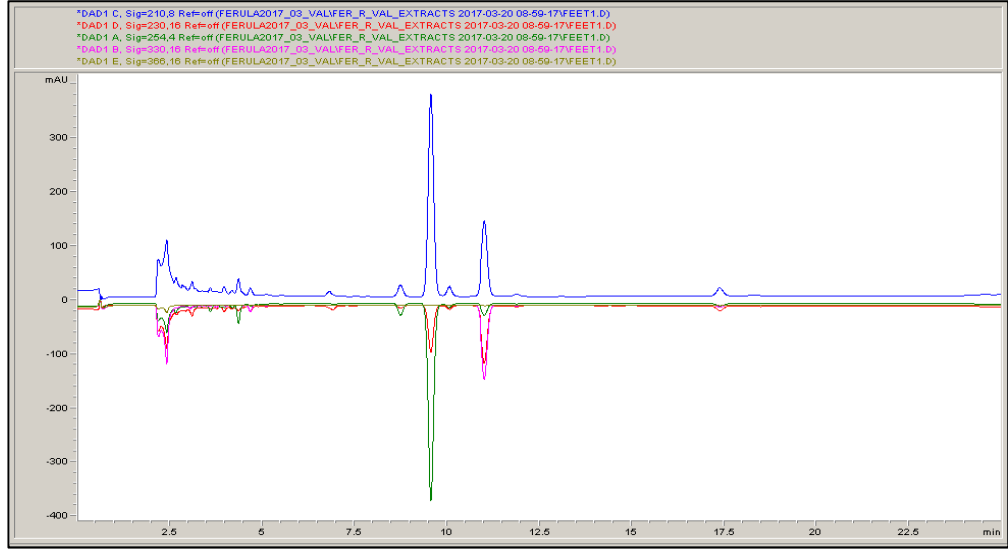
Yukarıda bahsi geçen sistem uygunluk testleri yapılmış ve sonuçlar önerilen değerlerle karşılaştırılarak değerlendirilmiştir (Çizelge 3.3.).

Çizelge 3.3. YPSK analizinde sistem uygunluk test sonuçları

Test edilen parametre	Sonuçlar	Önerilen değer (Shabir, 2003)
Kapasite faktörü (k')	3,3759±0,0182	> 2
Enjeksiyon kesinliği	%1,2887, n=6	BSS ≤ %1, n > 5
Ayırıcılık (R_s)	3,0884±0,0095	> 1.5
Asimetri faktörü (T)	0,9570±0,0011	≤1.5
Teorik plaka sayısı (N)	59564,1939±752,1300	> 2000

3.2.2.2. Özgüllük

Yöntemin ortamda analizi yapılacak bileşik dışında bulunabilecek maddeler varlığında da tayin yeteneğini ifade eder (ICH, 1994). Kullanılan YPSK yönteminde farklı dalga boylarında çalışılarak yöntemin özgüllüğü ortaya konmuştur (Şekil 3.7.).



Şekil 3.7. *F. elaeochoytis* kök PE⇒EtOH ekstresine ait 210 nm’de ve ölçülen diğer dalga boylarına karşı ayna kromatogram

3.2.2.3. Doğrusallık

Doğrusallık yöntemin verilen konsantrasyon aralığında konsantrasyonla orantılı test sonuçları elde yeteneğini ifade eder (ICH, 1994). Kalibrasyon grafiğinde dilüsyonlara ait noktaların kalibrasyon doğrusuna yakınlığı ve regresyon katsayısının (R^2) 1’e yakınlığı ile doğrusallık değerlendirilmiştir (Şekil 3.2.).

3.2.2.4. Çalışma Aralığı

Kalibrasyon eğrisinde tayin edilebilen en düşük konsantrasyon ile en yüksek konsantrasyon aralığını ifade eder (ICH, 1994). Analizleri yapılan örneklerden alınan sonuçlara göre kalibrasyon çözeltilerinin alt ve üst sınır derişimleri hazırlanmış ve analizlerin aralık içinde yapılabilmesi sağlanmıştır.

3.2.2.5. Teşhis Sınırı (LOD) ve Tayin Sınırı (LOQ)

Teşhis ve tayin sınırları ölçümü yapılan bileşiğin teşhisi ve miktar tayini yapılabilecek en düşük miktarlarını ifade eder (ICH, 1994). LOD ve LOQ hesaplanmasında aşağıda verilen denklem kullanılmıştır (ICH, 1994).

$$LOD = 3,3 \frac{Eğim Standart Sapma}{Ortalama Kesişim}$$

Şekil 3.8. Teşhis sınırının hesaplanmasında kullanılan denklem

$$LOQ = 10 \frac{Eğim Standart Sapma}{Ortalama Kesişim}$$

Şekil 3.9. Tayin sınırının hesaplanmasında kullanılan denklem

Çizelge 3.4. Ferutinine ait YPSK yöntemi LOD ve LOQ değerleri

	µg/mL
LOD	0,12517
LOQ	0,37932

3.2.2.6. Doğruluk

Doğruluk analitik bir prosedürde bilinen değerle ölçülen değerlerin yakınlığını ifade eder (ICH, 1994). Öncelikle *F. elaeochytris* PE⇒EtOH ekstresinden hazırlanan 1,75 mg/mL'lik çözelti 3'er kez enjekte edilmiştir. Kalibrasyon denkleminde ekstredeki ortalama ferutinin miktarı hesaplandıktan sonra (0,2151 mg/mL) dört farklı konsantrasyonda (0,04 mg/mL, 0,08 mg/mL, 0,12 mg/mL, 0,16 mg/mL) ferutinin standardı eklenerek geri kazanım değerleri hesaplanmıştır (Çizelge 3.5.)

Çizelge 3.5. Ferutinin için doğruluk ve geri kazanım bulguları

Ekstre Kons.		Standart Eklenmiş Konsantrasyonlar						
0,2151 mg/mL		0,2551 mg/mL		0,2951 mg/mL		0,3351 mg/mL		0,3751 mg/mL
Enjeksiyon No.	Ölçülen Kons. (mg/mL)	%Geri Kazanım	Ölçülen Kons. (mg/mL)	%Geri Kazanım	Ölçülen Kons. (mg/mL)	%Geri Kazanım	Ölçülen Kons. (mg/mL)	%Geri Kazanım
1	0,2456	96,2746	0,2882	97,6684	0,3303	98,5646	0,3724	99,2680
2	0,2491	97,6289	0,2885	97,7610	0,3306	98,6443	0,3717	99,1045
3	0,2464	96,6074	0,2887	97,8268	0,3319	99,0484	0,3710	98,9151
Ortalama	0,2470	96,8370	0,2885	97,7521	0,3309	98,7524	0,3717	99,0959
S. Sapma	0,0018	0,7057	0,0002	0,0796	0,0009	0,2594	0,0007	0,1766
%BSS	0,7288	0,7288	0,0814	0,0814	0,2627	0,2627	0,1782	0,1782

3.2.2.7. Kesinlik

Ölçüm sonuçlarının tekrar edilebilirliğini ifade eder (ICH, 1994). Önce tekrarlanabilirlik (gün içi) ölçümleri yapılmıştır (Çizelge3.6.).

Çizelge 3.6. Ferutinin için gün içi kesinlik bulguları.

Hazırlanan Konsantrasyonlar (mg/mL)						
0,07944			0,2979		0,5958	
Enjeksiyon No.	Ölçülen Kons. (mg/mL)	%Geri Kazanım	Ölçülen Kons. (mg/mL)	%Geri Kazanım	Ölçülen Kons. (mg/mL)	%Geri Kazanım
1	0,0826	103,9590	0,3047	102,2697	0,6033	101,2652
2	0,0823	103,6609	0,3050	102,3879	0,6034	101,2743
3	0,0820	103,2253	0,3044	102,1780	0,6035	101,2886
4	0,0818	102,9425	0,3048	102,3227	0,6034	101,2835
5	0,0820	103,2558	0,3047	102,2799	0,6033	101,2652
Ortalama	0,0821	103,4087	0,3047	102,2877	0,6034	101,2754
S. Sapma	0,0003	0,4003	0,0002	0,0770	0,0001	0,0106
%BSS	0,3871	0,3871	0,0752	0,0752	0,0105	0,0105

Takiben orta kesinlik (günler arası) ölçümleri yapılarak yöntemin kesinliği incelenmiştir (Çizelge 3.7.).

Çizelge 3.7. Ferutinin için günler arası kesinlik bulguları.

Hazırlanan Konsantrasyonlar (mg/mL)							
0,07944			0,2979		0,5958		
Enjeksiyon No.	Ölçülen Kons. (mg/mL)	%Geri Kazanım	Ölçülen Kons. (mg/mL)	%Geri Kazanım	Ölçülen Kons. (mg/mL)	%Geri Kazanım	
1. Gün	1	0,0826	103,9590	0,3047	102,2697	0,6033	101,2652
	2	0,0823	103,6609	0,3050	102,3879	0,6034	101,2743
	3	0,0820	103,2253	0,3044	102,1780	0,6035	101,2886
	4	0,0818	102,9425	0,3048	102,3227	0,6034	101,2835
	5	0,0820	103,2558	0,3047	102,2799	0,6033	101,2652
2. Gün	1	0,0839	105,6481	0,3147	105,6286	0,6284	105,4719
	2	0,0836	105,2201	0,3162	106,1300	0,6291	105,5952
	3	0,0838	105,4265	0,3165	106,2421	0,6289	105,5534
	4	0,0831	104,5475	0,3111	104,4200	0,6289	105,5534
	5	0,0827	104,0660	0,3113	104,4852	0,6283	105,4617
3. Gün	1	0,0851	107,1538	0,3147	105,6286	0,6290	105,5667
	2	0,0854	107,5512	0,3162	106,1300	0,6245	104,8187
	3	0,0853	107,3449	0,3165	106,2421	0,6254	104,9675
	4	0,0852	107,2608	0,3167	106,2992	0,6242	104,7596
	5	0,0854	107,5589	0,3167	106,3012	0,6255	104,9929
Ortalama	0,0836	105,2547	0,3116	104,5963	0,6193	103,9412	
S. Sapma	0,0014	1,7395	0,0053	1,7884	0,0117	1,9706	
%BSS	1,6526	1,6526	1,7098	1,7098	1,8959	1,8959	

3.2.3. *F. elaeochytris* ve *F. communis* subsp. *communis* bitkilerinin farklı kısımlarında YPSK ile ferutinin miktar tayini

F. elaeochytris ve *F. communis* subsp. *communis* bitkilerinin farklı bitki kısımlarında YPSK yöntemi ile hesaplanan ferutinin miktarları Çizelge 3.8.'de gösterilmiştir.

Çizelge 3.8. Farklı bitki kısımlarının ACN ekstralarında YPSK ile ölçülen ferutinin miktarları

Örnek	Ölçülen konsantrasyon (mg/mL)	g/100 g Drog
<i>F. elaeochoytris</i>		
Kök	0,9577±0,0020	4,7887±0,0098
Herba	0,0576± 0,0001	0,2878±0,0003
<i>F. communis</i> subsp. <i>communis</i>		
Kök	0,0036±0,0003	0,0178±0,0013
Herba	-	-

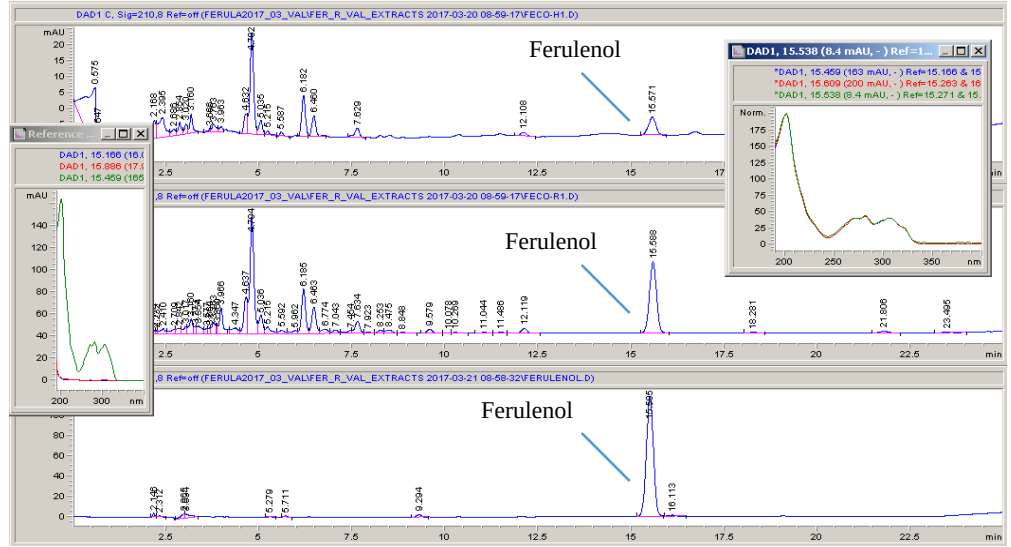
F. elaeochoytris ve *F. communis* subsp. *communis* köklerinden farklı çözücülere ve soxhlet cihazı kullanılarak hazırlanan ekstralarda YPSK yöntemi ile hesaplanan ferutinin miktarları Çizelge 3.9.'da gösterilmiştir.

Çizelge 3.9. *F. elaeochoytris* ve *F. communis* subsp. *communis* köklerinden soxhlet cihazıyla hazırlanan ekstralarda YPSK ile ölçülen ferutinin miktarları

Örnek	Ölçülen konsantrasyon (mg/mL)	Ekstre (mg/100 mg)	Drog g/100 g
<i>F. elaeochytris</i>			
PE Ekstresi	0,4905±0,0004	29,9088±0,0269	3,4236
PE⇒EtOH Ekstresi	0,2264±0,0003	12,8652±0,0194	
<i>F. communis</i> subsp. <i>communis</i>			
PE Ekstresi	-	-	
PE⇒EtOH Ekstresi	-	-	

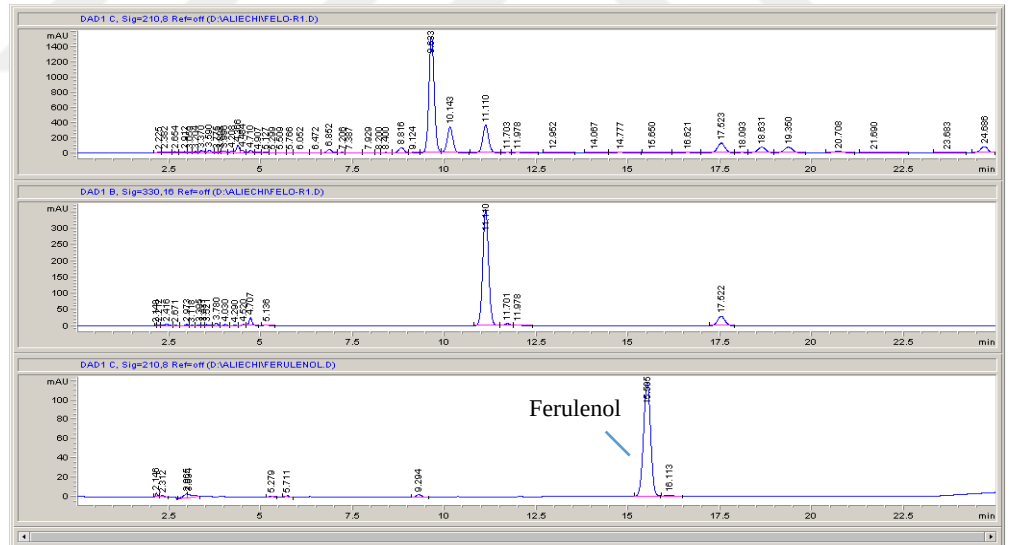
3.2.4. *F. elaeochoytris* ve *F. communis* subsp. *communis* bitkilerinin farklı kısım ve ekstralarında YPSK ile ferulenol tespiti

F. communis subsp. *communis* örneklerinde yapılan YPSK analizlerinde ferulenol tespit edilmiştir (Şekil 3.10.).



Şekil 3.10. *F. communis* subsp. *communis* kök (üst), herba (orta) ve ferulenol YPSK kromatogramları ve DAD-UV spektrum çakışmaları.

Yapılan YPSK analizlerinde hiçbir *F. elaeochytris* örneğinde ferulenol tespit edilmemiştir (Şekil 3.11.).



Şekil 3.11. *F. elaeochytris* kök (üst), herba (orta) ve ferulenol YPSK kromatogramları

3.3. Açık Kolon Kromatografisine Ait Bulgular

Açık kolon kromatografisinden elde edilen fraksiyonlar İTK ve YPSK kromatogramlarına göre birleştirilip sınıflandırılmıştır (Çizelge 3.10.). Açık kolon kromatografisi ile toplanan fraksiyonlar birleştirildikten sonra yapılan analizlerde yüksek oranda ferutinin içeren fraksiyon grupları YPSK ve İTK analizleriyle tespit edilmiştir. Fraksiyonlarda yapılan YPSK analizlerinde ferutinin ile beraber daha sonra “M2” kodu verdiğimiz, alıkonma zamanı yaklaşık 12,5’inci dakikada pik veren bileşiğin de izolasyonu için çalışmalar yapılmıştır.

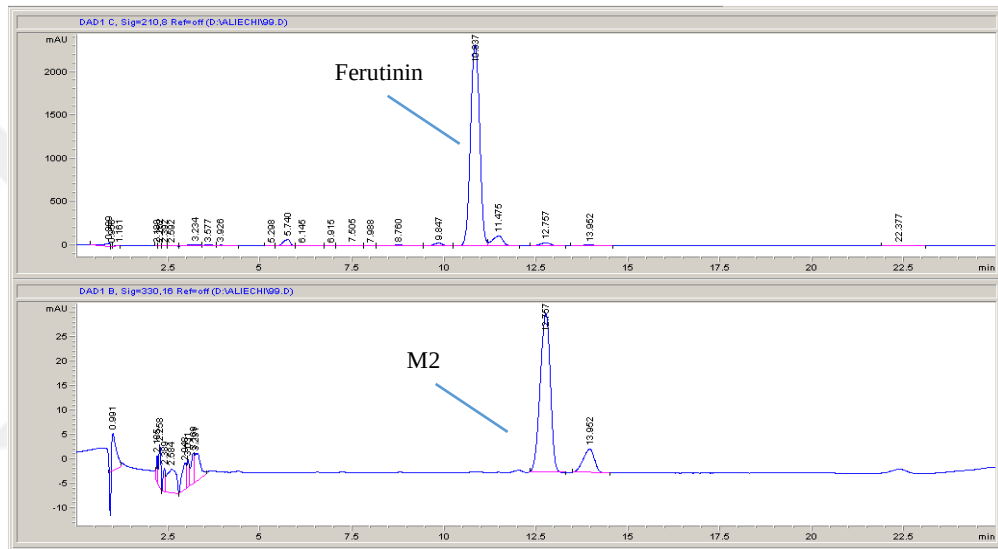
Çizelge 3.10. *F. elaeochoytris* PE⇒EtOH ekstresinden açık kolon kromatografisi ile elde edilen fraksiyonlar. * Ferutinince zengin fraksiyonlar, ** M2’ce zengin fraksiyonlar

Grup	Fraksiyon no	miktar (g)
1	1-8	0,0179
2	9-12	0,0043
3	13-17	0,1134
4	18-26	0,0412
5	27-34	0,0163
6	35-42	0,0399
7	43-46	0,0250
8	47-60	0,0838
9	61-66	0,0271
10	67-69	0,0310
11	70-76	0,1718
12	77-85	0,1157
13	86-90	0,0628
14	91-97	0,1225
15*	98-103	0,4102
16*	104-122	1,7035
17	123-131	0,5305
18	132-147	0,8745
19**	148-157	0,4777
20**	158-169	0,4254
21**	170-187	0,3931
22**	188-191	0,1006
23	192-200	0,1832
24	201-207	0,1074
25	208-210	0,0896
26	211-213	0,1161
27	214-228	0,5343
28	229-235	0,1277
29	236-240	0,1233
30	241-254	0,6643
31	255-265	0,3316
32	266-275	1,4377
33	276-285	5,9477
34	286-295	1,8140

Çizelge 3.10. (Devam)

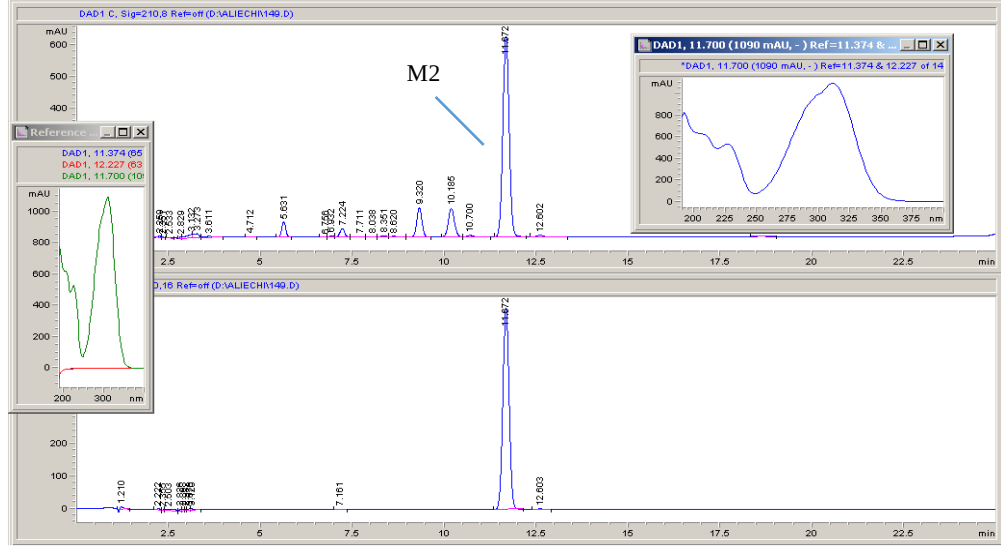
Grup	Fraksiyon no	miktar (g)
35	296-305	0,7774
36	306-320	0,2260
37	321-332	0,7128
38	333-345	0,3625
Toplam		19,3437

Grup 15 ve 16 ferutinin açısından en yoğun fraksiyonların birleştirilmesiyle oluşturulmuştur (Şekil 3.12.).



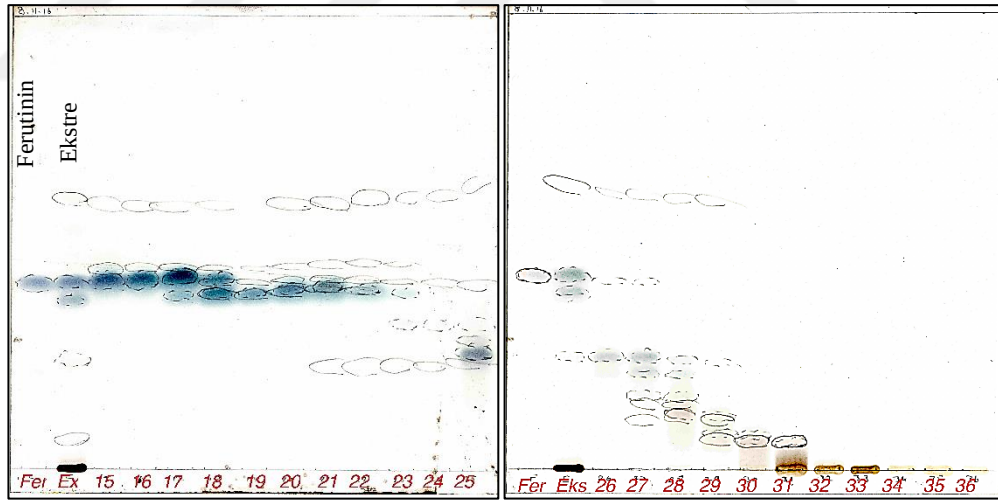
Şekil 3.12. Açık kolon kromatografisinde 99. no'lu fraksiyona ait YPSK kromatogramı

Grup 19, 20, 21 ve 22'de ise 310 nm'de maksimum UV absorbanısı yapan M2 kodu verilen pikin yoğun olduğu gözlenmiştir. Fraksiyonlar bu pike göre birleştirilmiştir (Şekil 3.13.).



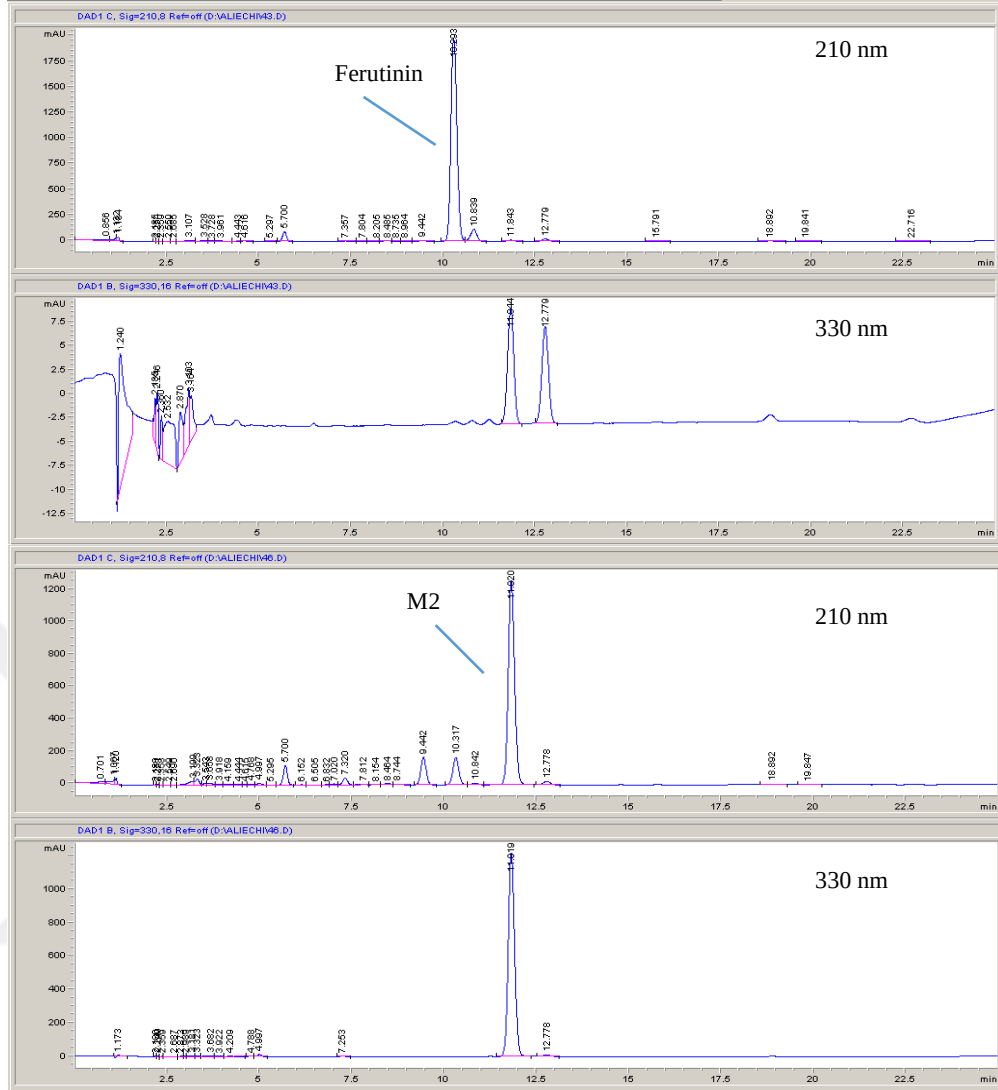
Şekil 3.13. Açık kolon kromatografisinde 149. no'lu fraksiyona ait YPSK kromatogramı

Birleştirilen fraksiyonlar öncelikle gruplar halinde İTK plağına uygulanarak bileşimdeki değişimler gözlemlenmiştir (Şekil 3.14.).



Şekil 3.14. Açık kolon kromatografisinde birleştirilen fraksiyon gruplarına İTK uygulaması.

Takiben birleştirilen fraksiyon gruplarının YPSK analizi yapılarak kromatogramlar elde edilmiştir (Şekil 3.15.)



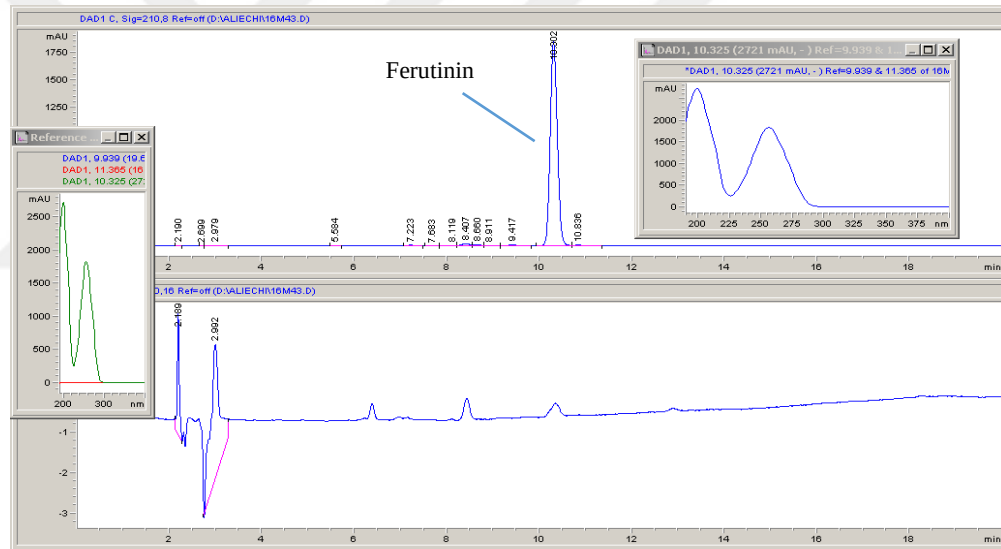
Şekil 3.15. Açık kolon kromatografisinde 16 ve 19 no'lu fraksiyon grubuna ait YPSK kromatogramları

3.6. Orta Basıncılı Sıvı Kromatografisine (OBSK/MPLC) Ait Bulgular

Açık kolon kromatografisi ile toplanan fraksiyonlar birleştirildikten sonra yapılan analizlerde yüksek oranda ferutinin içeren fraksiyon grupları YPSK ve İTK analizleriyle tespit edilmiştir. OBSK'nde ayırım için sırasıyla ferutinin ve M2 piklerini yoğun içeren 15, 16 ve 19, 20, 21, 22 no'lu fraksiyon grupları seçilmiştir.

3.6.1. Grup 16 ile OBSK Uygulaması

1,706 g tartılan grup 16 OBSK kolonuna yüklenerek ayırım işlemine tabi tutulmuştur. Amaç, yüksek konsantrasyonda hedef bileşik ferutinin içeren fraksiyonlar ya da yüksek saflıkta ferutinin izole etmek olmuştur. Ayırım işlemi sonunda 82-88. fraksiyonlar arasında yüksek saflıkta ($\geq \%95$ 210 nm; $\geq \%98$ 254 nm, YPSK ile) ferutinin olduğu düşünülen pik elde edilmiştir (Şekil 3.16.). Bu fraksiyonlar birleştirilip darası alınmış kaplara yerleştirilmiş, çözücüleri uçurulup liyofilize edildikten sonra tekrar hassas olarak tartılmış katı madde miktarı 120 mg'dır. Elde edilen ve ferutinin olduğu düşünülen bu maddeden 10 mg, NMR ve KS analizleri için ayrılmıştır.

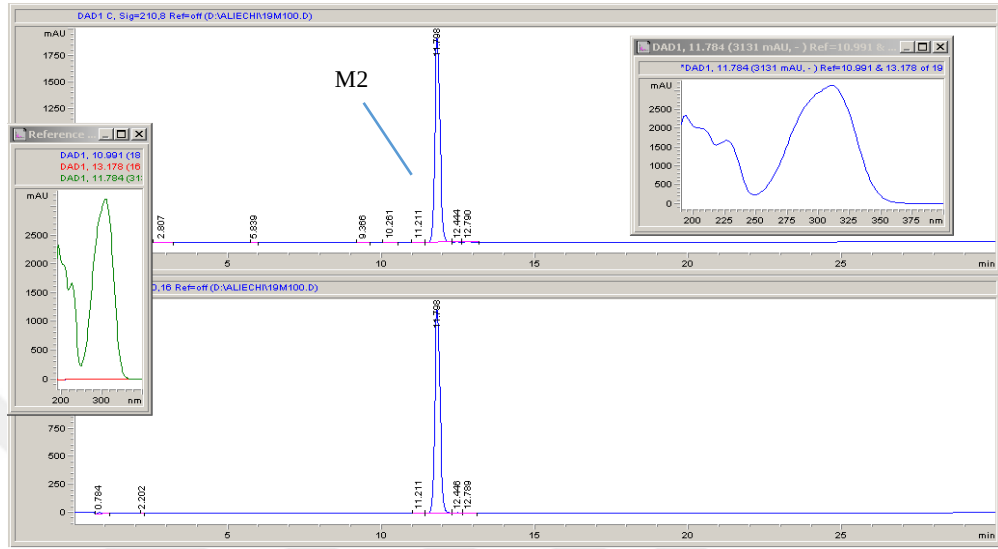


Şekil 3.16. Grup 16 OBSK uygulamasında 83 no'lu fraksiyona ait YPSK kromatogramı

3.6.2. Grup 19 ile OBSK Uygulaması

0,477 g tartılan grup 19 OBSK kolonuna yüklenerek ayırım işlemine tabi tutulmuştur. Amaç, yüksek konsantrasyonda hedef bileşik M2 içeren fraksiyonlar ya da yüksek saflıkta M2 izole etmek olmuştur. Ayırım işlemi sonunda 95-106. fraksiyonlar arasında yüksek saflıkta ($\geq \%96$, 210 nm, YPSK) M2 kodu verilen YPSK piki elde edilmiştir (Şekil 3.17.). Bu fraksiyonlar birleştirilip darası alınmış

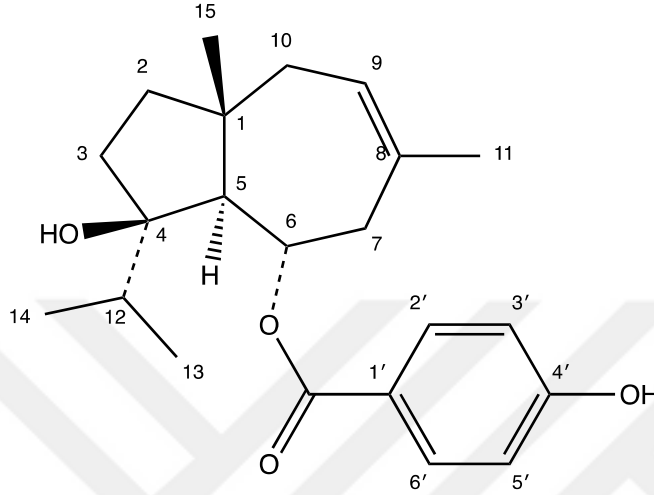
kaplara yerleştirilmiş, çözücülerini uçurulup liyofilize edildikten sonra tekrar hassas olarak tartılmış katı madde miktarı 150 mg'dır. Elde edilen ve M2 olduğu düşünülen bu maddeden 10 mg, NMR ve KS analizleri için ayrılmıştır.



Şekil 3.17. Grup 19 OBSK uygulamasında 100 no'lu fraksiyona ait YPSK kromatogramı

3.7. İzolasyon ve Yapı Tayin Çalışmalarına Ait Bulgular

3.7.1. Ferutinin Bileşiği ile İlgili Yapı Tayin Bulguları



Kapalı formül:	$C_{22}H_{30}O_4$
Molekül Ağırlığı:	358,5 g/mol
Kütle Spektroskopisi ESI (+), m/z :	381,89 [M-Na] ⁺
Kütle Spektroskopisi ESI (-), m/z :	357,91 [M-H] ⁻
¹ H-NMR (CDCl ₃ , 400 MHz):	Çizelge 3.11., Şekil 3.20.
¹³ C-NMR (CDCl ₃ , 400 MHz):	Çizelge 3.11., Şekil 3.21.

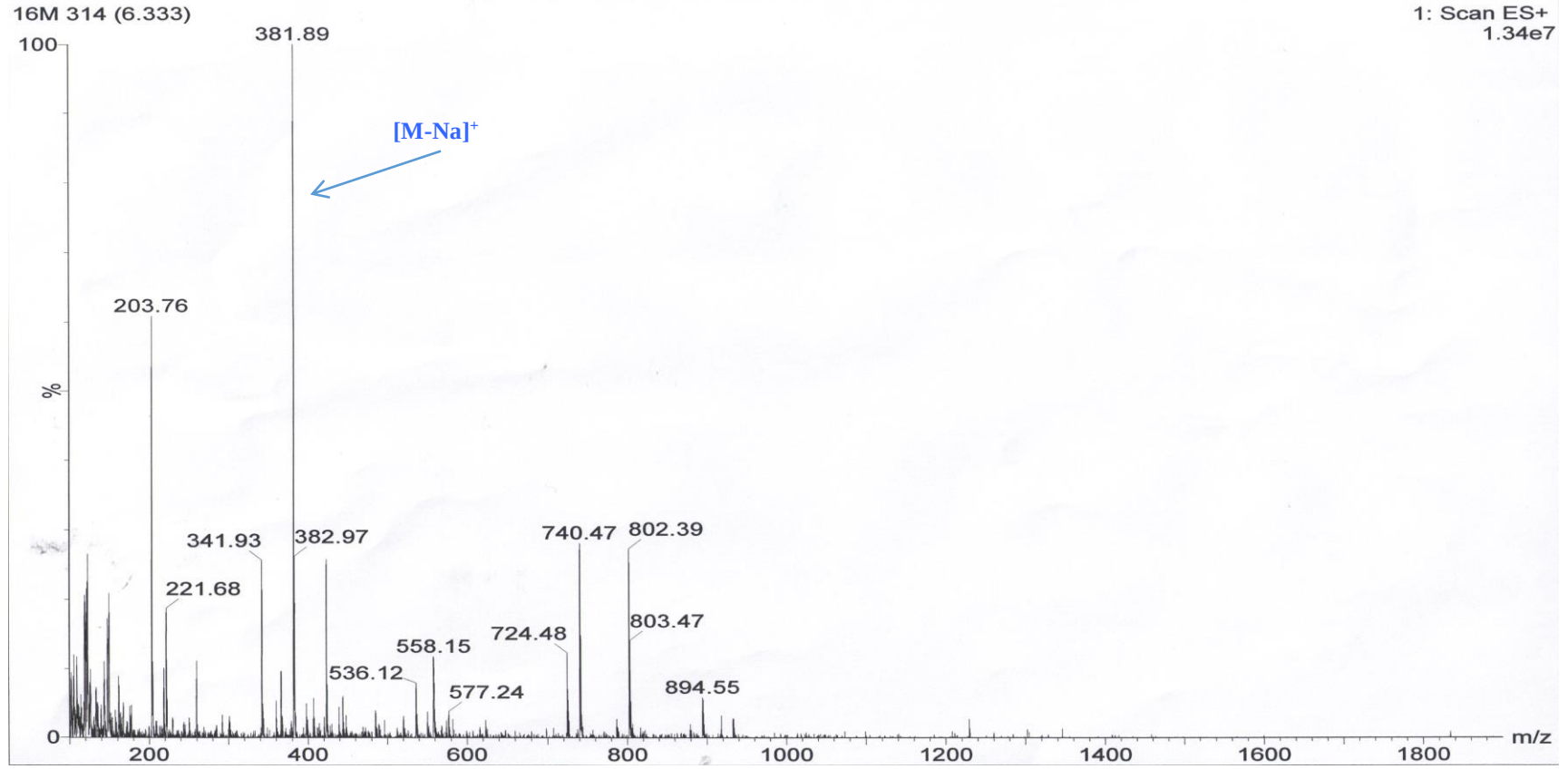
Elde edilen bileşik amorf beyaz bir tozdur. İzole edilen bileşiğin ferutinin olduğunun tespiti öncelikle YPSK analizi ile değerlendirilmiştir. İzole edilen madde, standart ferutinin ile aynı alıkonma zamanına sahip bulunmuştur. DAD ile elde edilen UV spektrumları karşılaştırılmış ve birebir uyuştukları da belirlenmiştir. Ayrıca örnek içi standart uygulaması yapılan doğruluk testinde elde edilen geri kazanım bulguları da teşhisi desteklemektedir.

Bileşik CDCl₃'da çözülerek ESI (+) ve ESI (-) iyon modunda kütle spektrumu elde edilmiş (Şekil 3.18. ve 3.19.), ¹H-NMR ve ¹³C-NMR spektrumları (Şekil 3.21.

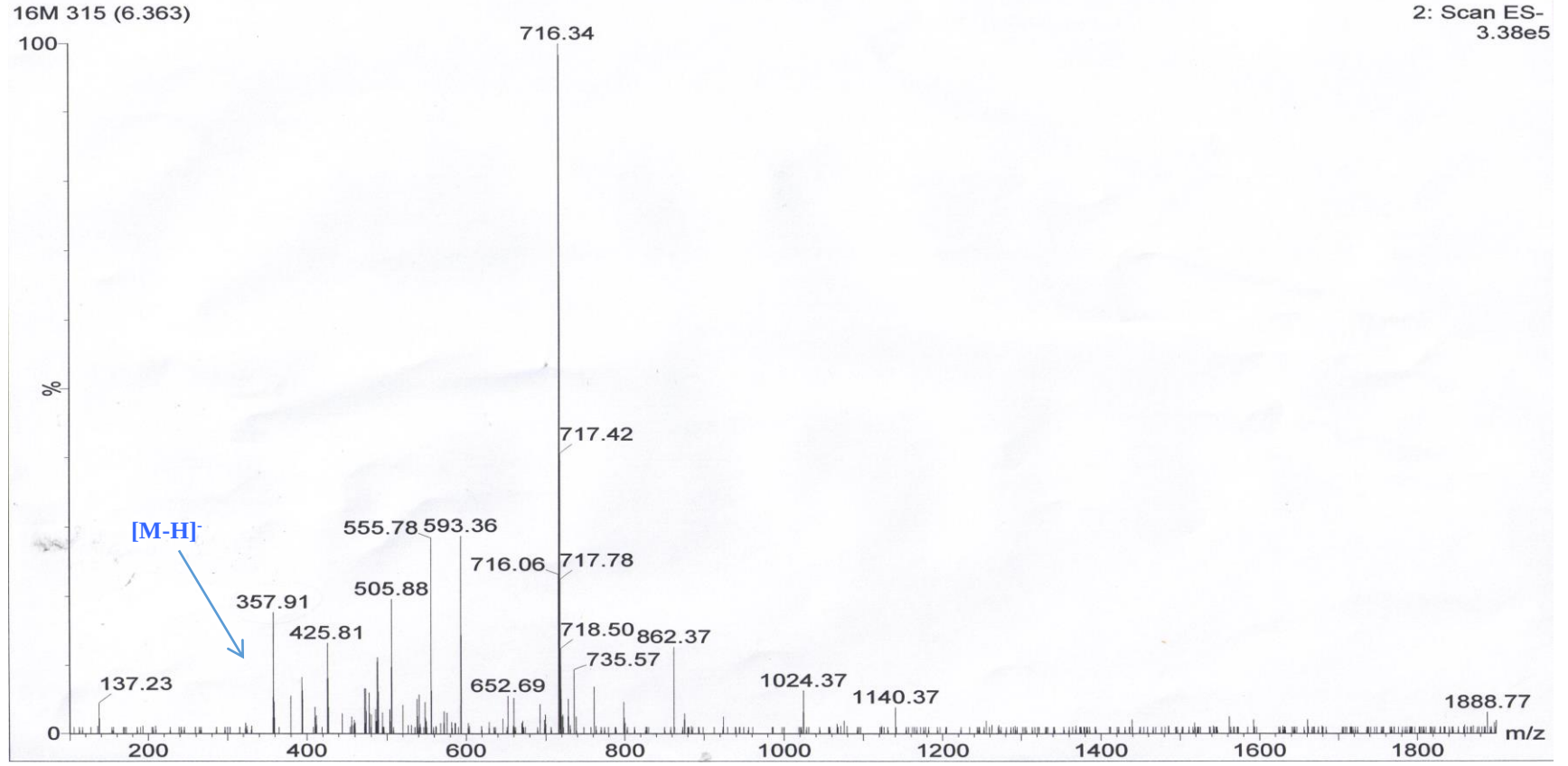
ve Şekil 3.22.) ile beraber 2 boyutlu NMR yöntemlerinden HSQC ve HMBC moleküldeki karbon ve protonların etkileşimleri incelenmiştir (Şekil 3.23. ve Şekil 3.20.).

Bileşiğin kütle spektroskopisi ile ESI (+) modunda elde edilen spektrumunda gözlenen moleküler iyon piki (m/z 381,89 $[M-H]^+$) bileşiğin Na (22,98 g/mol) tutmuş olabileceğine işaret etmektedir. Daha sonra ESI (-) modunda elde edilen kütle spektrumunda gözlenen moleküler iyon piki (m/z 357,91 $[M-H]^-$) ile pozitif moddaki Na etkisi ferutininin molekül ağırlığının (358,5 g/mol) doğrulanmasını sağlamıştır.





Şekil 3.18. Ferutinine ait pozitif iyon mod (ESI+) kütle spektrumu.



Şekil 3.19. Ferutinine ait negatif iyon mod (ESI-) kütle spektrumu.

^1H -NMR spektrumunda aromatik bölgede δ_{H} 6,89 (2H) ve δ_{H} 7,94 (2H) ppm'de iki adet dublet görülmüştür. Bu dubletlerin aromatik halkadaki 2',6' ve 3',5' konumlarındaki protonlara ait oldukları tahmin edilmiştir. ^{13}C -NMR spektrumunda δ_{C} 166,9 ppm'deki pikin karboksi (C=O) grubuna ait olduğu tespit edilmiştir. HSQC spektrumunda ise δ_{C} 115,4 ve δ_{C} 130,0 ppm'deki piklerin δ_{H} 6,89 ve δ_{H} 7,94 ppm'deki dubletlerle etkileştikleri görülmüştür. Takiben bu karbon ve protonların komşuluk ilişkilerinin incelenmesi amacıyla HMBC spektrumuna başvurulmuştur. HMBC spektrumunda C=O grubuna ait δ_{C} 166,9 ppm'deki sinyalin δ_{H} 7,94 ppm'deki dublet ile etkileştiği görülmektedir. Bu sebeple δ_{H} 7,94 ppm'deki dubletin aromatik halkada 2',6' konumundaki eşdeğer protonlara ait olduğu düşünülmüştür. Aromatik bölgedeki diğer dublet ise (δ_{H} 6,89 ppm) 3',5' pozisyonundaki protonlara atfedilmiştir. HMBC spektrumunda δ_{C} 160,6 ppm'deki pikin de 2',6' protonları (δ_{H} 7,94) ile kuvvetli etkileşirken 3',5' protonları (δ_{H} 6,89 ppm) ile de etkileştiği gözlemlenmiş ve bu pikin 4' konumundaki karbona ait olduğu belirlenmiştir. HSQC etkileşimlerine dayanarak δ_{C} 115,4 ppm'deki pikin 3',5' konumuna ait proton sinyali ile (δ_{H} 6,89 ppm) ve δ_{C} 132,0 ppm'deki pikin de 2',6' konumuna ait proton sinyali ile (δ_{H} 7,94 ppm) etkileştiği, dolayısıyla bu δ_{C} sinyallerinin sırasıyla 3',5' ve 2',6' karbonlarına ait olduğu tespit edilmiştir. δ_{C} 122,5 ppm'deki pikin HSQC'de hiçbir protonla etkileşimi tespit edilememiş, HMBC'de ise 3',5' protonları (δ_{H} 6,89 ppm) ile etkileşimi görülmüş, bu pikin de aromatik halkadaki 1' konumundaki karbon atomuna tekabül ettiği belirlenmiştir.

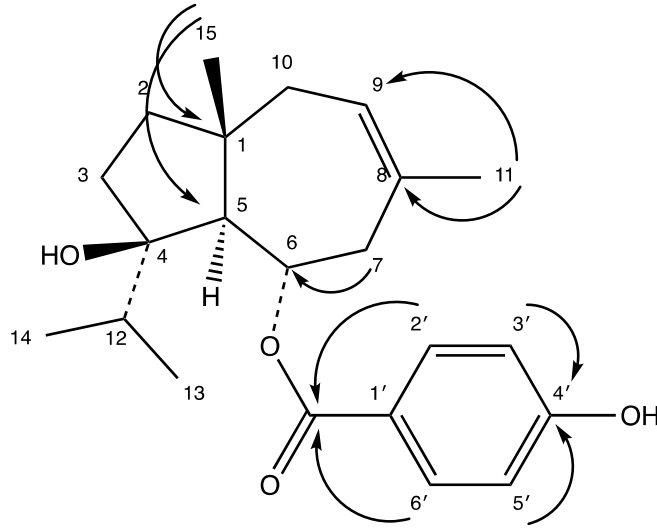
4. Konum ^{13}C -NMR pikinin de belirlenmesi ile geriye proton bağlı olmayan iki karbon atomu (1. ve 8. konum) kalması gerekmektedir. HSQC spektrumuna bakıldığında proton etkileşimi olmayan δ_{C} 44,0 ppm ve 133,5 ppm'deki pikler bu savı doğrulamaktadır. HMBC spektrumuna bakıldığında δ_{C} 44,0 ppm'deki sinyalin δ_{H} 1,11 ppm'deki 15. konum protonları ile etkileşimi görülmektedir. Bu veriler ışığında δ_{C} 44,0 ppm'deki pikin 1., 133,5 ppm'deki pikin 8. konuma ait olduğu belirlenmiştir. HMBC spektrumunda 8. konum karbonuyla güçlü etkileşime giren ^1H -NMR sinyallerinden allilik ($=\text{C}-\text{CH}_3$) alanda görülen δ_{H} 1,83 ppm'deki pikin 11.

konum protonlarına ait olduğu düşünülmüştür. δ_H 1,83 ppm'deki bu pik HSQC spektrumunda δ_C 26,4 ppm'deki pik ile etkileşime girmiştir.

^1H -NMR spektrumu vinilik ($C=CH$) alanda δ_H 5,28 ppm'deki triplet dublet (1H), 5,56 ppm'deki ve (1H) geniş triplet olmak üzere 2 adet proton sinyali görülmüştür. HSQC etkileşimlerine bakıldığında 5,56 ppm'deki geniş tripletin ^{13}C -NMR alken bölgesinde δ_C 125,3 ppm'deki pik ile etkileştiği görülmektedir. δ_H 5,28 ppm'deki triplet dubletin ise δ_C 71,2 ppm piki ile etkileştiği tespit edilmiştir. HMBC etkileşimlerine bakıldığında 11. konum (δ_H 1,83 ppm) proton sinyali ile bu piklerden sadece δ_C 125,3 ppm pikinin etkileştiği tespit edilmiş ve bu sinyal 9. konum (δ_H 5,56 ppm, br t) karbon atomuna atfedilmiştir.

^{13}C -NMR spektrumunun metilenik bölgesinde konumu belirlenmemiş olarak kalan 4 pikin, geriye kalan 4 metilenik (2., 3., 7. ve 10. konum) karbona ait olduğu sonucuna varılmıştır. δ_C 31,5 ppm'deki pikin HMBC spektrumunda 12. konum proton sinyali (δ_H 1,86 ppm) ile etkileştiği görülmektedir. Ayrıca HSQC spektrumunda δ_C 31,5 ppm'deki pik δ_H 1,62 ppm ve 1,96 ppm'deki pikler ile etkileşmektedir. Bu proton sinyallerinden δ_H 1,62 ppm'deki pik HMBC spektrumunda 4. konum (δ_C 86,8 ppm) ve δ_H 1,96 ppm'deki pik 12. konum (δ_C 37,1 ppm) sinyali karbonları ile etkileşim göstermiştir. Bu etkileşimler δ_C 31,5 ppm'deki pikin 3. konumdaki karbon atomuna ve δ_H 1,62 ppm ve 1,96 ppm'deki piklerin de 3. konum protonlarına ait olduğu yönünde kanıtlar sunmuştur.

δ_H 1,11 ppm'deki (3H, s, H-15) pik 3 ya da 4 adet HMBC etkileşimi verebileceği tarafımızca tahmin edilmekteydi. Bu etkileşimlerden bir tanesi δ_C 44,0 ppm'deki 1. konum karbon piki ile diğer ikisi ise δ_C 40,9 ppm, 41,3 ppm ve 41,5 ppm'deki 2. 7. ve 10. konuma ait olduğu düşünülen 3 karbon sinyalinden ikisi olduğu düşünülmüştür. Bu verilerin yanında δ_C 60,1 ppm'deki sinyalin HMBC spektrumunda δ_H 1,11 ppm (3H, s, H-15) ile etkileşime girdiği gözlenmiş ve bu pikin 5. konumdaki karbon atomuna ait olduğu belirlenmiştir. δ_C 60,1 ppm'deki pikin HSQC etkileşmesinden δ_H 2,03 ppm'deki pikin de 5. protonuna ait olduğu belirlenmiştir.



Şekil 3.20. Ferutinine ait HMBC etkileşimlerine örnekler.

5. Konum karbonunun da ^{13}C -NMR spektrumunda yerinin tespit edilmesi ile geriye sadece 6. konum karbonu kalmıştır. δ_{C} 71,2 ppm'deki pikin 6. konum karbon atomuna atfedilmiştir. δ_{H} 5,28 ppm'deki (1H, tr d) pikin de δ_{C} 71,2 ppm'deki pik ile etkileşimi HSQC ile tespit edilmiştir.

6. Konum ^{13}C -NMR sinyalinin HMBC sinyaline bakıldığında δ_{H} 2,03 ppm'deki 5. konum protonu ile etkileşimi görülmektedir. Ayrıca daha zayıf olan δ_{H} 2,28 ppm'deki (1H) dublet dublet ve δ_{H} 2,56 ppm'deki (1H) triplet etkileşimleri de tespit edilmiştir. Bu proton sinyalleri HSQC etkileşimleri incelendiğinde aynı karbon (δ_{C} 41,4 ppm) atomuna bağlı oldukları ve 7. konuma ait oldukları anlaşılmaktadır.

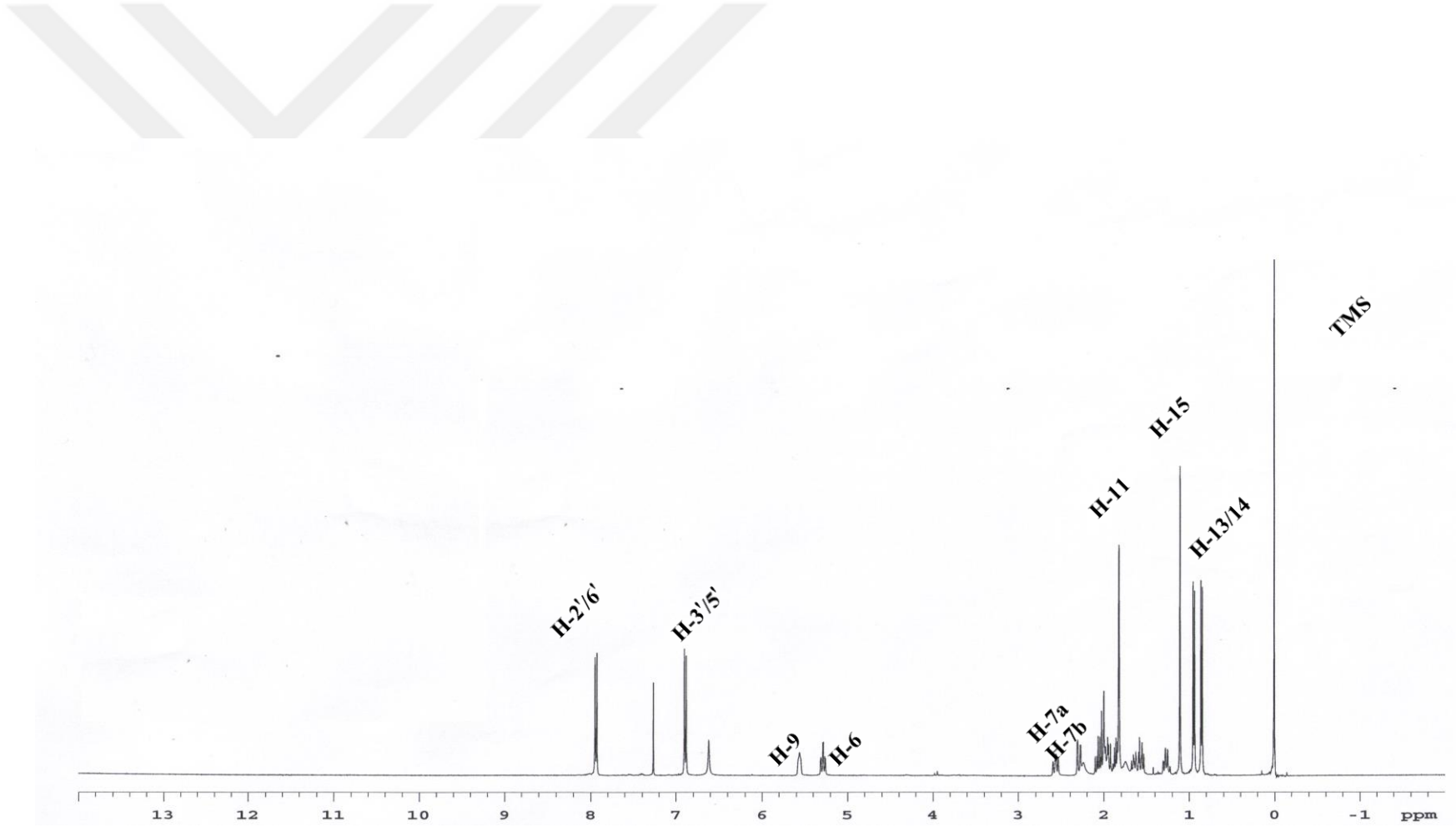
δ_{C} 40,9 ppm ve 41,3 ppm'deki karbon piklerinin HSQC etkileşimleri incelendiğinde 10. konum protonlarının komşu çifte bağ nedeniyle 2. konuma göre daha düşük alanda kimyasal kayma göstermesi beklenir. Bu açıdan bakıldığında δ_{C} 40,9 ppm'deki pikin ve onunla etkileşen δ_{H} 2,00 ppm ve 2,05 ppm'deki piklerin 10. konuma ait olduğu, δ_{C} 41,3 ppm'deki pik ve onunla etkileşen δ_{H} 1,27 ppm ve 1,59 ppm'deki piklerin ise 2. konuma ait olduğu tespit edilmiştir. δ_{H} 2,00 ppm ve 2,05 ppm (H-10a, H-10b) piklerinin HMBC etkileşimleri incelendiğinde sırasıyla δ_{C} 125,3 (C-9) ve δ_{C} 133,5 ppm (C-8) sinyalleri ile korrelasyon gösterdikleri belirlenmiştir.

Ferutinin ^1H -NMR spektrumunda (Şekil 3.18., Çizelge 3.11.) δ_{H} 0,85 ve 0,94 (3H, d, H-13 ve H-14), 1,11 (3H, s, H-15), 1,27 (1H, H-2a), 1,59 (1H, H-2b), 1,62 (1H, H-3a), 1,83 (3H, s, H-11), 1,86 (1H, H-12), 1,96 (1H, H-3b), 2,00 (1H, H-10a), 2,03 (1H, H-5), 2,05 (1H, H-10b), 2,28 (1H, dd, H-7a), 2,56 (1H, br t, H-7b), 5,28 (1H, tr d, H-6), 5,56 (1H, br, H-9), 6,89 (2H, d, H-3' ve H-5') ve 7,94 (2H, d, H-2' ve H-6') ppm'de proton sinyalleri gözlemlenmiş ve bunlar literatür verileri ile karşılaştırılarak konumları belirlenmiştir (Colman-Saizarbitoria ve ark., 2006; Diab ve ark., 2001; Geroushi ve ark., 2011; Miski ve ark., 1983) .

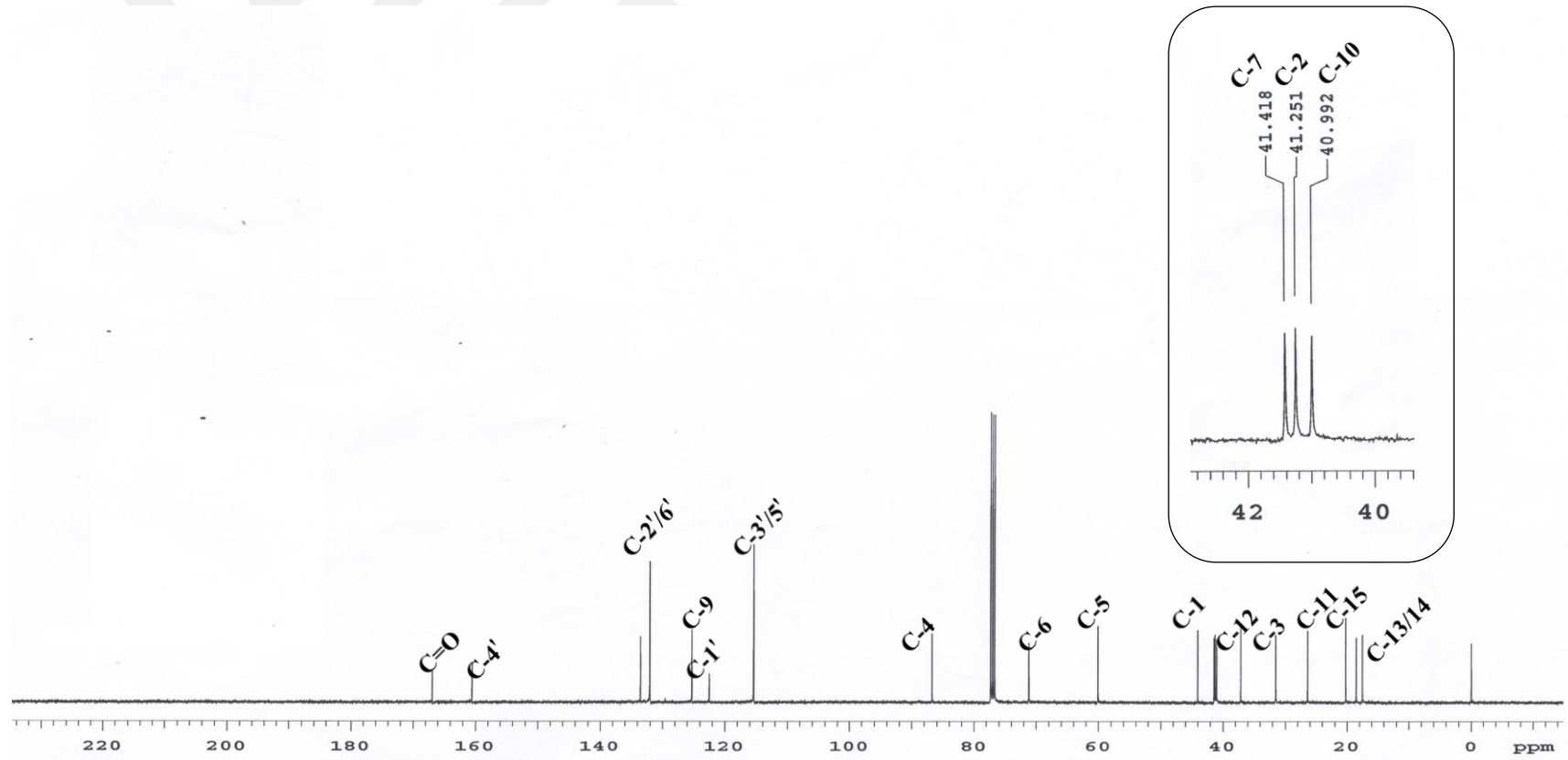
Ferutinin ^{13}C -NMR spektrumunda (Şekil 3.19., Çizelge 3.11.) δ_{C} 17,5 ve 18,5 (C-13 ve C-14), 20,2 (C-15), 26,4 (C-11), 31,5 (C-3), 37,1 (C-12), 40,9 (C-10), 41,3 (C-2), 41,4 (C-7), 44,0 (C-1), 60,1 (C-5), 71,2 (C-6), 86,8 (C-4), 115,4 (C-3' ve C-5'), 122,5 (C-1'), 125,3 (C-9), 132,0 (C-2' ve C-6'), 133,5 (C-8), 160,6 (C-4'), 166,9 (C=O) sinyalleri gözlemlenmiş ve bunlar literatür verileri ile karşılaştırılarak konumları belirlenmiştir (Colman-Saizarbitoria ve ark., 2006; Diab ve ark., 2001a; Geroushi ve ark., 2011; Miski ve ark., 1983).

Çizelge 3.11. Ferutinin ^{13}C (400 MHz), ^1H (400 MHz) NMR spektroskopik değerleri.

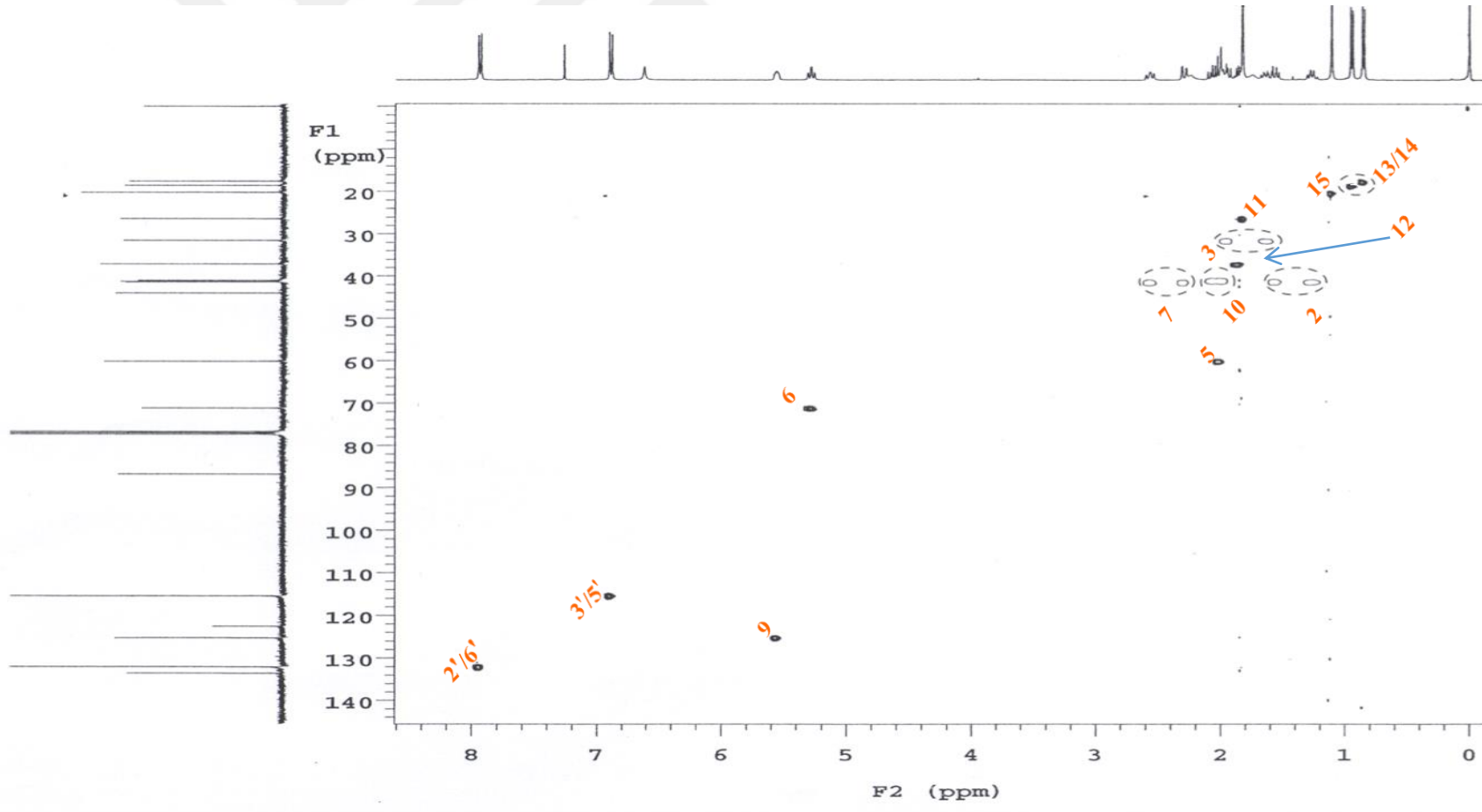
^{13}C ^1H				^{13}C ^1H			
Konum	ppm	ppm	J (Hz)	Konum	ppm	ppm	J (Hz)
1 (C)	44,0	-		11 (CH ₃)	26,4	1,83	geniş s
2a (CH ₂)	41,3	1,27		12 (CH)	37,1	1,86	
2b (CH ₂)	41,3	1,59		13 (CH ₃)	17,5	0,85	$d, J=6,8$
3a (CH ₂)	31,5	1,62		14 (CH ₃)	18,5	0,94	$d, J=6,8$
3b (CH ₂)	31,5	1,96		15 (CH ₃)	20,2	1,11	s
4 (C)	86,8	-		1' (C)	122,5	-	
5 (CH)	60,1	2,03		2' (CH ₂)	132,0	7,94	$d, J=8,4$
6 (C)	71,2	5,28	$td, J=2,8;10,2$	3' (CH ₂)	115,4	6,89	$d, J=8,4$
7a (CH ₂)	41,4	2,28	$dd, J=2,4; 14$	4' (CH ₂)	160,6	-	
7b (CH ₂)	41,4	2,56	geniş t	5' (CH ₂)	115,4	6,89	$d, J=8,4$
8 (C)	133,5	-		6' (CH ₂)	132,0	7,94	$d, J=8,4$
9 (CH ₂)	125,3	5,56	geniş t	C=O	166,9	-	
10a (CH ₂)	40,9	2,00	$d, J=8,4$				
10b (CH ₂)	40,9	2,05	$d, J=8,4$				



Şekil 3.21. Ferutinine ait ^1H -NMR spektrumu.

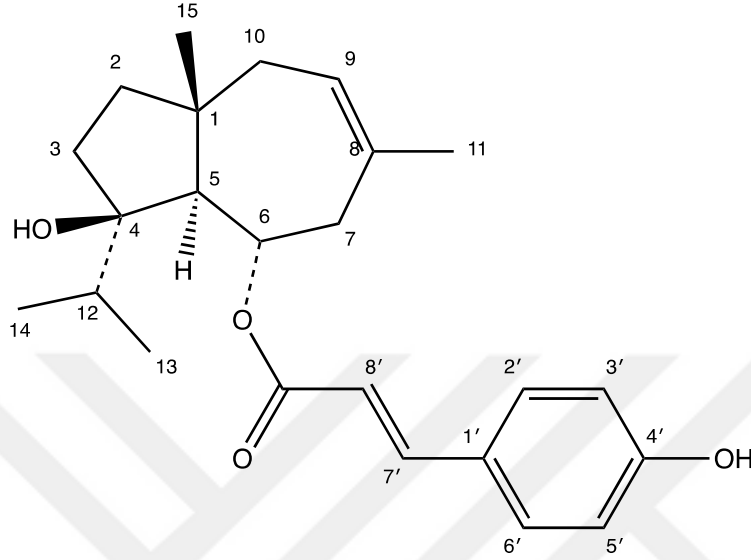


Şekil 3.22. Ferutinine ait ^{13}C -NMR spektrumu.



Şekil 3.23. Ferutinine ait HSQC spektrumu.

3.7.2. M2 (Ferutinol *p*-kumarat) Bileşiğı ile İlgili Yapı Tayin Bulguları



Kapalı formül:

$C_{24}H_{32}O_4$

Molekül Ağırlığı:

384,52 g/mol

Kütle Spektroskopisi ESI (+), m/z :

408,03 $[M-Na]^+$

Kütle Spektroskopisi ESI (-), m/z :

384,20 $[M-H]^-$

^1H -NMR ($CDCl_3$, 400 MHz):

Çizelge 3.12., Şekil 3.27.

^{13}C -NMR ($CDCl_3$, 400 MHz):

Çizelge 3.12., Şekil 3.28.

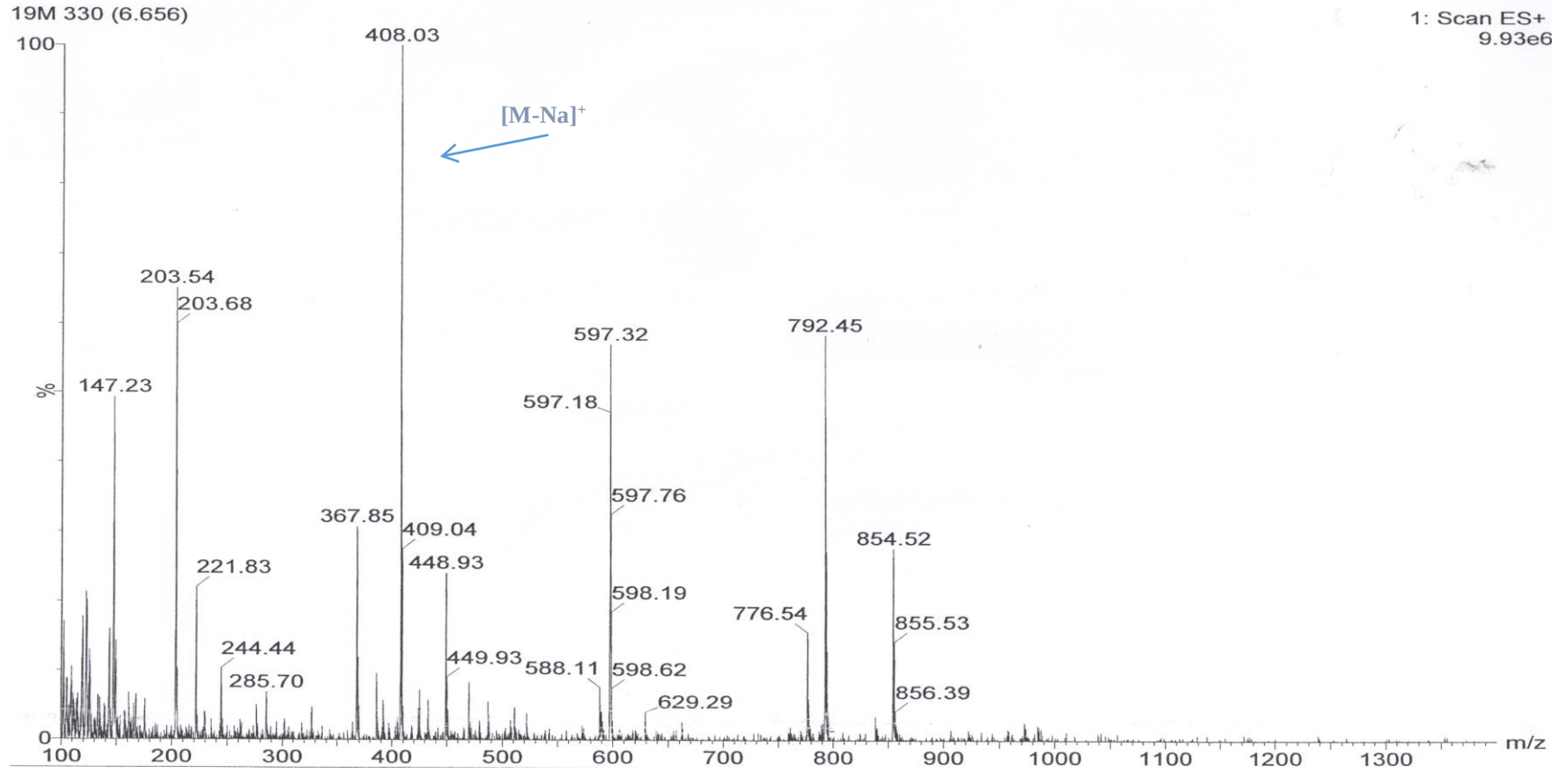
Elde edilen bileşik amorf beyaz bir tozdur. İzole edilen bileşiğın saflığı öncelikle YPSK analizi ile değerlendirilmiştir. İzole edilen madde, ekstre ve fraksiyonlarda hedeflenen pik ile (bkz. Şekil 3.14.) aynı alıkonma zamanına sahip olduğu bulunmuştur. DAD ile elde edilen UV spektrumları karşılaştırılmış ve birebir uyuştukları da belirlenmiştir.

Bileşik $CDCl_3$ 'da çözülerek ESI (+) ve ESI (-) iyon modunda kütle spektrumu elde edilmiş (Şekil 3.24. ve Şekil 3.25.), ^1H -NMR ve ^{13}C -NMR spektrumları (Şekil

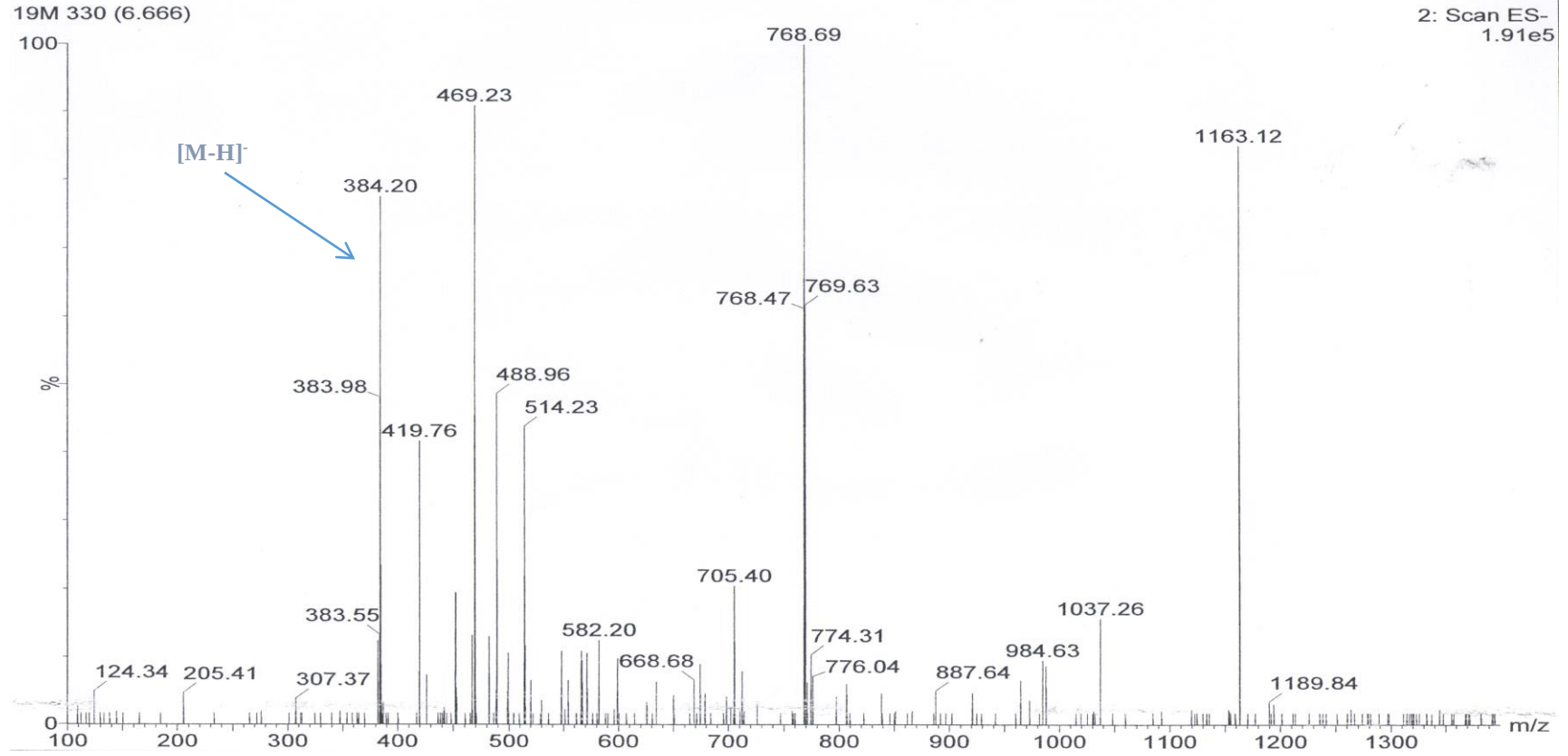
3.27. ve Şekil 3.28.) ile beraber 2 boyutlu NMR yöntemlerinden HSQC ve HMBC moleküldeki karbon ve protonların etkileşimleri incelenmiştir (Şekil 3.29. ve Şekil 3.26.).

Bileşiğin kütle spektroskopisi ile ESI (+) modunda elde edilen spektrumunda gözlenen moleküler iyon piki (m/z 408,03 $[M-H]^+$) bileşiğin Na (22,98 g/mol) tutmuş olabileceğine işaret etmektedir. Daha sonra ESI (-) modunda elde edilen kütle spektrumunda gözlenen moleküler iyon piki (m/z 384,20 $[M-H]^-$) ile pozitif moddaki Na etkisi bileşiğin molekül ağırlığının (384,52 g/mol) doğrulanmasını sağlamıştır.

^1H -NMR spektrumunda aromatik bölgede δ_H 6,87 (2H) ve δ_H 7,44 (2H) ppm'de iki adet dublet görülmüştür. Bu dubletlerin aromatik halkadaki 2',6' ve 3',5' konumlarındaki protonlara ait oldukları tahmin edilmiştir. ^{13}C -NMR spektrumunda δ_C 167,9 ppm'deki pikin C=O grubuna ait olduğu tespit edilmiştir. HSQC spektrumunda ise δ_C 116,0 ve δ_C 130,2 ppm'deki piklerin δ_H 6,87 ve δ_H 7,44 ppm'deki dubletlerle etkileştikleri görülmüştür. Takiben bu karbon ve protonların komşuluk ilişkilerinin incelenmesi amacıyla HMBC spektrumuna başvurulmuştur. HMBC spektrumunda C=O grubuna ait δ_C 166,9 ppm'deki sinyalin ferutininden farklı olarak δ_H 6,26 (1H) ve 7,64 (1H) ppm'deki dubletler ile etkileştiği görülmektedir. Bu iki dubletin HSQC spektrumunda ise sırasıyla δ_C 115,3 ve 145,5 ppm'deki karbon pikleri ile etkileştikleri tespit edilmiştir. Bu veriler C=O ile benzen halkası arasında 1'er proton bağlı iki karbon atomuna işaret etmektedir. Bu nedenle bu iki muhtemel pozisyona 7' ve 8' numaraları verilmiştir. δ_H 7,64 ppm'deki pik HMBC spektrumunda δ_C 130,2 ppm'deki pik (2',6' veya 3',5' olduğu düşünülen) ile etkileşim vermekte olup 7' konumuna (δ_C 145,5) atfedilmiştir. Dolayısıyla δ_H 6,26 (1H, d) ppm piki 8' konumuna (δ_C 115,3 ppm), δ_C 130,2 ppm piki 2',6' konumuna (δ_H 7,44 ppm, 2H, d), δ_C 116 ppm piki 3',5' konumuna (δ_H 6,87 ppm, 2H, d), atfedilmiştir. H-8' ve H-3',5' ile etkileşim veren δ_C 126,8 ppm'deki pikin C-1' dolayısıyla δ_C 158,3 ppm'deki pikin C-4' olduğu bulunmuştur.



Şekil 3.24. M2'ye (Ferutinol *p*-kumarat) ait pozitif iyon mod (ESI(+)) kütle spektrumu .



Şekil 3.25. M2'ye (Ferutinol *p*-kumarat) ait negatif iyon mod (ESI(-)) kütle spektrumu .

^1H -NMR spektrumunda doymun bölgede görülen δ_{H} 0,92 (3H) ve 0,95 (3H) ppm'deki iki adet dublet 13. ve 14. konumdaki metil protonlarına, δ_{H} 1,08 (3H) ppm'deki singlet ise 15. konumdaki metil protonlarına atfedilmiştir. HSQC sonuçlarına bakıldığında δ_{H} 0,92 ve 0,95 ppm'deki piklerle etkileşen ^{13}C -NMR piklerinin δ_{C} 17,6 ve 18,6 ppm'deki pikler olduğu görülmektedir. 15. Konum proton piki (δ_{H} 1,08 ppm) ile de δ_{C} 20,1 ppm'deki pikin etkileştiği tespit edilmiştir. HMBC sonuçlarında 13 ve 14. konum protonlarının birbirlerinin karbon sinyalleri ile etkileşimleri görülmektedir. Ayrıca bu iki sinyal δ_{C} 37,2 ppm ve 86,7 ppm'deki piklerle de etkileşim içindedir. Bu iki karbon sinyalinin 12. ve 4. konum karbonları olduğu tahmin edilmiştir. Bu karbon sinyallerinin hangi konuma ait olduğunun tespiti için HSQC sonuçlarına tekrar dönülerek kendi protonları ile etkileşimleri incelenmiştir. δ_{C} 86,7 ppm'deki pikin proton etkileşimi olmadığı görülmüş ve bu sinyalin 4. konuma ait olduğu tespit edilmiştir. HMBC'de 13 ve 14. konum protonları ile etkileşime giren δ_{C} 37,2 (C-12) ppm'deki pikin 12. konuma ait olduğu belirlenmiştir. HSQC spektrumunda δ_{C} 37,2 sinyali ile δ_{H} 1,91 (H-12) sinyalinin korelasyon gösterdiği saptanmıştır.

4. Konum ^{13}C -NMR pikinin de belirlenmesi ile geriye proton bağlı olmayan iki karbon atomu (1. ve 8. konum) kalması gerekmektedir. HSQC spektrumuna bakıldığında proton etkileşimi olmayan δ_{C} 44,0 ppm ve 133,6 ppm'deki pikler bu savı doğrulamaktadır. HMBC spektrumuna bakıldığında δ_{C} 44,0 ppm'deki sinyalin δ_{H} 1,08 ppm'deki 15. konum protonları ile etkileşimi görülmektedir. Bu veriler ışığında δ_{C} 44,0 ppm'deki pikin 1., 133,6 ppm'deki pikin ise 8. konuma ait olduğu belirlenmiştir. HMBC spektrumunda 8. konum karbonuyla güçlü etkileşime giren ^1H -NMR sinyallerinden allilik ($=\text{C}-\text{CH}_3$) alanda görülen δ_{H} 1,83 ppm'deki pikin 11. konum protonlarına ait olduğu düşünülmüştür. δ_{H} 1,83 ppm'deki bu pik HSQC spektrumunda δ_{C} 26,5 ppm'deki pik ile etkileşime girmiştir.

^1H -NMR spektrumu vinilik ($\text{C}=\text{CH}$) alanda δ_{H} 5,18 ppm'deki triplet dublet (1H), 5,54 ppm'deki (1H) geniş triplet olmak üzere 2 adet proton sinyali görülmüştür. HSQC etkileşimlerine bakıldığında 5,54 ppm'deki geniş tripletin ^{13}C -

NMR alken bölgesinde δ_C 125,2 ppm'deki pik ile etkileştiği görülmektedir. δ_H 5,28 ppm'deki triplet dubletin ise δ_C 70,9 ppm piki ile etkileştiği tespit edilmiştir. HMBC etkileşimlerine bakıldığında 11. konum (δ_H 1,83 ppm) proton sinyali ile δ_C 70,9 ppm ve 125,2 ppm'deki piklerden sadece δ_C 125,2 ppm pikinin etkileştiği tespit edilmiştir. δ_H 5,54 ppm (1h, br t) proton sinyali 9. konuma atfedilmiştir.

^{13}C -NMR spektrumunun metilenik bölgesinde konumu belirlenmemiş olarak kalan 4 pikin, geriye kalan 4 metilenik (2.,3.,7. ve 10. konum) karbona ait olduğu sonucuna varılmıştır. δ_C 31,7 ppm'deki pikin HMBC spektrumunda 12. konum proton sinyali (δ_H 1,91 ppm) ile etkileştiği görülmektedir. Ayrıca HSQC spektrumunda δ_C 31,7 ppm'deki pik δ_H 1,62 ppm ve 1,95 ppm'deki pikler ile etkileşmektedir. Bu proton sinyallerinden δ_H 1,62 ppm'deki pik HMBC spektrumunda 4. konum (δ_C 86,7 ppm) ve δ_H 1,95 ppm'deki pik 12. konum (δ_C 37,2 ppm) karbonları ile etkileşim göstermiştir. Bu etkileşimler δ_C 31,7 ppm'deki pikin 3. konumdaki karbon atomuna ve δ_H 1,62 ppm ve 1,95 ppm'deki piklerin de 3. konum protonlarına ait olduğu yönünde kanıtlar sunmuştur.

δ_H 1,08 ppm'deki (3H, s, H-15) pik 3 ya da 4 adet HMBC etkileşimi verdiği tahmin edilmekteydi. Bu etkileşimlerden bir tanesi δ_C 44,0 ppm'deki 1. konum karbon piki ile diğer ikisi ise δ_C 41,0 ppm, 41,3 ppm ve 41,4 ppm'deki 2. 7. ve 10. konuma ait olduğu düşünülen 3 karbon sinyalinden ikisi olduğu düşünülmüştür. Bu verilerin yanında δ_C 60,1 ppm'deki sinyalin HMBC spektrumunda δ_H 1,08 ppm (3H, s, H-15) ile etkileşime girdiği gözlenmiş ve bu pikin 5. konumdaki karbon atomuna ait olduğu belirlenmiştir. δ_C 60,1 ppm'deki pikin δ_H 1,96 ppm HSQC etkileşmesi gözlenmiştir.

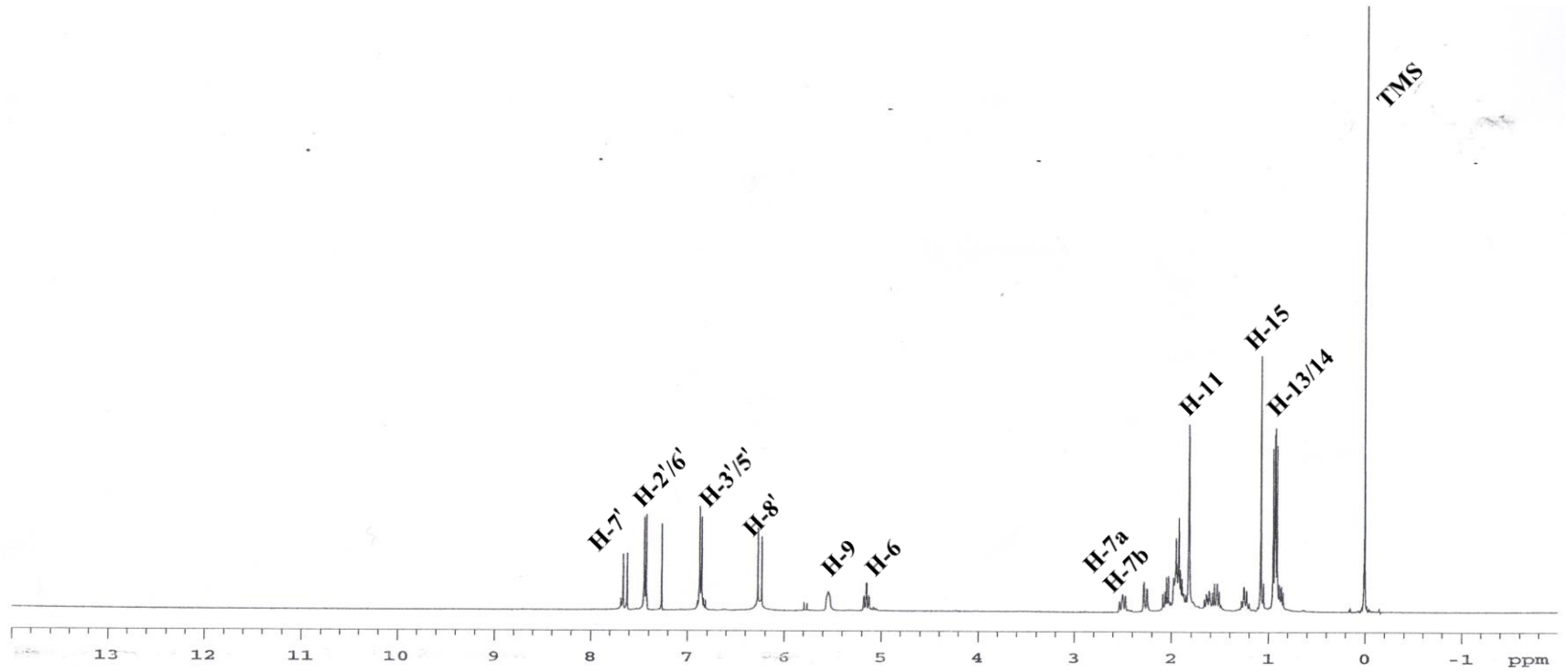
Bileşiğin ^1H -NMR spektrumunda (Şekil 3.18., Çizelge 3.12.) δ_{H} 0,92 ve 0,95 (3H, d, H-13 ve H-14), 1,08 (3H, s, H-15), 1,24 (1H, H-2a), 1,54 (1H, H-2b), 1,62 (1H, H-3a), 1,83 (3H, s, H-11), 1,91 (1H, H-12), 1,95 (1H, H-3b), 1,96 (1H, H-10a), 1,96 (1H, H-5), 2,04 (1H, H-10b), 2,27 (1H, dd, H-7a), 2,50 (1H, br t, H-7b), 5,18 (1H, tr d, H-6), 5,54 (1H, br, H-9), 6,26 (1H, d, H-8'), 6,87 (2H, d, H-3' ve H-5'), 7,44 (2H, d, H-2' ve H-6') ve 7,64 (1H, d, H-7') ppm'de proton sinyalleri gözlemlenmiş ve bunlar literatür verileri ile karşılaştırılarak konumları belirlenmiştir (Miski ve Jakupovic, 1990).

Bileşiğin ^{13}C -NMR spektrumunda (Şekil 3.19., Çizelge 3.12.) δ_{C} 17,6 ve 18,6 (C-13 ve C-14), 20,1 (C-15), 26,5 (C-11), 31,7 (C-3), 37,2 (C-12), 41,0 (C-10), 41,3 (C-2), 41,4 (C-7), 44,0 (C-1), 60,1 (C-5), 70,9 (C-6), 86,7 (C-4), 115,3 (C-8'), 116,0 (C-3' ve C-5'), 125,2 (C-9), 126,8 (C-1'), 130,2 (C-2' ve C-6'), 133,6 (C-8), 145,5 (C-7') 158,3 (C-4'), 167,9 (C=O) sinyalleri gözlemlenmiş ve bunlar literatür verileri ile karşılaştırılarak konumları belirlenmiştir (Miski ve Jakupovic, 1990).

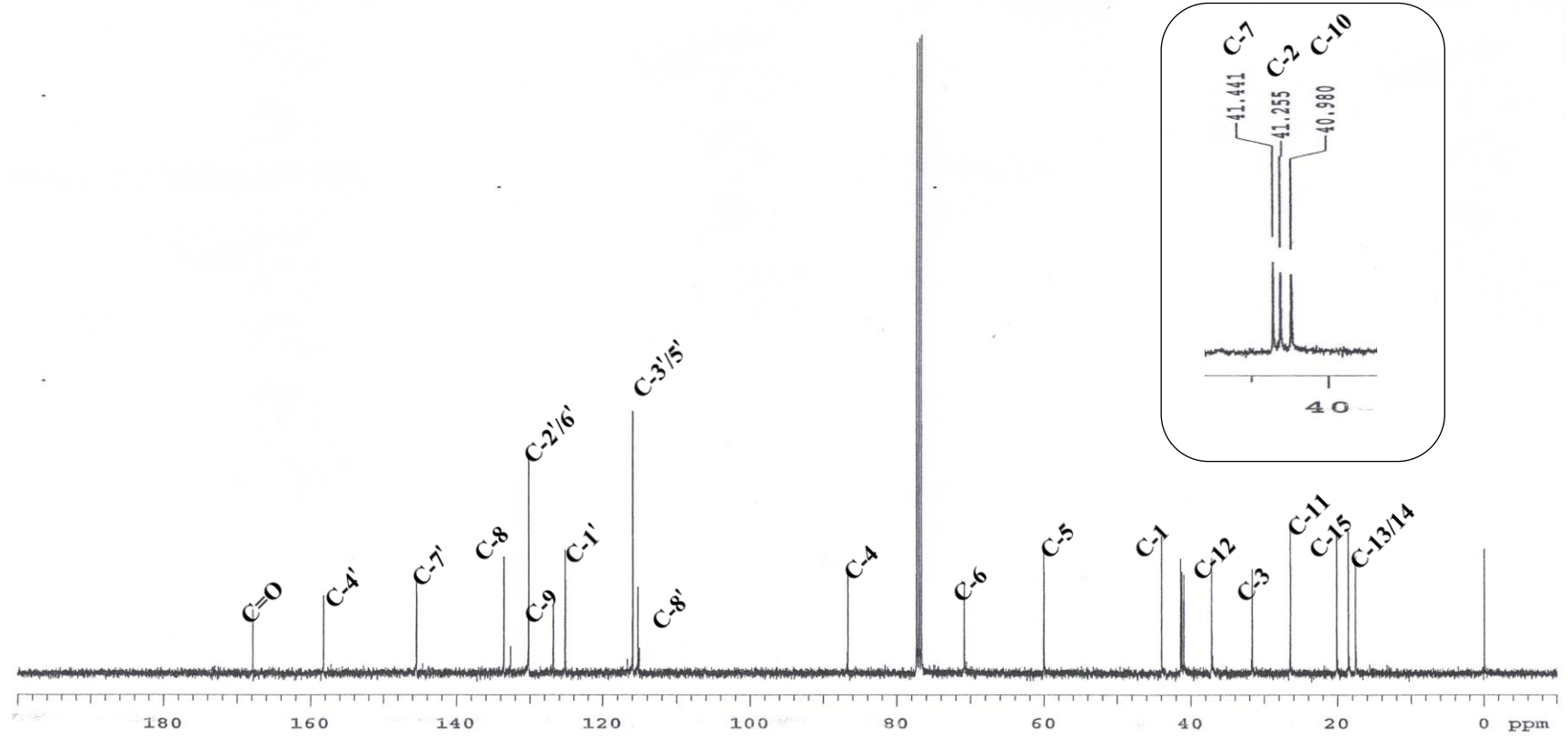
Çizelge 3.12. M2 (ferutinol *p*-kumarat) ^{13}C (400 MHz), ^1H (400 MHz) NMR spektroskopik değerleri.

^{13}C ^1H				^{13}C ^1H			
Konum	ppm	ppm	<i>J</i> (Hz)	Konum	ppm	ppm	<i>J</i> (Hz)
1 (C)	44,0	-		11 (CH ₃)	26,5	1,83	geniş s
2a (CH ₂)	41,3	1,24	geniş dd	12 (CH)	37,2	1,91	
2b (CH ₂)	41,3	1,54		13 (CH ₃)	17,6	0,92	<i>d</i> , <i>J</i> =6,4
3a (CH ₂)	31,7	1,62		14 (CH ₃)	18,6	0,95	<i>d</i> , <i>J</i> =7,2
3b (CH ₂)	31,7	1,95		15 (CH ₃)	20,1	1,08	s
4 (C)	86,7	-		1' (C)	126,8	-	
5 (CH)	60,1	1,96		2' (CH ₂)	130,2	7,44	<i>d</i> , <i>J</i> =8,8
6 (CH)	70,9	5,18	tr <i>d</i> , <i>J</i> =2,8;10,8	3' (CH ₂)	116,0	6,87	<i>d</i> , <i>J</i> =8,8
7a (CH ₂)	41,4	2,27	dd, <i>J</i> = 2,4; 14,4	4' (C)	158,3	-	
7b (CH ₂)	41,4	2,50	geniş <i>t</i>	5' (CH ₂)	116,0	6,87	<i>d</i> , <i>J</i> =8,8
8 (C)	133,6	-		6' (CH ₂)	130,2	7,44	<i>d</i> , <i>J</i> =8,8
9 (CH)	125,3	5,54	geniş <i>t</i>	7' (CH)	145,5	7,64	<i>d</i> , <i>J</i> =16
10a (CH ₂)	41,0	1,96		8' (CH)	115,3	6,26	<i>d</i> , <i>J</i> =16
10b (CH ₂)	41,0	2,04	<i>d</i> , <i>J</i> =8,4	C=O	167,9	-	

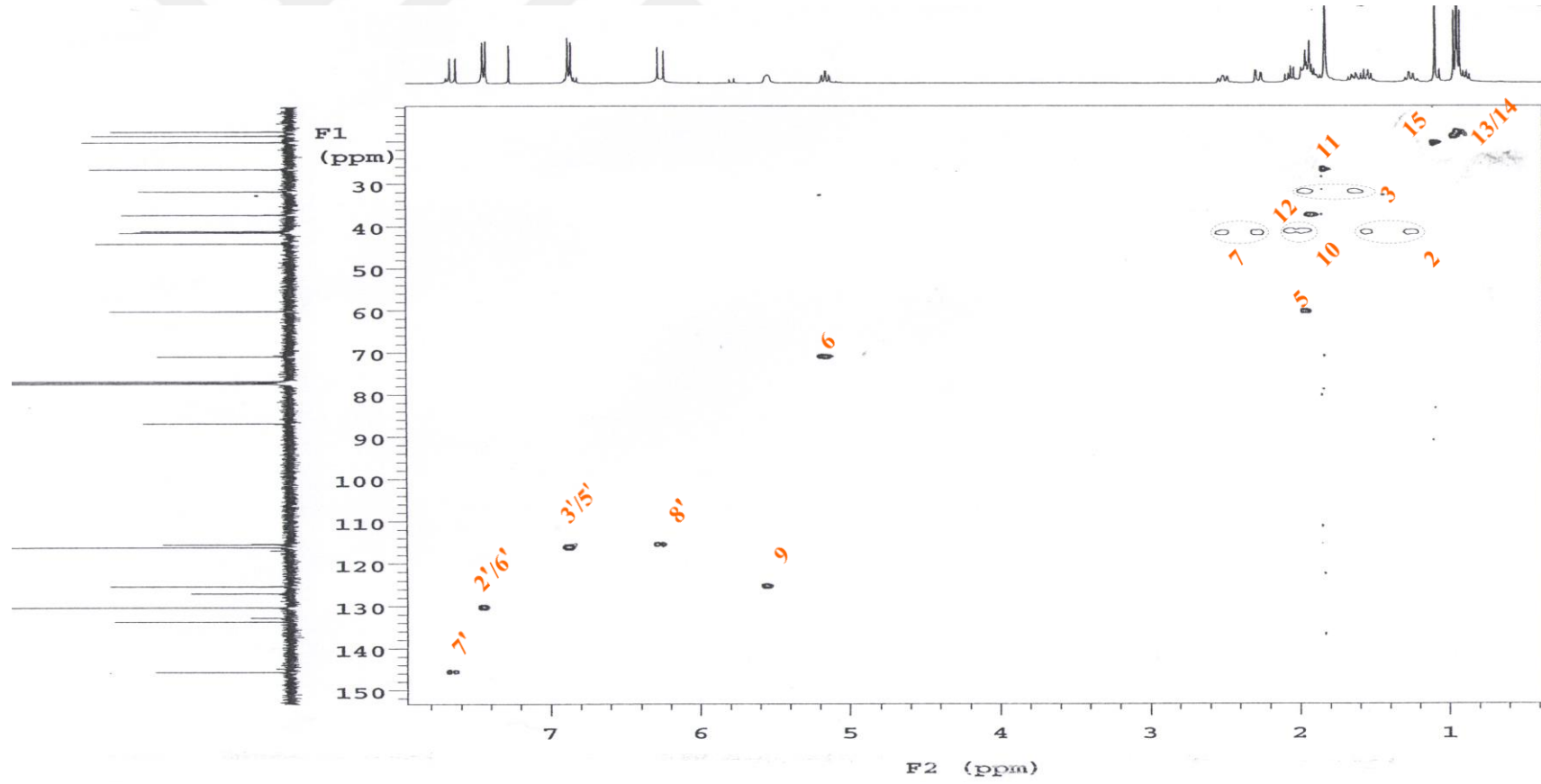
Elde edilen veriler M2 kodlu bileşiğin ferutinol *p*-kumarat olduğunu ortaya koymaktadır.



Şekil 3.27. M2'ye (Ferutanol *p*-kumarat) ait ^1H -NMR (CDCl_3 , 400 MHz) spektrumu.



Şekil 3.28. M2'ye (Ferutanol *p*-kumarat) ait ^{13}C -NMR (CDCl_3 , 400 MHz) spektrumu.

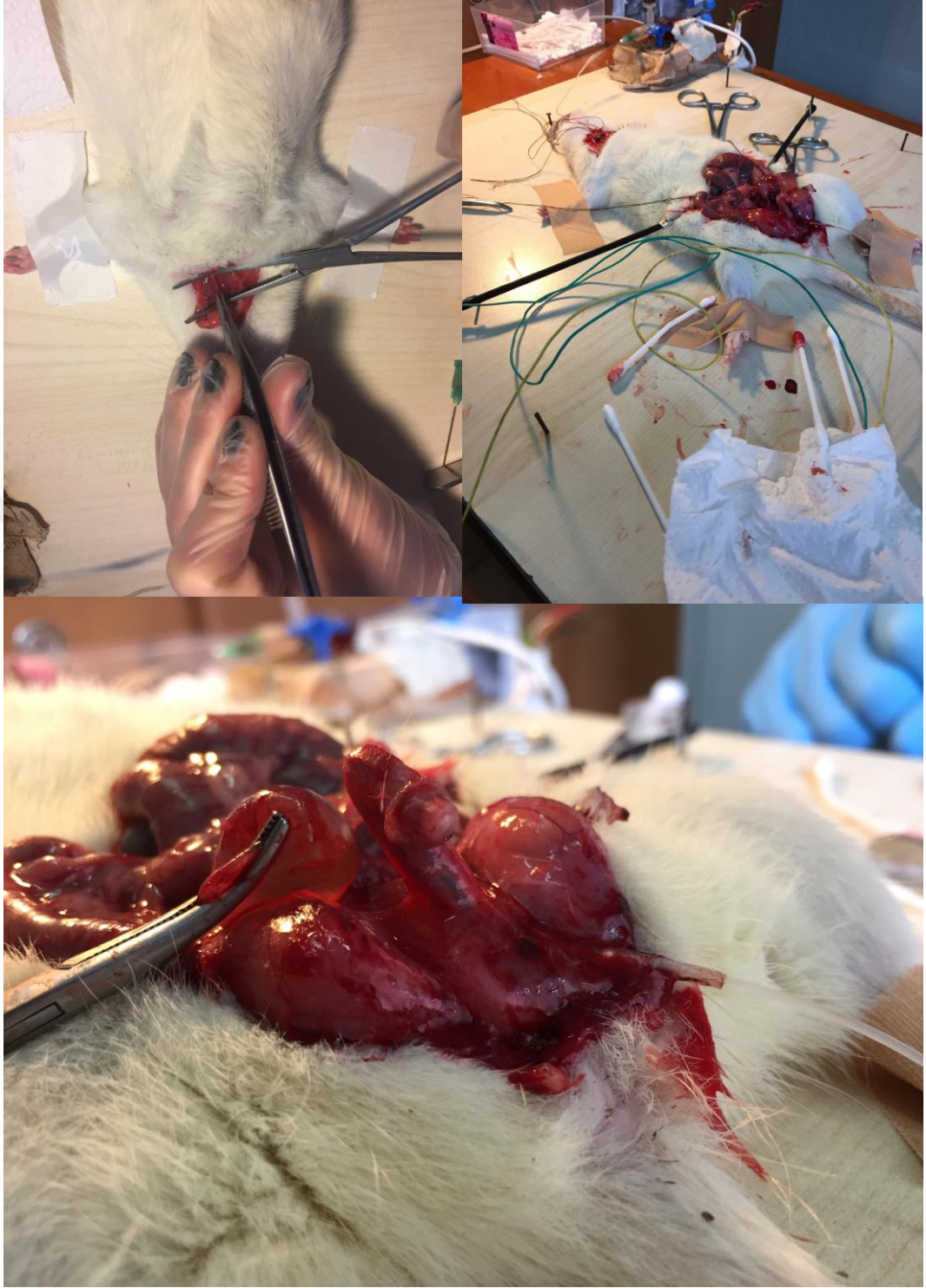


Şekil 3.29 M2'ye (Ferutinol *p*-kumarat) ait HSQC spektrumu.

3.8. *İn vivo* ve *İn vitro* Deneyler

3.8.1. *İn vivo* Deneyler

İn vivo deneylerde toplam ICP ve ICP/MAP değerleri ölçölmüştür. Kontrol ve diyabetik hayvanlarda yapılan ölçömlerde ekstre ya da saf maddeler verilmeden önce kavernoza sinire 2,5, 5 ve 7,5 volt düzeylerinde uyarılar verilmiş ve gevşeme yanıtı monitörize edilerek eğri altı alanlar kaydedilmiştir (kontrol ve diyabet). Sonrasında numune uygulanarak (kontrol+ekstre/ferutinin/M2 ve diyabet+ekstre/ferutinin/M2; 5mg/kg ekstre ve 10-2 mmol/kg ferutinin/M2) aynı voltaj düzeyleri tekrarlanmış ve eğri altı alanlar kaydedilmiştir. Elde edilen verilerden ortalamalar ve ortalamaların standart hataları hesaplanmıştır. ANOVA (Benferroni *post hoc*) testi yapılarak istatistiksel analiz yapılmıştır. $p<0,05$ değeri anlamlı kabul edilmiştir. İstatistiksel analizlerde ve grafiklerin oluşturulmasında GraphPad InStat ve Microsoft Excel programları kullanılmıştır.

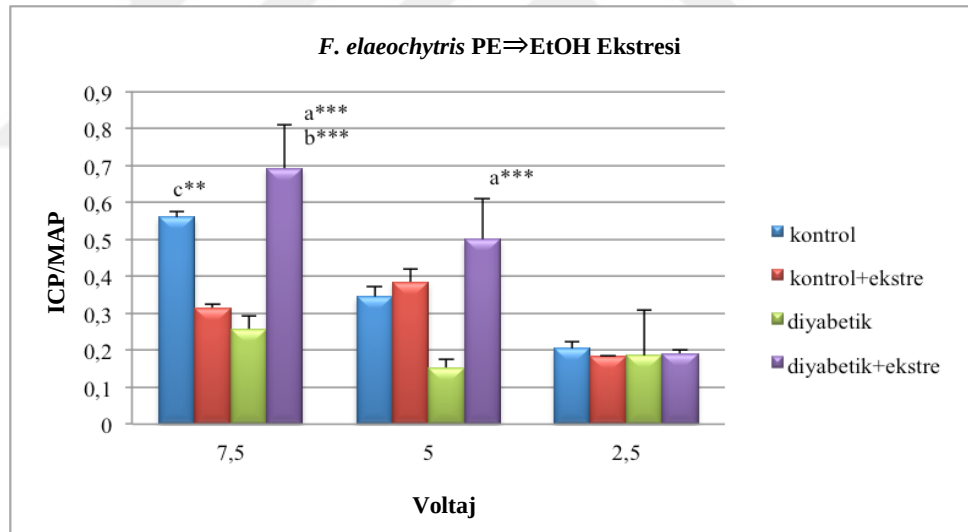


Şekil 3.30. *In vivo* hayvan deneyleri, intrakavernozal uygulama.

3.8.1.1. ICP/MAP Bulguları

Ekstreler ve saf maddelere ait ICP/MAP verileri uygulanan her bir voltaj için ayrı ayrı karşılaştırılmıştır. Deneyde kontrol ve diyabetik gruplara tedavi verilmeden önce kavernoza sinire voltaj uygulanmış ve alınan yanıtlar kaydedilmiştir.

F. elaeochoytris kök PE⇒EtOH ekstresinden elde edilen ICP/MAP verileri Şekil 3.31.'de grafik halinde verilmiştir. Kontrol grubunda kavernoza sinire 7,5 V, 5 V, ve 2,5 V düzeylerinde elektriksel alan uyarımı sonrasında 5 mg/kg dozda *F. elaeochoytris* PE⇒EtOH ekstresi i.k. yolla verilmiş ve tekrar aynı voltaj uygulandığında ICP/MAP değerinin düştüğü gözlenmiştir. Ekstrenin verilmesi ile kontrol grubu ICP/MAP değerlerinde meydana gelen bu fark 7,5 V uygulamasında anlamlı bulunmuştur ($p<0,01$).

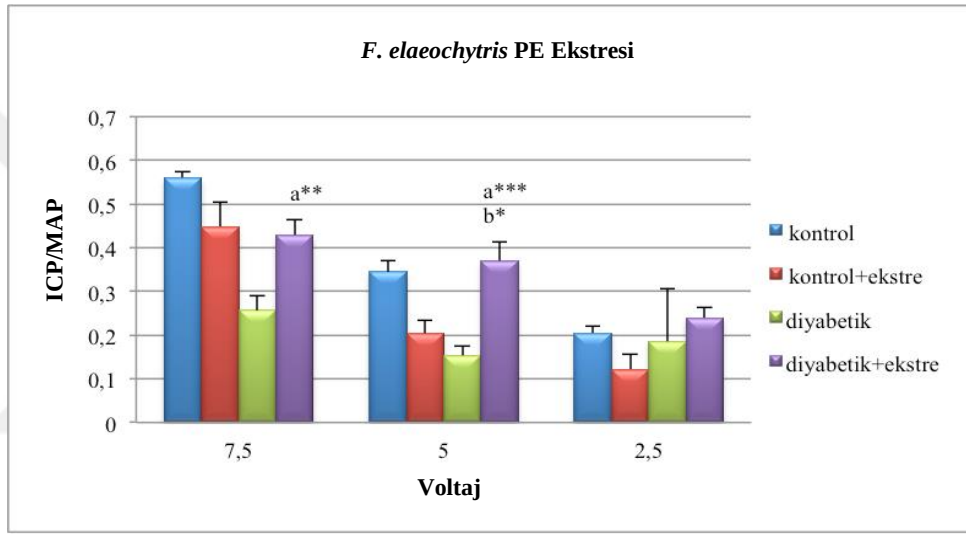


Şekil 3.31. *F. elaeochoytris* kök PE⇒EtOH ekstresi (5 mg/kg) ICP/MAP bulguları. *: $p<0,05$, **: $p<0,01$, ***: $p<0,001$. “a”: diyabetik+ekstre ve diyabetik grupları arası fark. “b”: diyabetik+ekstre ve kontrol+ekstre grupları arası fark. “c”: kontrol+ekstre ve kontrol grupları arası fark.

Diyabetik hayvanlarda *F. elaeochoytris* kök PE⇒EtOH ekstresi uygulandıktan sonra hesaplanan ortalama ICP/MAP değerleri hayvanların kavernoza sinirleri 7,5 V ve 5 V ile uyarıldığında anlamlı bir artış göstermiştir ($p<0,001$). Yine hayvanların kavernoza sinirleri 7,5 V ile uyarıldığında ekstre uygulanan diyabet grubunda

hesaplanan ortalama ICP/MAP değeri ekstre uygulanan kontrol grubuna göre anlamlı artış göstermiştir ($p<0,001$).

F. elaeochoytris kök PE ekstresinden alınan ICP/MAP verileri Şekil 3.32.'de grafik halinde verilmiştir. Kontrol grubunda kavernoza sinire 7,5 V, 5 V, ve 2,5 V düzeylerinde elektriksel alan uyarımı sonrasında 5 mg/kg dozda *F. elaeochoytris* PE ekstresi i.k. yolla verilmiş ve tekrar aynı voltaj uygulandığında ICP/MAP değerinin düştüğü gözlenmiş, ancak ortalamalar arasındaki fark anlamlı bulunmamıştır.

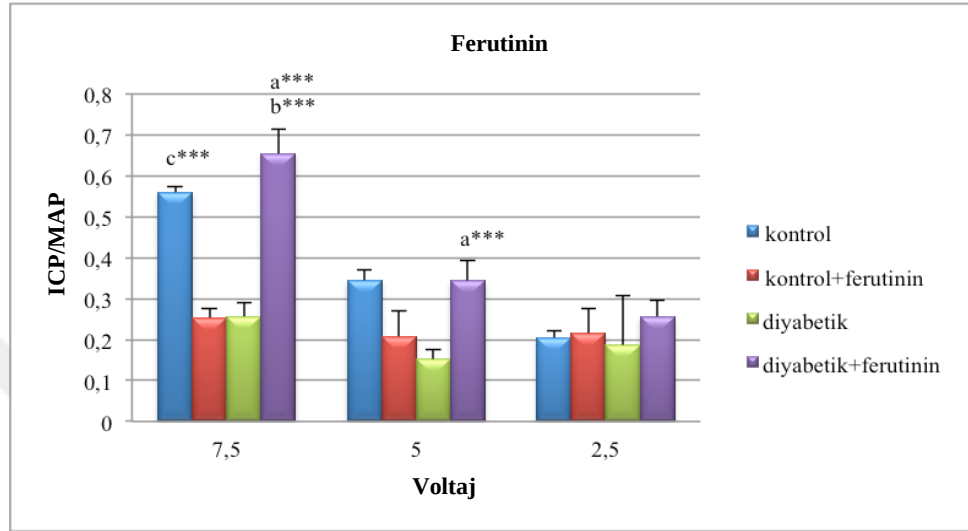


Şekil 3.32. *F. elaeochoytris* kök PE ekstresi (5 mg/kg) toplam ICP/MAP bulguları. *: $p<0,05$, **: $p<0,01$, ***: $p<0,001$. “a”: diyabet+ekstre ve diyabet grupları arası fark. “b”: diyabet+ekstre ve kontrol+ekstre grupları arası fark. “c”: kontrol+ekstre ve kontrol grupları arası fark.

Diyabetik hayvanlarda *F. elaeochoytris* kök PE ekstresi uygulandıktan sonra ölçülen ortalama ICP/MAP değerleri hayvanların kavernoza sinirleri 7,5 V ($p<0,01$) ve 5 V ($p<0,001$) ile uyarıldığında anlamlı bir artış göstermiştir. Yine hayvanların kavernoza sinirleri 5 V ile uyarıldığında ekstre uygulanan diyabetik grupta ölçülen ortalama ICP/MAP değeri ekstre uygulanan kontrol grubuna göre anlamlı artış göstermiştir ($p<0,05$).

F. elaeochoytris köklerinden izole edilen ferutininden alınan ICP/MAP verileri Şekil 3.33.'te grafik halinde verilmiştir. Kontrol grubunda kavernoza sinire 7,5 V, 5

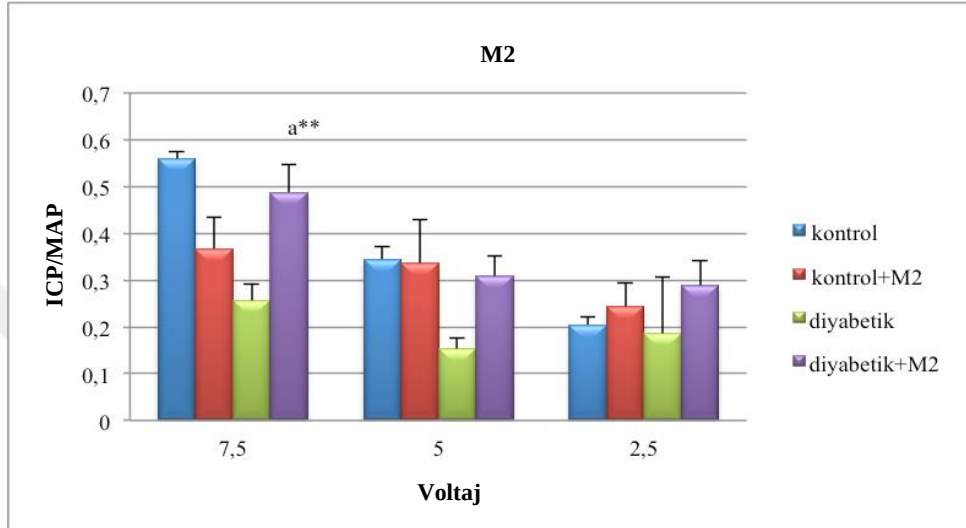
V, ve 2,5 V düzeylerinde elektriksel alan uyarımı sonrasında 10-2 mmol/kg dozda ferutinin i.k. yolla verilmiş ve tekrar aynı voltaj uygulandığında ICP/MAP değerinin düştüğü gözlenmiştir. Ekstrenin verilmesi ile kontrol grubu ICP/MAP değerlerinde meydana gelen bu fark 7,5 V uygulamasında anlamlı bulunmuştur ($p<0,001$).



Şekil 3.33. Ferutinin için (10-2 mmol/kg) ICP/MAP bulguları. *: $p<0,05$, **: $p<0,01$, ***: $p<0,001$. “a”: diyabet+ferutinin ve diyabet grupları arası fark. “b”: diyabet+ferutinin ve kontrol+ferutinin grupları arası fark. “c”: kontrol+ferutinin ve kontrol grupları arası fark.

Diyabetik hayvanlarda ferutinin uygulandıktan sonra hesaplanan ortalama ICP/MAP değerleri hayvanların kavernozaal sinirleri 7,5 V ve 5 V ile uyarıldığında anlamlı bir artış göstermiştir ($p<0,001$). Yine hayvanların kavernozaal sinirleri 7,5 V ile uyarıldığında ekstre uygulanan diyabet grubunda hesaplanan ortalama ICP/MAP değeri ekstre uygulanan kontrol grubuna göre anlamlı artış göstermiştir ($p<0,001$).

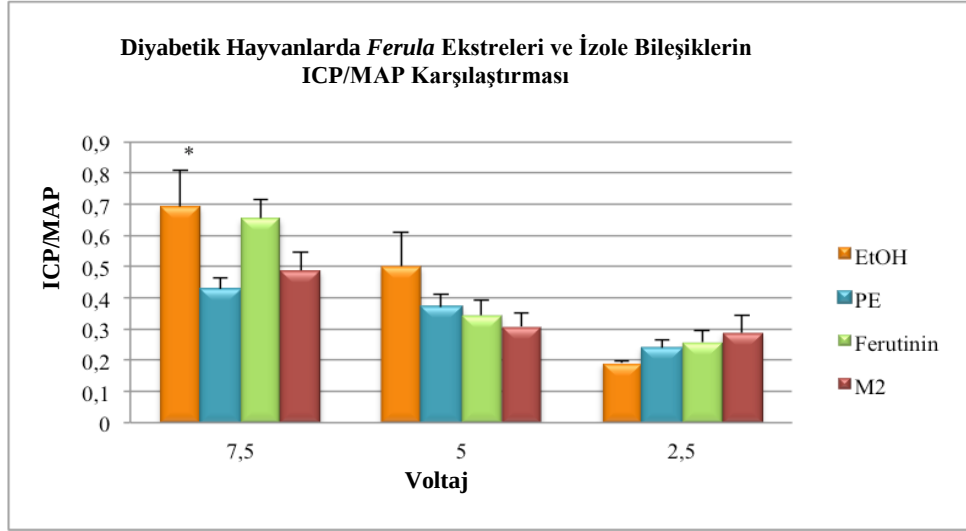
F. elaeochoytris köklerinden izole edilen **M2**'den alınan ICP/MAP verileri Şekil 3.34.'te grafik halinde verilmiştir. Kontrol grubunda kavernoza sinire 7,5 V, 5 V, ve 2,5 V düzeylerinde elektriksel alan uyarımı sonrasında 10-2 mmol/kg dozda **M2** i.k. yolla verilmiş ve tekrar aynı voltaj uygulandığında ICP/MAP değerinin düştüğü gözlenmiş, ancak ortalamalar arasındaki fark anlamlı bulunmamıştır.



Şekil 3.34. M2 için (10-2 mmol/kg) ICP/MAP bulguları. *: $p<0,05$, **: $p<0,01$, ***: $p<0,001$. “a”: diyabet+M2 ve diyabet grupları arası fark. “b”: diyabet+M2 ve kontrol+ferutinin grupları arası fark. “c”: kontrol+M2 ve kontrol grupları arası fark.

Diyabetik hayvanlarda **M2** uygulandıktan sonra hesaplanan ortalama ICP/MAP değerleri hayvanların kavernoza sinirleri 7,5 V ile uyarıldığında anlamlı bir artış göstermiştir ($p<0,05$).

Tüm ekstre ve saf maddelere ait yanıtlar alındıktan ve kendi içinde değerlendirildikten sonra birbirleri arasında da karşılaştırılmış ve Şekil 3.35.'te grafik halinde verilmiştir. Diyabetik hayvanlarda elde edilen ortalama ICP/MAP değerinin PE⇒EtOH ekstresinde PE ekstresine göre anlamlı olarak yüksek olduğu tespit edilmiştir ($p<0,05$).

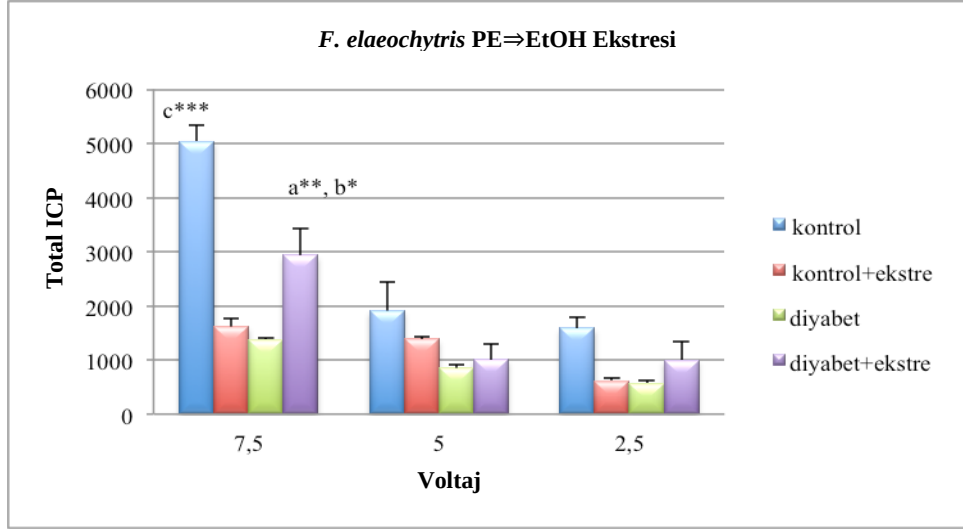


Şekil 3.35. Uygulanan ekstre ve maddelerin ICP/MAP bulgularının karşılaştırılması. *: $p < 0,05$, diyabet+PE⇒EtOH ve diyabet+PE grupları arası fark.

3.8.1.2. Toplam ICP Bulguları

Ekstreler ve saf maddelere ait toplam ICP verileri uygulanan her bir voltaj için ayrı ayrı karşılaştırılmıştır. Deneyde kontrol ve diyabet gruplarına tedavi verilmeden önce kavernoza sinire voltaj uygulanmış ve alınan yanıtlar kaydedilmiştir.

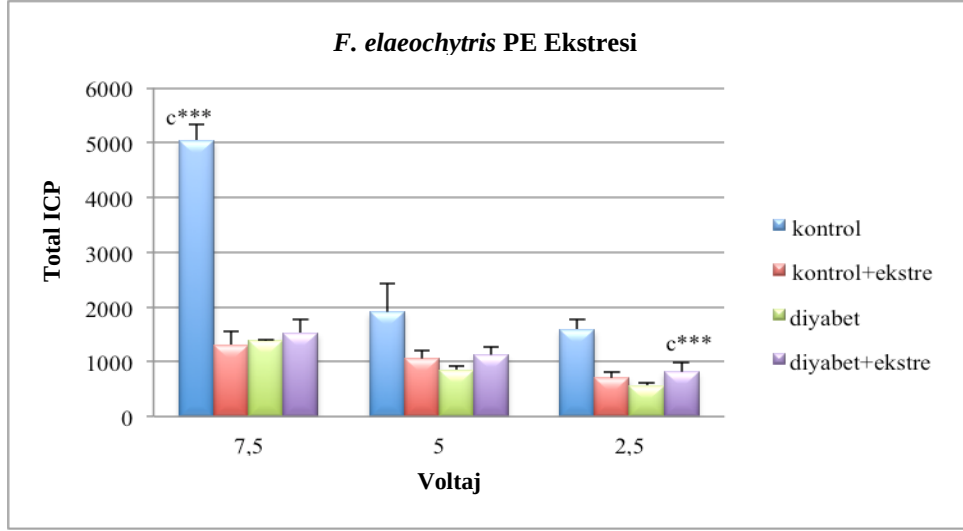
F. elaeochytris kök PE⇒EtOH ekstresinden alınan “toplam ICP” verileri Şekil 3.36.’da grafik halinde verilmiştir. Kontrol grubunda kavernoza sinire 7,5 V, 5 V, ve 2,5 V düzeylerinde elektriksel alan uyarımı sonrasında 5 mg/kg dozda *F. elaeochytris* PE⇒EtOH ekstresi i.k. yolla verilmiş ve tekrar aynı voltaj uygulandığında “toplam ICP” değerinin azaldığı gözlenmiştir. Ekstrenin verilmesi ile kontrol grubu “toplam ICP” değerlerinde meydana gelen bu fark 7,5 V uygulamasında anlamlı bulunmuştur ($p < 0,001$).



Şekil 3.36. *F. elaeochoytris* kök PE⇒EtOH ekstresi (5 mg/kg) toplam ICP bulguları. *: $p<0,05$, **: $p<0,01$, ***: $p<0,001$. “a”: diyabet+ekstre ve diyabet grupları arası fark. “b”: diyabet+ekstre ve kontrol+ekstre grupları arası fark. “c”: kontrol+ekstre ve kontrol grupları arası fark.

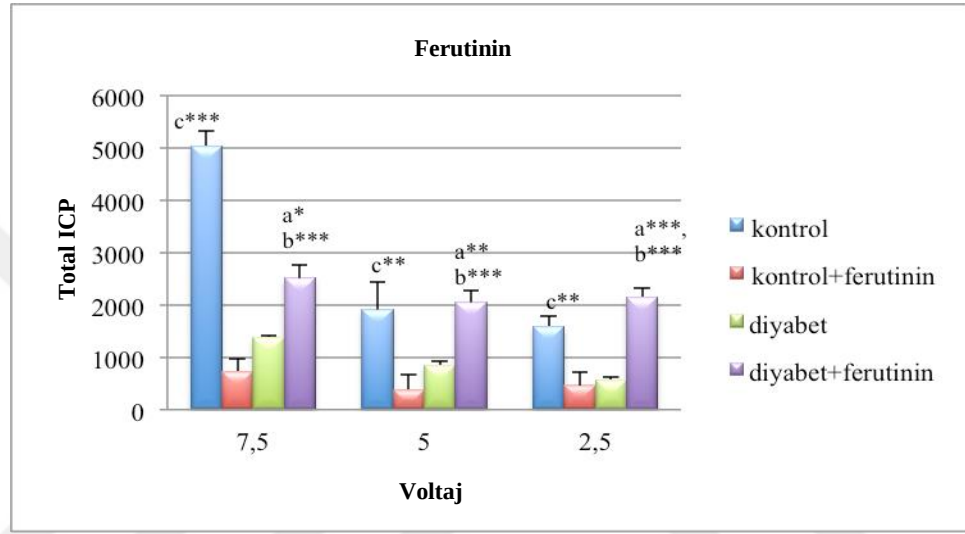
Diyabetik deney hayvanlarında ekstre uygulaması ile alınan yanıt kontrol hayvanlarına ekstre uygulamasında alınan yanıtla göre (sadece 7,5 V uygulamasında) anlamlı şekilde artış göstermiştir ($p<0,05$). Yine diyabetik hayvanlara ekstre uygulaması öncesi ölçülen toplam ICP değerleri uygulama sonrasında anlamlı artış göstermiştir ($p<0,01$).

F. elaeochoytris kök PE ekstresinden alınan toplam ICP verileri Şekil 3.37.’de grafik halinde verilmiştir. Kontrol grubunda kavernoza sinire 7,5 V, 5 V, ve 2,5 V düzeylerinde elektriksel alan uyarımı sonrasında 5 mg/kg dozda *F. elaeochoytris* PE ekstresi i.k. yolla verilmiş ve tekrar aynı voltaj uygulandığında toplam ICP değerinin düştüğü gözlenmiştir. Ekstrenin verilmesi ile kontrol grubu toplam ICP değerlerinde meydana gelen bu fark 7,5 V ($p<0,001$) ve 2,5 V ($p<0,001$) uygulamasında anlamlı bulunmuştur.



Şekil 3.37. *F. elaeoehytris* kök PE ekstresi (5 mg/kg) toplam ICP bulguları. *: $p<0,05$, **: $p<0,01$, ***: $p<0,001$. “a”: diyabet+ekstre ve diyabet grupları arası fark. “b”: diyabet+ekstre ve kontrol+ekstre grupları arası fark. “c”: kontrol+ekstre ve kontrol grupları arası fark.

F. elaeochytris köklerinden izole edilen ferutinin ile elde edilen toplam ICP verileri Şekil 3.38.'de grafik halinde verilmiştir. Kontrol grubunda kavernoza sinire 7,5 V, 5 V, ve 2,5 V düzeylerinde elektriksel alan uyarımı sonrasında ferutinin (10^{-2} M) i.k. yolla verilmiş ve tekrar aynı voltaj uygulandığında toplam ICP değerinin düştüğü gözlenmiştir. Ekstrenin verilmesi ile kontrol grubu toplam ICP değerlerinde meydana gelen bu fark tüm voltaj düzeylerinde anlamlı bulunmuştur ($p<0,01$).

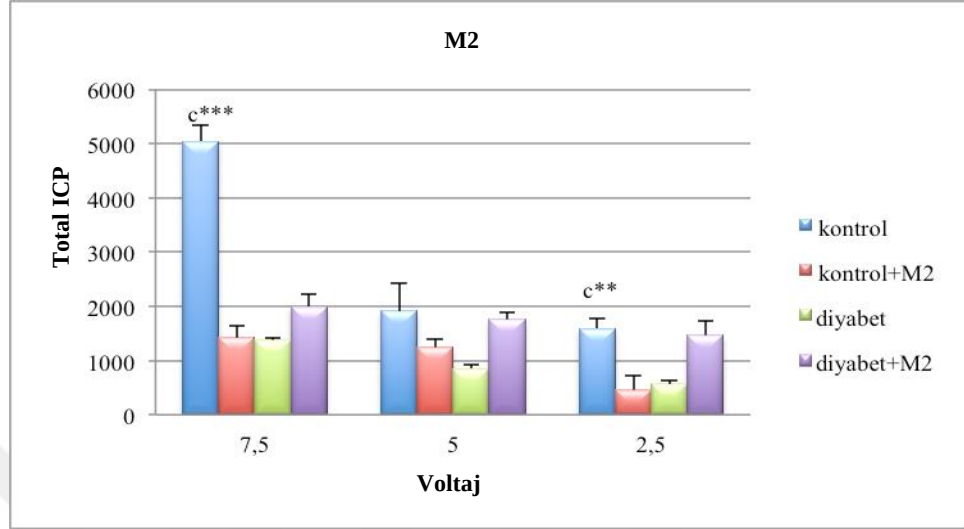


Şekil 3.38. Ferutinin için (10^{-2} mmol/kg) toplam ICP bulguları. *: $p<0,05$, **: $p<0,01$, ***: $p<0,001$. “a”: diyabet+ferutinin ve diyabet grupları arası fark. “b”: diyabet+ferutinin ve kontrol+ferutinin grupları arası fark. “c”: kontrol+ferutinin ve kontrol grupları arası fark.

Diyabetik hayvanlarda ferutinin uygulaması ile alınan yanıt kontrol hayvanlarına ferutinin uygulamasında alınan yanıtla göre her üç voltaj düzeyinde de anlamlı şekilde artmıştır ($p<0,001$). Yine diyabetik hayvanlara ekstre uygulaması öncesi ölçülen toplam ICP değerleri elektriksel alan uyarımı sonrasında anlamlı olarak artmıştır.

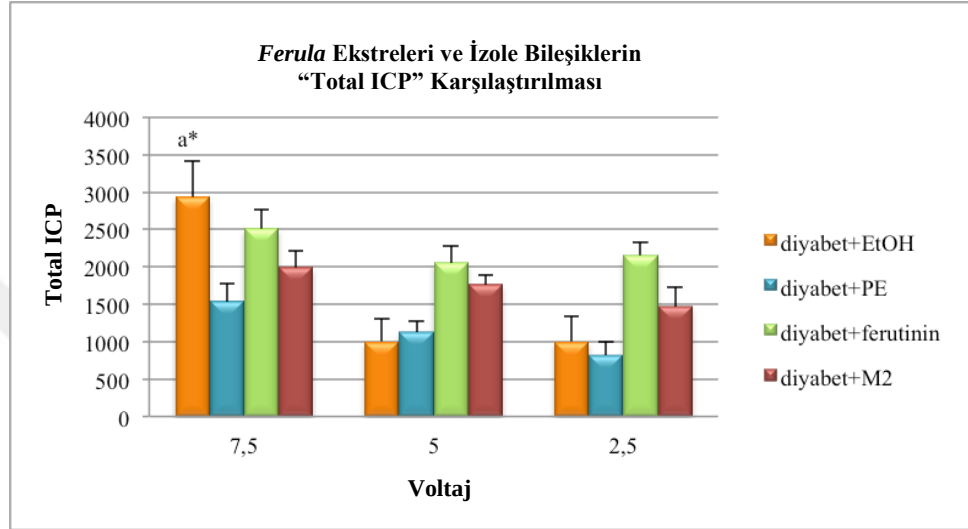
F. elaeochytris köklerinden izole edilen **M2** ile elde edilen “toplam ICP” verileri Şekil 3.39.’da grafik halinde verilmiştir. Kontrol grubunda kavernoza sinire 7,5 V, 5 V, ve 2,5 V düzeylerinde elektriksel alan uyarımı sonrasında **M2** (10^{-2} mmol/kg) i.k. yolla verilmiş ve tekrar aynı voltaj uygulandığında “toplam ICP” değerinin düştüğü gözlenmiştir. Ekstrenin verilmesi ile kontrol grubu “toplam ICP”

değerlerinde meydana gelen bu fark 7,5 V ($p<0,001$) ve 2,5 V ($p<0,01$) uygulamasında anlamlı bulunmuştur.



Şekil 3.39. M2 için (10-2 mmol/kg) “toplam ICP” bulguları. *: $p<0,05$, **: $p<0,01$, ***: $p<0,001$. “a”: diyabet+M2 ve diyabet grupları arası fark. “b”: diyabet+M2 ve kontrol+M2 grupları arası fark. “c”: kontrol+M2 ve kontrol grupları arası fark.

Tüm ekstre ve saf maddelere ait yanıtlar alındıktan ve kendi içinde değerlendirildikten sonra birbirleri arasında da karşılaştırılmış ve Şekil 3.40.'ta grafik halinde verilmiştir. Diyabetik hayvanlarda elde edilen ortalama “toplam ICP” değerinin PE⇒EtOH ekstresinde PE ekstresine göre anlamlı olarak yüksek olduğu tespit edilmiştir ($p<0,05$).



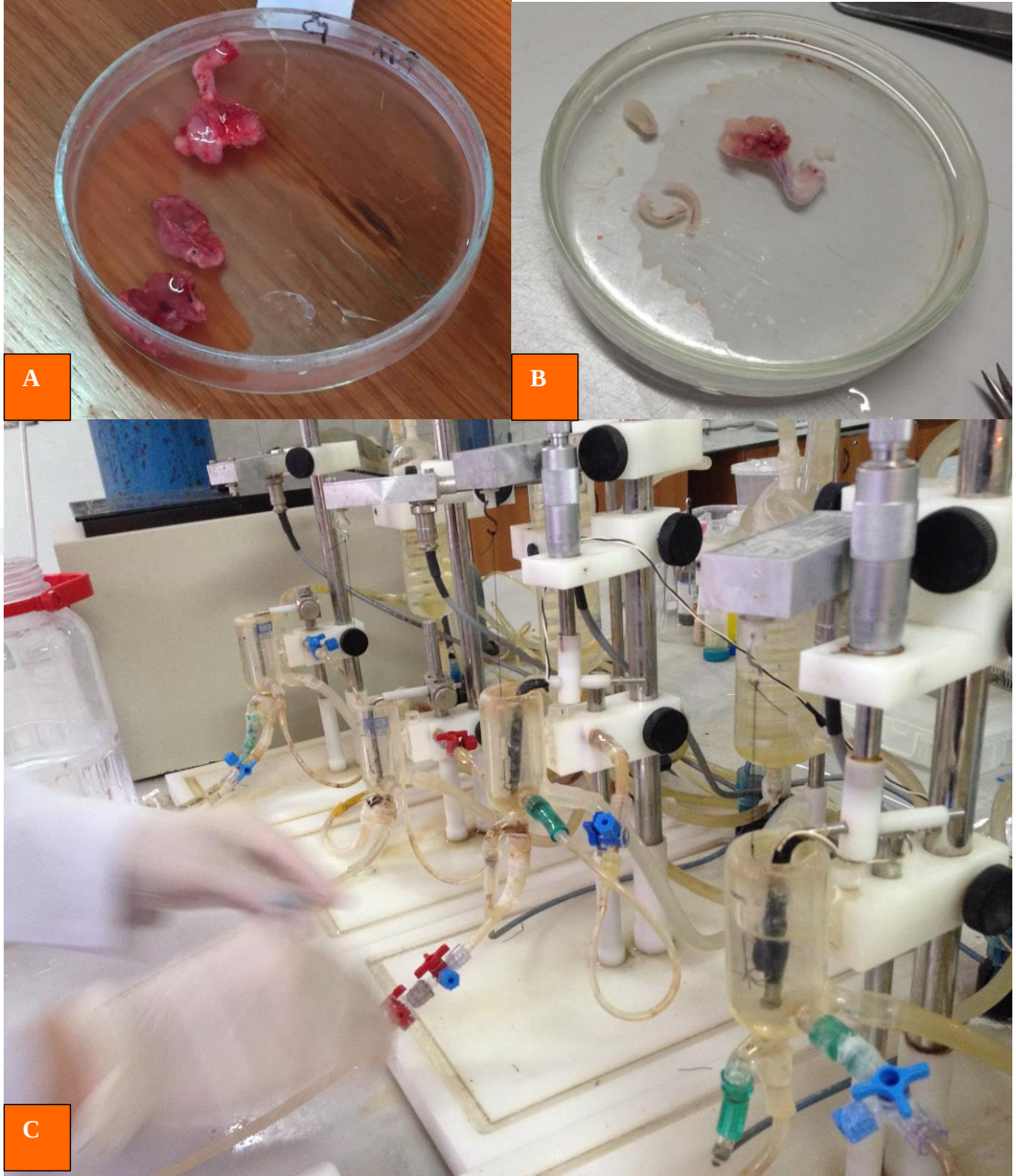
Şekil 3.40. Uygulanan ekstre ve maddelerin “toplam ICP” bulgularının karşılaştırılması. *: $p<0,05$, “a”: diyabet+PE⇒EtOH ve diyabet+PE grupları arası fark.

3.8.2. *İn vitro* Gevşeme Yanıtı Bulguları

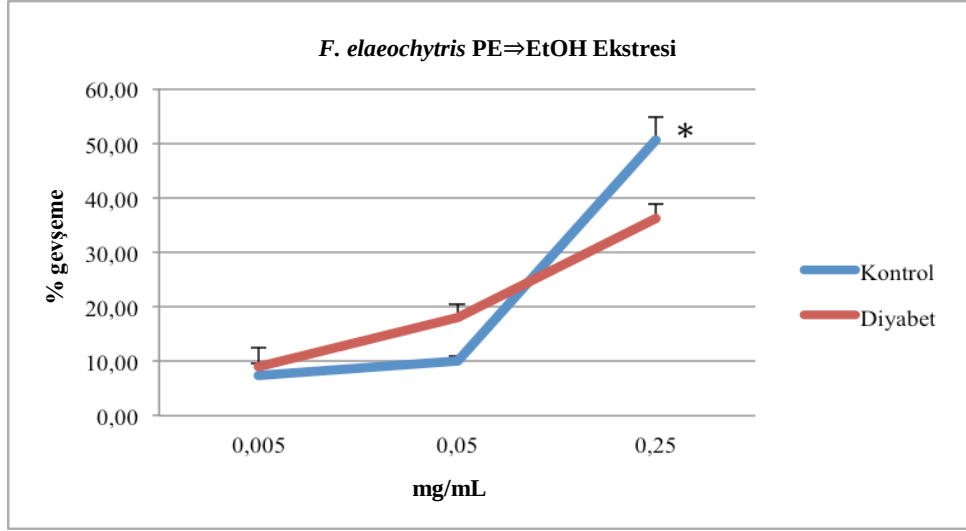
İn vitro gevşeme yanıtları için ekstreler ve izole edilen bileşiklerin üç farklı konsantrasyonları deney hayvanlarından izole edilen kavernoza dokuya uygulanmıştır (Şekil 3.42.). Ekstreler 0,005, 0,05 ve 0,25 mg/ml izole edilen bileşikler ise 10^{-5} (20 µL), 10^{-4} (200 µL) ve 5×10^{-4} M (1000 µL) konsantrasyonlarında uygulanarak gevşeme yanıtları ölçülmüştür. Ölçülen yanıtlar % gevşeme olarak aşağıdaki şekilde olduğu gibi hesaplanmıştır (Şekil 3.41.).

$$\frac{100 \times (\text{örnek} - \text{Phe})}{(\text{Phe} - \text{bazal})}$$

Şekil 3.41. *İn vitro* deneylerde % gevşeme yanıtı hesaplanması. *Phe*: fenilefrin kasılma değeri. *bazal*: dokunun başlangıçtaki kasılma değeri. *örnek*: uygulanan örneğin kasılma değeri.

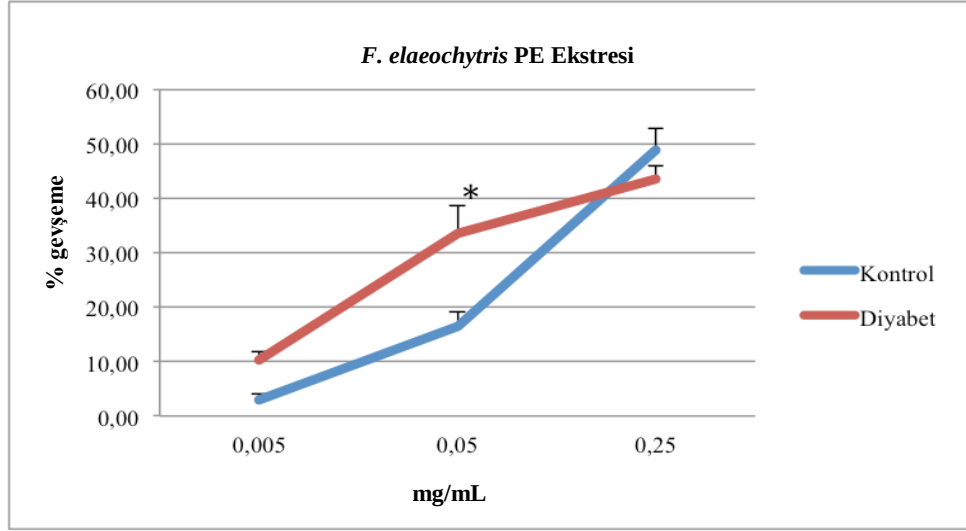


Şekil 3.42. *İn vitro* organ banyosu (C) deneyleri için çıkarılan penis dokusu (A) ve bu dokudan ayrılan k.k. dokusu (B)



Şekil 3.43. *F. elaeochoytris* kök PE⇒EtOH ekstresi *in vitro* % gevşeme yanıtı bulguları. *: $p<0,05$, **: $p<0,01$, ***: $p<0,001$.

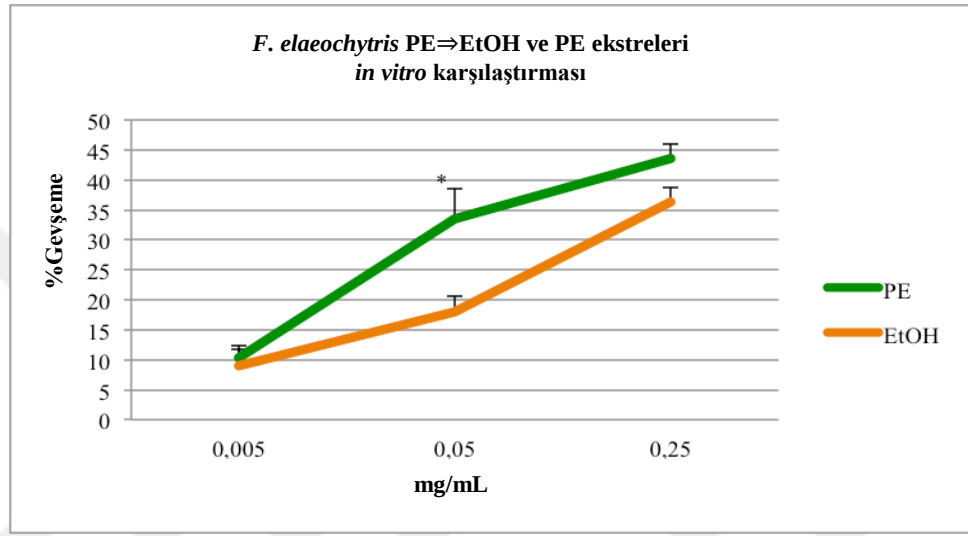
Deney hayvanlarından izole edilen kavernoza doku üzerinde *F. elaeochoytris* kök PE⇒EtOH ekstresi uygulaması ile elde edilen *in vitro* gevşeme yanıtları Şekil 3.43.'te grafik olarak verilmiştir. Kontrol grubuna ait kavernoza doku gevşeme yanıtları 0,25 g/mL konsantrasyonda diyabet grubuna göre anlamlı şekilde yüksek bulunmuştur ($p<0,05$). Diğer iki konsantrasyonda ise kontrol ve diyabet grupları arasında anlamlı bir fark gözlenmemiştir.



Şekil 3.44. *F. elaeochoytris* kök PE ekstresi *in vitro* % gevşeme yanıtı bulguları. *: $p<0,05$, **: $p<0,01$, ***: $p<0,001$.

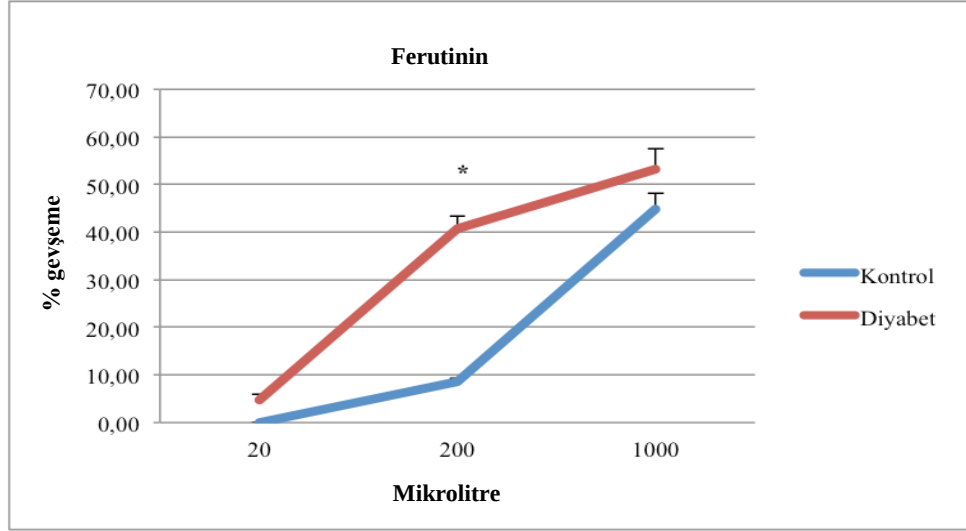
Deney hayvanlarından izole edilen kavernoza doku üzerinde *F. elaeochoytris* kök PE ekstresi uygulaması ile elde edilen *in vitro* gevşeme yanıtları Şekil 3.44.'te grafik olarak gösterilmiştir. Diyabetik grupta elde edilen kavernoza doku gevşeme yanıtları 0,05 g/mL konsantrasyonda kontrol grubuna göre anlamlı şekilde yüksek bulunmuştur ($p<0,05$). Diğer iki konsantrasyonda ise kontrol ve diyabet grupları arasında anlamlı bir fark gözlenmemiştir.

Ekstrelerden *in vitro* gevşeme yanıtları elde edildikten sonra her iki ekstrenin diyabet gruplarına ait ortalama gevşeme yanıtları da karşılaştırılmış ve Şekil 3.45.'da grafik olarak gösterilmiştir. PE ekstresinde PE⇒EtOH ekstresine göre 0,05 mg/mL konsantrasyonda daha yüksek gevşeme yanıtı alınmış ve bu fark anlamlı bulunmuştur ($p<0,05$). Diğer iki konsantrasyonda ise anlamlı bir fark gözlenmemiştir.



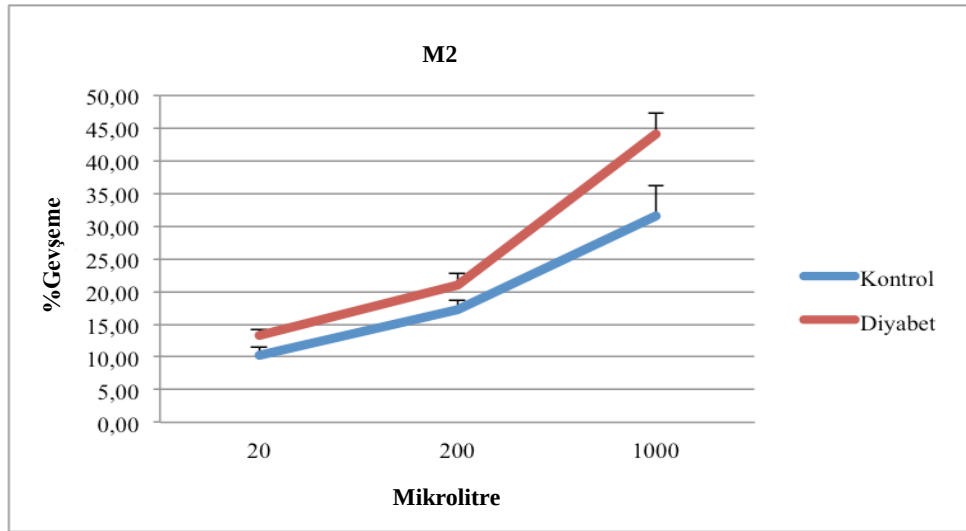
Şekil 3.45. PE⇒EtOH ve PE ekstreleri için *in vitro* % gevşeme yanıtı bulgularının karşılaştırması. *: $p<0,05$.

F. elaeochoytris köklerinden izole edilen ferutininin kavernozaal doku üzerinde oluşturduğu *in vitro* gevşeme yanıtları Şekil 3.46.'de grafik olarak verilmiştir. Diyabetik grupta elde edilen kavernozaal doku gevşeme yanıtları 10^{-4} M konsantrasyonda kontrol grubuna göre anlamlı şekilde yüksek bulunmuştur ($p<0,05$). Diğer iki konsantrasyonda ise kontrol ve diyabetik grupları arasında anlamlı bir fark gözlenmemiştir.



Şekil 3.46. Ferutinin için *in vitro* % gevşeme yanıtları. *: $p < 0,05$, **: $p < 0,01$, ***: $p < 0,001$.

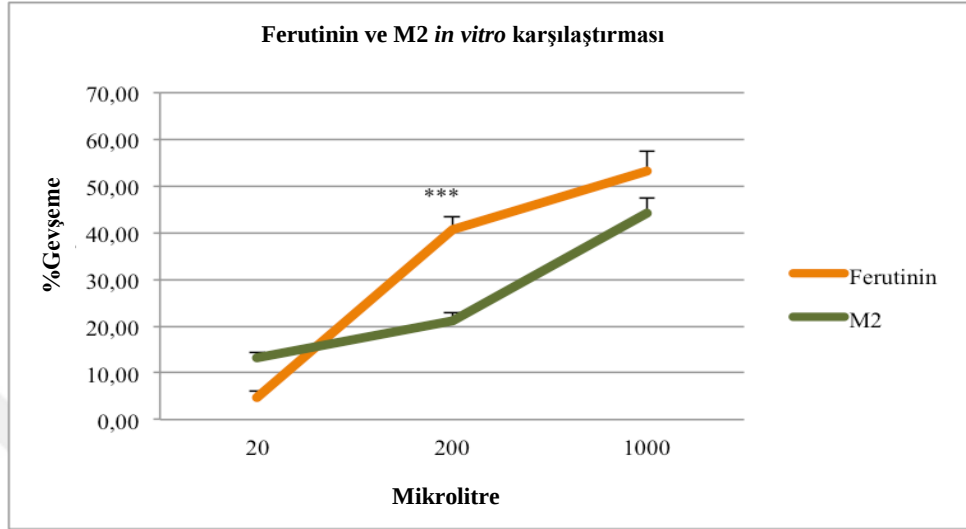
F. elaeochoytris köklerinden izole edilen M2'nin kavernozaal doku üzerinde oluşturduğu *in vitro* gevşeme yanıtları Şekil 3.47.'de grafik olarak verilmiştir. Hazırlanan hiçbir konsantrasyonda kontrol ve diyabet grupları arasında anlamlı bir fark gözlenmemiştir.



Şekil 3.47. M2 için *in vitro* % gevşeme yanıtları. *: $p < 0,05$, **: $p < 0,01$, ***: $p < 0,001$.

Ferutinin ve M2'den *in vitro* gevşeme yanıtları verileri elde edildikten sonra her iki maddenin diyabet gruplarına ait ortalama gevşeme yanıtları da karşılaştırılmış ve Şekil 3.48.'de grafik olarak gösterilmiştir. Ferutininin M2'ye göre 10^{-4} M

konsantrasyonda daha yüksek gevşeme yanıtı alınmış ve bu fark anlamlı bulunmuştur ($p<0,001$). Diğer iki konsantrasyonda ise anlamlı bir fark gözlenmemiştir.



Şekil 3.48. Ferutinin ve M2 için *in vitro* % gevşeme yanıtı bulgularının karşılaştırması. ***: $p<0,001$.

4. TARTIŞMA

4.1. Fitokimyasal Çalışmalar

Rubiolo ve ark. (2006) *F. communis* kemotipleri üzerinde yaptıkları çalışmada toksik ve non-toksik kemotiplerinin birbirinden ayrımı için analizler yapmıştır. Bu analizlerde toksik kemotipin ferulenol ve türevlerini içerirken ferutinin ve ferutinine benzer yapıdaki daukan seskiterpenleri içermediği tespit edilmiştir. Çalışmamızda incelen *F. communis* örnekleri yapılan YPSK analizlerinde kromatogramlar ilgili çalışmadaki toksik kemotipin profiline benzerlik göstermiştir. Ülkemizde *F. elaeochytris*'e göre daha geniş bir yayılım gösteren *F. communis* topladığımız bölgede tıbbi açıdan kullanılabilir bulunmamıştır.

Ferutinin *Ferula* türlerinde afrodizyak etkiden sorumlu majör bileşik olarak düşünülmektedir. Bu sebeple çalışmamızda ferutinin miktar tayini ve izolasyonu öncelikli hedef olarak belirlenmiştir.

İTK analizlerinde hekzan:EtOAc sisteminin farklı karışımları denenmiş, ancak ferutinin lekeleri yakınındaki diğer lekelerden ayıramamıştır. İTK genel olarak örneklerin kimyasal profili hakkında fikir verse de daha ayrıntılı analizler için YPSK tekniği kullanılmıştır.

YPSK yöntemi daha önce yayınlanmış bir yöntemden uyarlandığı için yöntemin uygunluğunun değerlendirilmesi için kısmi validasyon yapılması yeterli görülmüştür (Rubiolo ve ark., 2006). Yapılan validasyon testlerinde güvenilir bir YPSK yöntemi uygulandığı tespit edilmiştir.

Farklı bitki kısımlarından ve ekstrelerden yapılan YPSK analizlerinde *F. elaeochytris* köklerinin (%4,79) ve PE ekstresinin (ekstrede %29,91, drogda %3,43) en yüksek ferutinin miktarına sahip olduğu tespit edilmiştir (Çizelge 3.8. ve 3.9.). *F.*

communis subsp. *communis* köklerinde çok düşük bir ferutinin miktarı tayin edilmiştir (%0,018). Ancak *F. communis* subsp. *communis* kısımlarında ve ekstrelerinde ferulenol varlığı nedeniyle tıbbi açıdan kullanılmaması gerektiği sonucuna varılmıştır (Çizelge 3.8. ve 3.9.). Ferutinin Miski ve ark. (1983) tarafından ilk kez *F. elaeochytris* köklerinden hazırlanan hekzan ekstresinden %0,0047 verimle izole edilmiştir. Diab ve ark. (2001a) ise *F. hermonis* köklerinden diklorometan ile hazırladıkları ekstreden hareketle %10,68 verimle ferutinin izole etmeyi başarmışlardır. Bu farkın türler arasında olduğu kadar kullanılan çözücü ile de ortaya çıktığı düşünülmektedir. Daha önce YPSK yöntemi ile çözücü olarak ACN kullanılarak yapılan bir miktar tayin analizinde *F. hermonis* köklerinde %2,5 oranında ferutinin tespit edilmiştir. Yine aynı çalışmada yerel satıcılarda kapsül (%4,88), poşet çay (%4,07) ve toz (%0,99) halinde satılan ürünlerdeki ferutinin miktar tayinleri de yer almaktadır (Abourashed ve ark., 2001).

Açık kolon kromatografisini takiben OBSK uygulaması yapılmış ve ferutinin izole edilebilmiştir. Bununla beraber bir başka yoğun YPSK piki veren M2 kodlu bileşik de yine OBSK sistemiyle izole edilmiştir. Yapı tayin çalışmalarında bu bileşiğin ferutinol *p*-kumarat olduğu bulunmuştur. Ferutinol *p*-kumarat daha önce *F. rigidula*’dan izole edilmiş olup (Miski ve Jakupovic, 1990) *F. communis*’te de teşhis edilmiştir (Arnoldi ve ark., 2004). Ferutinol *p*-kumarat *F. elaeochytris*’te ise ilk defa bu tez çalışmasında tespit edilmiştir.

4.2. Biyolojik Aktivite Çalışmaları

In vivo deneylerde kontrol hayvanlarına ekstre/saf maddeler uygulandığında hem “toplam ICP” hem de ICP/MAP değerlerinin düştüğü gözlenmiştir. Diyabetik hayvanlarda ise 5 mg/kg *F. elaeochytris* PE⇒EtOH ekstresi ve ferutinin (10^{-2} mmol/kg) gruplarına ait ortalama “toplam ICP” değerleri anlamlı olarak yükselmiştir ($p<0,05$, $p<0,01$). Ekstreler ve izole bileşikler karşılaştırıldığında ise diyabetik hayvanlarda PE⇒EtOH grubu toplam ICP ortalamalarının PE grubuna göre yüksek çıktığı ve bu farkın anlamlı olduğu tespit edilmiştir. Diyabetik hayvanlarda ortalama

ICP/MAP değerleri anlamlı artışlar göstermiştir ($p<0,05$, $p<0,01$, $p<0,001$). Ekstreler ve izole bileşikler karşılaştırıldığında ise diyabetik hayvanlarda PE⇒EtOH grubundaki ortalamalarının PE grubuna göre yüksek çıktığı ve bu farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğu tespit edilmiştir. Benzer bir çalışmada 10 μ M avanafil 0,1 mL i.k. olarak STZ ile diyabet oluşturulmuş Sprague-Dawley sıçanlara verilmiştir. Diyabetik hayvanlarda ICP/MAP ve “toplam ICP” değerleri anlamlı olarak düştüğü bulunmuştur ($p<0,001$). Diyabetik hayvanlarda avanafil 7,5 V uygulamasında hem ICP/MAP ($p<0,01$), hem de “toplam ICP” ($p<0,001$) değerinde sadece voltaj uygulananlara göre anlamlı artış sağlamıştır. Çalışmada sağlıklı hayvanlara i.k. avanafil verilmemiştir (Yılmaz ve ark., 2014). Aşırı aktif mesane tedavisinde kullanılan fesoterodin, yine STZ ile diyabet oluşturulmuş Sprague-Dawley sıçanlara i.k. yolla verilmiştir. Diyabetik hayvanlarda ICP/MAP ve “toplam ICP” değerleri anlamlı olarak düşüş göstermiştir ($p<0,001$). Diyabetik hayvanlarda fesoterodin 7,5 V uygulamasında hem “toplam ICP” hem de ICP/MAP değerinde sadece voltaj uygulananlara göre artış sağlamış, ancak anlamlı bir fark oluşmamıştır (Yılmaz-Oral ve ark., 2017).

In vitro deneylerde alınan gevfeme yanıtlarına bakıldığında tüm gruplarda gevfeme yanıtlarında doza bağlı artış gözlenmiştir. Kontrol gruplarıyla karşılaştırıldığında diyabetik dokuya uygulanan PE ekstresi 1 mg ve ferutinin (10^{-4} M) konsantrasyonunda alınan gevfeme yanıtları ortalamasının anlamlı olarak yüksek olduğu tespit edilmiştir. Yine 1 mg uygulanan PE ekstresi PE⇒EtOH ekstresine göre, anlamlı olarak daha yüksek ortalama gevfeme yanıtı vermiştir. 10^{-4} M Konsantrasyonda alınan ortalama gevfeme yanıtlarının ferutininde ferutanol *p*-kumarata göre anlamlı olarak arttığı bulunmuştur. *Epimedium* türlerinden izole edilen ikariin isimli bileşiğin Phe ile karşıtırılmış tavşan KK dokusu üzerindeki gevfeme etkisi araştırılmıştır. Ayrıca PDE-5 üzerindeki inhibitör etkisi sildenafil ve papaverin ile de karşılaştırılarak *in vitro* olarak incelenmiştir. İkariinin kavernozaal düz kas dokusuna uygulanan 10^{-6} M (%1,02) 10^{-5} M (%4,93) ve 10^{-4} M (%23,23) konsantrasyonlarında gevfeme yanıtı alınmıştır (Xin ve ark., 2001). Hatay’dan toplanan *Ferulago syriaca* köklerinden hazırlanan sulu ekstre fenilefrin ile karşıtırılmış insan KK dokusu üzerindeki gevfeme etkileri *in vitro* organ banyosunda

araştırılmıştır. Ekstre dokulara 1,8, 3,6, 5,4 ve 9 mg dozlarında uygulanmış ve doza bağlı gevşeme yanıtları alınmıştır (Sırasıyla %17, %41, %61 ve %87) (Ozturk ve ark., 2012). *Punica granatum* meyve suyu konsantresi (NS) ve majör fenoliklerinden EA izole organ banyosunda KK dokusu üzerinde gevşetici etkisi araştırılmıştır. Organ banyosunda 100 µL NS uygulamasında %94'lük bir gevşeme yanıtı alınmış olup 10^{-3} M EA uygulaması neticesinde %51'lik bir gevşeme yanıtı alınmıştır. Çalışmada YPSK kullanılarak NS içinde bulunan EA miktarı da tayin edilmiştir. NS'da ölçülen EA miktarından hareketle EA'in tahmini olarak NS etkinliğinin %13'ünden sorumlu olduğu belirtilmiştir (Oztekin ve ark., 2014).

İn vitro organ banyosu deneylerinde elde ettiğimiz bulgulara diyabetik hayvandan alınan dokuda 5 mg PE⇒EtOH ekstresinden %36,23, PE ekstresinden ise %43,48 ortalama gevşeme yanıtı alınmıştır. 5×10^{-4} M ferutinin ve ferutinol *p*-kumarat uygulamasında ise sırasıyla %53,09 ve %44,13 arasında ortalama gevşeme yanıtı alınmıştır. PE⇒EtOH ve PE ekstrelerinde YPSK yöntemi ile ölçülen ferutinin miktarı ise sırasıyla %12,8670 ve %29,9088 olarak ölçülmüştür.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Dünya üzerinde 150'nin üzerinde türe sahip olan *Ferula* cinsine ait taksonlar geleneksel olarak bir çok hastalığın tedavisi amacıyla kullanılmıştır. Bunlar arasında afrodizyak etki öne çıkan etkilere biridir. Tez çalışmamızın konusunu oluşturan *F. elaeochytris*'in afrodizyak olarak ülkemizde halk arasında kullanımı bilinmektedir (Baytop, 1999). Ancak yetiştiği bölgede sınırlı yetişmesi ve güvenlik riskleri barındırması ülkemizde daha yaygın bir alanda yetişen *F. communis* subsp. *communis*'in de afrodizyak olarak potansiyelini tez çalışmamızda değerlendirmek fikrini doğurmuştur. Ancak toplanan *F. communis* subsp. *communis* örneğinde yapılan YPSK analizlerinde başta ferutinin olmak üzere daukan türevi bileşiklerin çok düşük miktarlarda olması ve kumarin türevi ferulenole rastlanması bitkinin kullanımının güvenli olmayacağını göstermiştir. Bu nedenle ülkemizde yetişen *Ferula* taksonları üzerinde kapsamlı bir toksisite çalışmasına ihtiyaç duyulmaktadır.

F. elaeochytris üzerinde yapılan fitokimyasal çalışmalar YPSK, izolasyon ve yapı tayini olarak üç başlık altında gerçekleştirilmiştir.

YPSK analizleri, Rubiolo ve ark. (2006)'nın daha önce yayınlamış olduğu yöntemin modifiye edilmesi ile yapılmıştır. Modifikasyonun valide edilmesi için gerekli testler yapılmış ve ileride yapılacak çalışmalar için güvenilir bir ferutinin miktar tayin yöntemi elde edilmiştir. Bu yöntem ile elde edilen veriler daha sonra yapılması halinde, bitkiden standardize ekstre hazırlanması çalışmalarında kullanılmak üzere değerlendirilebilecektir.

Ferutininin izolasyonundaki amacımız standart olarak dışarıdan temininin yüksek maliyetli olması ve hayvan deneyleri için ferutinin sağlanması olmuştur. Bununla beraber açık kolon kromatografisi uygulamasında YPSK analizlerinde göze çarpan ve M2 kodu verilen pikin de izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Gerek ferutinin gerekse M2 kodlu bileşiğin yapı tayin çalışmaları KS ve NMR teknikleri uygulanarak gerçekleştirilmiştir. Her ne kadar elimizde satın alınmış standart

ferutinin bulunsa da izole edilen ferutininin yapı tayininin yapılması bitkide yapılan YPSK miktar tayin çalışmalarında teşhisi destekleyen veri elde etmemizi de sağlamıştır. Ayrıca M2'nin yapısının aydınlatılmasına da doğrudan katkı sağlamıştır.

M2 bileşiğinin yapı tayin çalışmalarında ^1H -NMR ve ^{13}C -NMR spektrumları ferutinin ile benzerlik göstermektedir. Ana yapının her iki bileşikte de ferutanol olduğu belirlenmiş ve ana yapıya 6. konumdan süstitüe aromatik yapının belli farklılıklar içerdiği gözlemlenmiştir. HSQC, HMBC ve KS tekniklerinin de yardımıyla M2 bileşiğinin ferutanol *p*-kumarat olduğu anlaşılmıştır.

Yapılan testler ve analizler neticesinde *F. elaeochytris* bitkisinin ED tedavisinde kavernoza doku üzerinden etkisi olabileceği gözlenmiş ve etkiden sorumlu majör bileşiğin literatürde belirtildiği gibi ferutinin olabileceği görülmüştür. *In vivo* deneylerde ferutinin ve PE⇒EtOH ekstresi arasında anlamlı bir fark gözlenmemiştir. Sağlıklı hayvanlarda ekstre ve izole bileşik uygulandığında etkinin anlamlı olarak düşmesi daha ayrıntılı çalışmaların yapılması gerekliliğini doğurmuştur. YPSK analizlerinde PE ekstresinin PE⇒EtOH ekstresinden daha fazla ferutinin içerdiği tespit edilmiştir. Fakat *in vivo* çalışmalarda PE⇒EtOH ekstresine ait sonuçlar PE ekstresine göre anlamlı şekilde daha yüksek çıkmıştır. *In vitro* deneylerde ise PE ekstresi PE⇒EtOH ekstresine göre 1 mg'lık uygulamada anlamlı olarak daha yüksek gevşeme yanıtı oluşturmuştur. *In vitro* deneylerde ferutinin ve PE ekstresi arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır. Bu durum kimyasal bileşimdeki farklılıklarla açıklanabilir. Bu farklılıklar ise ekstreler içinde etki farkı yaratacak farklı kimyasalların olduğuna işaret etmektedir. Bu nedenle sonraki çalışmalarda daha ayrıntılı izolasyon ve biyolojik aktivite çalışmaları yapılması gerekmektedir.

ED tedavisinde oral PDE-5 inhibitörlerinin keşfi her ne kadar büyük bir çığır açmış olsa da tedavideki başarı oranının %70-80'lerde oluşu nedeniyle yeni etken madde arayışları devam etmektedir. Bu tez çalışması kapsamında *F. elaeochytris* üzerinde yapılmış olan gerek fitokimyasal araştırmalar, gerekse biyolojik testler bu bitki ve ana bileşeni olan ferutininin ED tedavisinde bir seçenek olma potansiyelini göstermesi açısından önemli bulgular içermektedir. Bununla birlikte ferutinin ve

benzer yapıdaki daukan esterlerinin fitoöstrojen yapısında olmaları, bazı *Ferula* taksonlarının kumarin türevleri içermesi gibi durumlar yan etki ve güvenlik açısından soru işaretleri barındırmaktadır. Bu nedenle başta *F. elaeochytris* olmak üzere *Ferula* türleri üzerinde kapsamlı farmakolojik ve toksikolojik testlerin yapılması halk sağlığı açısından büyük önem taşımaktadır.



ÖZET

***Ferula elaeochytris* Korovin ve *Ferula communis* L. Bitkilerinin Farmakognozik Açıdan Araştırılması ve *Ferula elaeochytris* Korovin Bitkisinden Hazırlanan Ekstrelerin Eretil Disfonksiyon Üzerinde Etkisinin *İn Vivo* ve *İn Vitro* Araştırılması**

Ülkemizde ve dünyada gün geçtikçe artan bir şekilde bitkiler ve bitkilerden hazırlanan ürünler çeşitli hastalıkların tedavisinde kullanılmaktadır. Ancak yetkin olmayan, bilgisiz kişilerin fırsatçılıkları ve internet üzerinden satışlarla birlikte ortaya çıkan bilgi kirliliği tıbbi amaçlı bitki kullanımında bilimsel bilginin önemini daha da artırmaktadır. Bu doğrultuda öncelikle ülkemizde yetişen ve cinsel güç artırmak amacıyla halk ilacı olarak yaygın bir şekilde kullanılan *F. elaeochytris* ve doğal habitat olarak daha geniş alana yayılan ve kültüre elverişlilik açısından önem teşkil eden *F. communis* bitkilerinin toprakaltı kısımlarının potansiyelleri fitokimyasal olarak değerlendirilmiştir. Ayrıca *F. elaeochytris* bitkisinin toprak altı kısımları biyoaktivite yönünden (*in vitro* ve *in vivo* testlerle) değerlendirilmiştir. Ferutin *Ferula* türlerinin afrodizyak etkisinden sorumlu majör bileşik olarak düşünülmektedir. YPSK ile yapılan miktar tayini analizlerinde *F. elaeochytris* köklerinin %4,79 oranında ferutin içerdiği ve bu madde açısından zengin bir kaynak olduğu bulunmuştur. *F. communis* köklerinde ise %0,018 ferutin bulunduğ u tespit edilmiştir. Ancak YPSK ile kumarin türevi olan ferulenolun varlığının tespit edilmesi *F. communis*'in toksik olabileceğini düşündürmektedir. *F. elaeochytris* köklerinden ferutin ve ferutinol *p*-kumarat izole edilmiş ve yapı tayinleri KS ve NMR teknikleri ile gerçekleştirilmiştir. Daha önce *F. rigidula* ve *F. communis*'te tespit edilen ferutinol *p*-kumarat, *F. elaeochytris* köklerinden ilk kez izole edilmiştir. *F. elaeochytris* köklerinden hazırlanan PE ve PE⇒EtOH ekstraktları ve köklerden izole edilen ferutin ve ferutinol *p*-kumarat sağlıklı ve STZ ile diyabet oluşturulmuş Sprague-Dawley sıçanlarına intrakavernoza l yolla verilerek ED üzerindeki etkileri araştırılmıştır. Yine deney hayvanlarından çıkarılan kavernoza l dokulardan *in vitro* organ banyosunda alınan gevşeme yanıtları değerlendirilmiştir. Bu çalışmada *F. elaeochytris* üzerinde yapılmış olan gerek fitokimyasal araştırmalar, gerekse biyolojik testler bu bitki ve ana bileşeni olan ferutin ED tedavisinde bir seçenek olma potansiyelini göstermesi açısından önemli bulgular içermektedir.

Anahtar Sözcükler: *Ferula elaeochytris*, *Ferula communis*, Ferutin, Ferutinol *p*-kumarat, Eretil Disfonksiyon.

SUMMARY

Pharmacognostic Investigation of *Ferula elaeochytris* Korovin and *Ferula communis* L. and *In vivo* and *In vitro* Investigation the Effect of Extracts Prepared from *Ferula elaeochytris* Korovin on Erectile Dysfunction

In our country and in the world, plants and herbal products are increasingly used in the treatment of various diseases. However, the opportunism of inexperienced and unknowledgeable people and the information pollution that occurs with sales on the internet increases the importance of scientific knowledge in the use of medicinal plants. In this direction, the potentials of the underground parts of *F. elaeochytris*, which is widely used as a folk medicine to enhance sexual power and grows naturally in our country and *F. communis* which spread to a wider area as a natural habitat and which is important for cultural convenience, were investigated by phytochemical methods. Also the underground parts of *F. elaeochytris* was investigated by bioactivity tests (*in vivo* and *in vitro*). Ferutinin is thought to be the major compound responsible for the aphrodisiac effect of *Ferula* species. In quantitative HPLC analysis, *F. elaeochytris* roots were found to contain 4,79% ferutinin and to be a rich source of ferutinin. It was found that 0.018% ferutinin was present in *F. communis* roots. However, the detection of the presence of the coumarin derivative ferulenol by HPLC suggests that *F. communis* may be toxic. Ferutinin and ferutininol *p*-coumarate were isolated from the roots of *F. elaeochytris* and their structure was determined by MS and NMR techniques. Ferutininol *p*-coumarate, which was previously detected in *F. rigidula* and *F. communis*, was isolated for the first time from the roots of *F. elaeochytris*. The effects on the ED of PE and PE⇒EtOH extracts prepared from the roots of *F. elaeochytris* and ferutinin and ferutininol *p*-coumarate isolated from the roots of *F. elaeochytris* were investigated intracavernosally on healthy and STZ-induced diabetic Sprague-Dawley rats. In addition, relaxation responses from the cavernosal tissues isolated from the experimental animals in *in vitro* organ bath were evaluated. In this study, both phytochemical studies and biological tests on *F. elaeochytris* and ferutinin includes important findings that this plant and its major component ferutinin, have the potential to be an alternative for the treatment of ED.

Anahtar Sözcükler: *Ferula elaeochytris*, *Ferula communis*, Ferutinin, Ferutininol *p*-coumarate, Erectile Dysfunction.

KAYNAKLAR

- ABOURASHED EA, GALAL AM, EL-FERALY FS, KHAN IA (2001). Separation and quantification of the major daucane esters of *Ferula hermonis* by HPLC. *Planta Medica*, **67**: 681-682.
- ABU-ZATION AS (2010). Anti-diabetic activity of *Ferula asafoetida* extract in normal and alloxan-induced diabetic rats. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, **13(2)**: 97-100.
- AHMED AA (1999). Sesquiterpene coumarins and sesquiterpenes from *Ferula sinaica*. *Phytochemistry*, **50**: 109-112.
- AHMED AA, EL-RAZEK MH, NASSAR MI, IZUMI S, OHTA S, HIRATA T (2001). An eudesmanolide and a carotane from *Ferula sinaica*. *Phytochemistry*, **57**: 513-515.
- AL-JA'FARI AH, VILA R, FREIXA B, COSTA J, CAÑIGUERAL S (2013). Antifungal compounds from the rhizome and roots of *Ferula hermonis*. *Phytotherapy Research*, **27(6)**: 911-915.
- ANDERSSON KE (2001). Pharmacology of penile erection. *Pharmacological Reviews*, **53**: 417-450.
- APPENDINO G, JAKUPOVIC J, ALLOATTI S, BALLERO M (1997). Daucane esters from *Ferula arrigonii*. *Phytochemistry*, **45(8)**: 1639-1643.
- APPENDINO G, MAXIA L, BASCOPE M, HOUGHTON PJ, SANCHEZ-DUFFHUES G, MUÑOZ E, STERNER O (2006). A meroterpenoid NF- κ B inhibitor and drimane sesquiterpenoids from asafetida. *Journal of Natural Products*, **69(7)**: 1101-1104.
- ARNOLDI L, BALLERO M, FUZZATI N, MAXIA A, MERCALLI E, PAGNI L (2004). HPLC-DAD-MS identification of bioactive secondary metabolites from *Ferula communis* roots. *Fitoterapia*, **75(3-4)**: 342-354.
- BALDEMİR A, COŞKUN M, YILDIZ S (2006). Antimicrobial activity of *Ferula halophila* Peşmen. *FABAD Journal of Pharmaceutical Sciences*, **31**: 57-61.
- BAYTOP T (1999). Türkiye’de Bitkilerle Tedavi (Geçmişte ve Bugün), 2. Baskı, İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri.(s.: 248-249).
- BOCCA C, GABRIEL L, BOZZO F, MIGLIETTA A (2002). Microtubule-interacting activity of the prenylated coumarin ferulenol. *Planta Medica*, **68**: 1135-1137.

- BÜYÜKTUNCER Z, BAŞARAN AA (2005). Fitoöstrojenler ve sağlıklı yaşamdaki yerleri. *Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Dergisi*, **25(2)**: 79-94.
- CAPPELLERI JC, ROSEN RC (2005). The Sexual Health Inventory for Men (SHIM): a 5-year review of research and clinical experience. *International Journal of Impotence Research*, **17(4)**: 307-319.
- CHEN KK, CHIU JH (2006). Effect of *Epimedium brevicornum* Maxim extract on elicitation of penile erection in the rat. *Urology*, **67(3)**: 631-635.
- COLMAN-SAIZARBITORIA T, BOUTROS P, AMESTY A, BAHSAS A, MATHISON Y, GARRIDO MDEL R, ISRAEL A (2006). Ferutinin stimulates nitric oxide synthase activity in median eminence of the rat. *Journal of Ethnopharmacology*, **106(3)**: 327-332.
- DEHPOUR AA, EBRAHIMZADEH MA, FAZEL NS, MOHAMMAD NS (2009). Antioxidant activity of the methanol extract of *Ferula assafoetida* and its essential oil composition. *Grasas y Aceites*, **60(4)**: 405-412
- DIAB Y, DOLMAZON R, BESSIERE J-M (2001a). Daucane aryl esters composition from the Lebanese *Ferula hermonis* Boiss. (zallooh root). *Flavour and Fragrance Journal*, **16**: 120-122.
- DIAB Y, DOLMAZON R, FENET B (2001b). 2,3- α -Epoxyjaeschkeanadiol 5-benzoate from *Ferula hermonis* Boiss. *Flavour and Fragrance Journal*, **16(6)**: 397-400.
- EL-THAHER TS, MATAKA KZ, TAHA HA, BADWAN AA (2001). *Ferula harmonis* 'zallouh' and enhancing erectile function in rats: efficacy and toxicity study. *International Journal of Impotence Research* **13**: 247-251.
- FATEHI M, FARIFTEH F, FATEHI-HASSANABAD Z (2004). Antispasmodic and hypotensive effects of *Ferula asafoetida* gum extract. *Journal of Ethnopharmacology*, **91(2-3)**: 321-324.
- FINK HA, MAC DONALD R, RUTKS IR, NELSON DB, WILT TJ (2002). Sildenafil for male erectile dysfunction A systematic review and meta-analysis. *Archives of Internal Medicine*, **162**: 1349-1360.
- GALAL AM, ABOURASHED EA, ROSS SA, EL-SOHLI MA, AL-SAID M, EL-FERALY FS (2001). Daucane Sesquiterpenes from *Ferula hermonis*. *Journal of Natural Products*, **64**: 399-400.

- GANDAGLIA G, BRIGANTI A, JACKSON G, KLONER RA, MONTORSI F, MONTORSI P, VLACHOPOULOS C (2014). A systematic review of the association between erectile dysfunction and cardiovascular disease. *European Urology*, **65**(5): 968-978.
- GARG SN, AGRAWAL SK (1988). Further new sesquiterpens from *Ferula jaeschkeana*. *Journal of Natural Products*, **51**(4): 771-774.
- GEROUSHI A, AUZI AA, ELHWUEGI AS, ELZAWAM F, ELSHERIF A, NAHAR L, SARKER SD (2011). Antiinflammatory sesquiterpenes from the root oil of *Ferula hermonis*. *Phytotherapy Research*, **25**(5): 774-777.
- GHISALBERTI EL (1994). The daucane (carotane) class of sesquiterpenes. *Phytochemistry*, **37**(3): 597-623.
- GREIGE-GERGES H, DIAB Y, FARAH J, MAGDALOU J, HADDAD C, OUAINI N (2008). Ferutinin stability in human plasma and interaction with human serum albumin. *Biopharmaceuticals & Drug Disposition*, **29**(2): 83-89.
- GUR S, KADOWITZ PJ, GURKAN L, CHANDRA S, DEWITT SY, HARBIN A, SIKKA SC, AGRAWAL KC, HELLSTROM WJ (2010). Chronic inhibition of nitric-oxide synthase induces hypertension and erectile dysfunction in the rat that is not reversed by sildenafil. *British Journal of Urology International*, **106**(1): 78-83.
- GÜNER A (2012). Türkiye Bitkileri Listesi (Damarlı Bitkiler), Ed: Güner, A. İstanbul: ANG Vakfı - Nezahat Gökyiğit Botanik Bahçesi. (s.: 61-62).
- HADIDI KA, ABURJAI T, BATTAH AK (2003). A comparative study of *Ferula hermonis* root extracts and sildenafil on copulatory behaviour of male rats. *Fitoterapia*, **74**(3): 242-246.
- HATZIMOURATIDIS K, GIULIANO F, MONCADA I, MUNEER A, SALONIA A, VERZE P. (2016). EAU Guidelines on Erectile Dysfunction, Premature Ejaculation, Penile Curvature and Priapism. Erişim: [<https://uroweb.org/wp-content/uploads/EAU-Guidelines-Male-Sexual-Dysfunction-2016-3.pdf>] Erişim Tarihi: [23.01.2018]
- HERRNSTADT I, HEYN CC (1972). Flora of the Turkey and the East Aegean Islands, Ed: Davis, P. H. Vol. 4. Edinburgh: University Press (s.: 382-388).
- IBRAHEIM ZZ, ABDEL-MAGEED WM, DAI H, GUO H, ZHANG L, JASPARS M (2012). Antimicrobial antioxidant ducaene sesquiterpenes from *Ferula hermonis* Boiss. *Phytotherapy Research*, **26**: 579-589.

- ICH (1994). Harmonised Tripartite Guideline prepared within the Third International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for the Registration of Pharmaceuticals for Human Use, Text on Validation of Analytical Procedures Q2 (R1). Erişim: [\[http://www.dl.icdst.org/pdfs/files/22ee8b155e65fc820ff74677d7819ec9.pdf\]](http://www.dl.icdst.org/pdfs/files/22ee8b155e65fc820ff74677d7819ec9.pdf). Erişim Tarihi: [21.07.2017]
- IKEDA K, ARAO Y, OTSUKA H, NOMOTO S, HORIGUCHI H, KATO S, KAYAMA F (2002). Terpenoids found in the Umbelliferae family act as agonists/antagonists for ER α and ER β : differential transcription activity between ferutinine-liganded ER α and ER β . *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **291(2)**: 354-360.
- KASSIS E, FULDER S, KHALIL K, HADIEH B, NAHHAS F, SAAD B, SAID O (2009). Efficacy and safety assessments of *Ferula assa-foetida* L., traditionally used in greco-arab herbal medicine for enhancing male fertility, libido and erectile function. *The Open Complementary Medicine Journal*, **1**: 102-109.
- KESHRI G, BAJPAI M, LAKSHMI V, SETTY BS, GUPTA G (2004). Role of energy metabolism in the pregnancy interceptive action of *Ferula assafoetida* and *Melia azedarach* extracts in rat. *Contraception*, **70(5)**: 429-432.
- KIRBY RS (2004). Erektıl Disfonksiyon Atlası Ed: Kirby, R. S. 2. Baskı. London: The Parthenon Pulishing Group (Türkçe Çeviri: Ayaz, O.).
- LEE C-L, CHIANG L-C, CHENG L-H, LIAW C-C, EL-RAZEK MH, CHANG F-R, WU Y-C (2009). Influenza A (H1N1) antiviral and cytotoxic agents from *Ferula assa-foetida*. *Journal of Natural Products*, **72**: 1568-1572.
- MALLIKARJUNA GU, DHANALAKSHMI S, RAISUDDIN S, RAO AR (2003). Chemomodulatory influence of *Ferula asafoetida* on mammary epithelial differentiation, hepatic drug metabolizing enzymes, antioxidant profiles and N-methyl-N-nitroso-urea-induced mammary carcinogenesis in rats. *Breast Cancer Research and Treatment*, **81(1)**: 1-10.
- MARCHI A, APPENDINO G, PIRISI I, BALLERO M, LOI MC (2003). Genetic differentiation of two distinct chemotypes of *Ferula communis* (Apiaceae) in Sardinia (Italy). *Biochemical Systematics and Ecology*, **31(12)**: 1397-1408.
- MCMAHON CG (2002). High dose sildenafil citrate as salvage therapy for severe erectile dysfunction. *International Journal of Impotence Research*, **14(6)**: 533-538.
- MISKI M, JAKUPOVIC J (1990). Daucane esters from *Ferula rigidula*. *Phytochemistry*, **29(1)**: 173-178.

- MISKI M, MARBY T (1986). New daucane esters from *Ferula tingitana*. *Journal of Natural Products*, **49(4)**: 657-660.
- MISKI M, MARBY TJ (1985). Daucane esters from *Ferula communis* subsp. *communis*. *Phytochemistry*, **24(8)**: 1735-1741.
- MISKI M, ULUBELEN A (1984). A New sesquiterpene ester from *Ferula tingitana*. *Tetrahedron*, **40(24)**: 5197-5201.
- MISKI M, ULUBELEN A, MARBY TJ (1983). Six sesquiterpene alcohol esters from *Ferula elaeochytris*. *Phytochemistry*, **22(10)**: 2231-2233.
- MOTAI T, KITANAKA S (2006). Sesquiterpenoids from *Ferula fukanensis* and their inhibitory effects on nitric oxide production. *Journal of Natural Medicines*, **60(1)**: 54-57.
- NAZARI ZE, IRANSHAHI M (2011). Biologically active sesquiterpene coumarins from *Ferula* species. *Phytotherapy Research*, **25(3)**: 315-323.
- OUGHLISSI-DEHAK K, LAWTON P, MICHALET S, BAYET C, DARBOUR N, HADJ-MAHAMMED M, BADJAH-HADJ-AHMED YA, DIJOUX-FRANCA MG, GUILLET D (2008). Sesquiterpenes from aerial parts of *Ferula vesceritensis*. *Phytochemistry*, **69(9)**: 1933-1938.
- OZTEKIN CV, GUR S, ABDULKADIR NA, KARTAL M, KARABAKAN M, AKDEMIR AO, GOKKAYA CS, CETINKAYA M (2014). Analysis of pomegranate juice components in rat corpora cavernosal relaxation. *International Journal of Impotence Research*, **26(2)**: 45-50.
- OZTURK B, GUR S, COSKUN M, KOSAN M, ERDURAK CS, HAFEZ G, GONULALAN U, CETINKAYA M (2012). A new relaxant on human corpus cavernosum: *Ferulago syriaca* root extract. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology*, **6(37)**: 2652-2656.
- PATEL D, KUMAR R, PRASAD S, HEMALATHA S (2011). Pharmacologically screened aphrodisiac plant-A review of current scientific literature. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, **1(1)**: S131-S138.
- PHE V, ROUPRET M (2012). Erectile dysfunction and diabetes: a review of the current evidence-based medicine and a synthesis of the main available therapies. *Diabetes and Metabolism*, **38(1)**: 1-13.

- PRAKASH AO, SHARMA M (1997). Morphological and functional consequences in the reproductive organs of immature rats exposed to multiple administration of *Ferula jaeschkeana* extract. *Phytotherapy Research*, **11**: 1-5.
- ROLLINGER MJ, STEINDL TM, SCHUSTER D, KIRCHMAIR J, ANRAIN K, ELLMERER EP, LANGER T, STUPPNER H, WUTZLER P, SCHIDTKE M (2008). Structure-based virtual screening for the discovery of natural inhibitors for human rhinovirus coat protein. *Journal of Medicinal Chemistry*, **51**: 842-851.
- ROSEN RC, RILEY A, WAGNER G, OSTERLOCH IH, KIRKPATRICK J, MISHRA A (1997). The International Index of Erectile Function (IIEF): A multidimensional scale for assesment of erectile dysfunction. *Urology*, **49(6)**: 822-830.
- RUBIOLO P, MATTEODO M, RICCIO G, BALLERO M, CHRISTEN P, FLEURY-SOUVERAIN S, VEUTHEY JL, BICCHI C (2006). Analytical discrimination of poisonous and nonpoisonous chemotypes of giant fennel (*Ferula communis* L.) through their biologically active and volatile fractions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **54**: 7556-7563.
- SACCHETTI G, APPENDINO G, BALLERO M, LOY C, POLI F (2003). Vittae fluorescence as a tool to differentiate between poisonous and non-poisonous populations of giant fennel (*Ferula communis*) of the island Sardinia (Italy). *Biochemical Systematics and Ecology*, **31(5)**: 527-534.
- SAGİROĞLU M. (2005). *Türkiye Ferula L. (Umbelliferae) Cinsi'nin Revizyonu*. (Doktora), Gazi Üniversitesi, Ankara.
- SAIDKHODZHAEV AI, NIKONOV GK (1973). The structure of ferutinin. *Chemistry of Natural Compounds*, **9(1)**: 25-26.
- SAYYAH M, MANDGARY A, KAMALINEJAD M (2002). Evaluation of the anticonvulsant activity of the seed acetone extract of *Ferula gummosa* Boiss. against seizures induced by pentylenetetrazole and electroconvulsive shock in mice. *Journal of Ethnopharmacology*, **82**: 105-109.
- SELL C. (2010). Chemistry of Essential Oils. In: *Handbook of Essential Oils Science Technology and Applications* Ed.: Başer, K. H. C. Buchbauer, G., Boca Raton: CRC Press. 135.
- SHABIR GA (2003). Validation of high-performance liquid chromatography methods for pharmaceutical analysis Understanding the differences and similarities between validation requirements of the US Food and Drug Administration, the US Pharmacopeia and the International Conference on Harmonization. *Journal of Chromatography A*, **987**: 57-66.

- TAMEMOTO K, TAKAISHI Y, CHEN B, KAWAZOE K, SHIBATA H, HIGUTI T, HONDA G, ITOH M, TAKEDA Y, KODZHIMATOV OK, ASHURMETOV O (2001). Sesquiterpenoids from the fruits of *Ferula kuhistanica* and antibacterial activity of the constituents of *F. kuhistanica*. *Phytochemistry*, **58**: 763-767.
- THARAKAN B, MANYAM BV (2005). Botanical therapies in sexual dysfunction. *Phytotherapy Research*, **19**: 457-463.
- THORVE VS, KSHIRSAGAR AD, VYAWAHARE NS, JOSHI VS, INGALE KG, MOHITE RJ (2011). Diabetes-induced erectile dysfunction: epidemiology, pathophysiology and management. *Journal of Diabetes and Its Complications*, **25(2)**: 129-136.
- XIN Z, EUIKYUNG K, TIAN Z, LIN G, GUO Y (2001). Icariin on relaxation effect of corpus cavernosum smooth muscle. *Chinese Science Bulletin*, **46(14)**: 1186-1190.
- YAQOOB U, NAWCHOO IA (2016). Distribution and taxonomy of *Ferula* L.: a review. *Research & Reviews: Journal of Botany*, **5(3)**: 15-23.
- YILMAZ D, BAYATLI N, UN O, KADOWITZ PJ, SIKKA SC, GUR S (2014). The effect of intracavernosal avanafil, a newer phosphodiesterase-5 inhibitor, on neonatal type 2 diabetic rats with erectile dysfunction. *Urology*, **83(2)**: 508.e7-508.e12.
- YILMAZ-ORAL D, BAYATLI N, GUR S (2017). The beneficial effect of fesoterodine, a competitive muscarinic receptor antagonist on erectile dysfunction in streptozotocin-induced diabetic rats. *Urology*, **107**: 271.e1-271.e7.
- ZANOLI P, ZAVATTI M, GEMINIANI E, CORSI L, BARALDI M (2009). The phytoestrogen ferutinin affects female sexual behavior modulating *Era* expression in the hypothalamus. *Behavioural Brain Research*, **199**: 283-287.
- ZANOLI P, ZAVATTI M, RIVASI M, BARALDI M (2005). *Ferula hermonis* impairs sexual behavior in hormone-primed female rats. *Physiology & Behavior*, **86(1-2)**: 69-74.
- ZAVATTI M, BENELLI A, MONTANARI C, ZANOLI P (2009). The phytoestrogen ferutinin improves sexual behavior in ovariectomized rats. *Phytomedicine*, **16**: 547-554.
- ZAVATTI M, MONTANARI C, ZANOLI P (2006). Role of ferutinin in the impairment of female sexual function induced by *Ferula hermonis*. *Physiology & Behavior*, **89(5)**: 656-661.

EKLER

AS-2015 09:28 Kimd.TAGEM

03123152698

Kime:90 312 2131081

S.1/1



T.C.
GIDA, TARIM VE HAYVANCILIK BAKANLIĞI
Tarımsal Araştırmalar ve Politikalar Genel Müdürlüğü



Sayı : 50955690-335.01-8254

Konu : Araştırma İzni

05.11.2015

ANKARA ÜNİVERSİTESİ REKTÖRLÜĞÜ
Eczacılık Fakültesi Dekanlığı
(Personel İşleri)

İlgi : 05.10.2015 tarihli ve 4600 sayılı yazısı.

İlgi yazınızda Üniversiteniz Sağlık Bilimleri Enstitüsü tarafından desteklenen, Eczacılık Fakültesi Farmakognozi Anabilim Dalı doktora programı öğrencisi Ali Rifat GÜLPINAR tarafından 28.09.2015-27.09.2016 tarihleri arasında yürütülecek olan "*Ferula elaeochytris* Korovin ve *Ferula communis* L. Bitkilerinden Hareketle Standardize Ekstre Hazırlanması, Fitokimyasal İçeriğinin Araştırılması ve Farmakognozik Açıdan Değerlendirilmesi" başlıklı projesi doğrultusunda Hatay ve Çanakkale çevresinden arazi çalışmaları için, 15.08.1992 tarih ve 21316 sayılı Resmi Gazete'de yayımlanan "Bitki Genetik Kaynaklarının Toplanması Muhafazası ve Kullanılması Hakkında Yönetmelik" kapsamında gerekli izin verilmesi talep edilmektedir.

Söz konusu proje ile ilgili taahhütnamede belirtildiği gibi kurumumuzun görüşleri aşağıda açıklanmıştır;

- Toplanacak materyalin birer örneğinin pasaport bilgileri ile birlikte Ankara Tarla Bitkileri Merkez Araştırma Enstitüsü'ndeki Türkiye Tohum Gen Bankası ve İzmir Menemen Ege Tarımsal Araştırma Enstitüsü'ndeki Ulusal Gen Bankasında muhafaza edilmek üzere Genel Müdürlüğümüze teslim edilmesi,
- Toplanan materyalle moleküler düzeyde yapılacak laboratuvar çalışmalarının, toplanan materyal ülke dışına çıkarılmadan, Türkiye'deki bir kuruluştaki yapılması,
- Toplanan materyalin kullanılması ile elde edilecek bilgiler ve bunlara dayalı olarak yapılacak her yayının Genel Müdürlüğümüze gönderilmesi,
- Toplanan materyal üzerinde hiçbir sahiplik ya da islahat hakkı iddia edilmemesi,
- Toplanan ve/veya bundan elde edilecek herhangi bir materyalin ticari amaçla kullanılmaması, üçüncü kişilere verilmemesi koşuluyla söz konusu araştırma ve çalışmaların yürütülmesinde proje süresince bir sakınca görülmemektedir.

Bilgilerinize arz ederim.

Dr. Ali Osman SARI
Genel Müdür Yardımcısı

İstanbul Yolu Üzeri Tarım Kampüsü
Telefon No: 0 312 315 76 23 Faks No: 0 312 315 26 98
E-Posta: ncakir@tagem.gov.tr İnternet Adresi: www.tagem.gov.tr

Bilgi için: N.ÇAKIR
Zir.Müh.
Telefon No: 1295

Ek-1. Bitki Toplama İzni Yazısı.



T.C.
ANKARA ÜNİVERSİTESİ REKTÖRLÜĞÜ
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU KARARI

TOPLANTI TARİHİ : 08/06/2016
TOPLANTI NO : 2016-13
DOSYA NO : 2016-88
KARAR NO : 2016-13-136

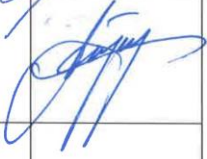
Yürüttüğü Ankara Üniversitemiz Eczacılık Fakültesi Farmakognozi Anabilim Dalı öğretim üyelerinden Yrd.Doç.Dr.Sinem Aslan Erdem'in yaptığı, araştırmacı olarak Prof.Dr.Serap Gür, Uzm.Ecz.Ali Rifat Gülpınar ve Ecz.Didem Yılmaz Oral'ın katıldığı "Ferula elaeochoytris Korovin ve Ferula communis L. Bitkilerinin Farmakognozik Açısından Araştırılması ve Ferula elaeochoytris Korovin Bitkisiinden Hazırlanan Ekstrelerin Eretil Disfonksiyon Üzerine Etkisinin İn vivo ve İn vitro Araştırılması" başlıklı araştırma projesi Kurulumuzun 27/04/2016 tarihli toplantısında alınan 2016-10-117 sayılı kararı uyarınca düzeltilmiş haliyle yeniden incelenmiştir. Söz konusu çalışmanın Üniversite senatosunun 12/2/2016 tarihli toplantısında 430/3642 sayılı kararı ile kabul edilen ve Hayvan Deneyleri Merkezi Etik Kurulu'nun 19/2/2016 tarih ve 42 sayılı kararı ile onaylanan "Ankara Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Yönergesi"ne göre aşağıda belirtilen kapsamda yapılmasına oybirliği ile karar verilmiştir.

Hayvan Türü : Sıçan
Hayvan Sayısı : 30
Geçerlilik Süresi : 10/06/2016-10/06/2017

ETİK KURUL ÜYELERİ				
Ünvanı / Adı / Soyadı	Uzmanlık Dalı	Kurumu	Cinsiyeti	İmza
Prof.Dr.M.Taner KARAOĞLU (Başkan)	Viroloji Anabilim Dalı	Veteriner Fakültesi	E	
Prof.Dr.Tanju ÖZÇELİKAY (Başkan Vekili)	Farmakoloji Anabilim Dalı	Eczacılık Fakültesi	E	
Prof.Dr.Nuri YİĞİT (Üye)	Zooloji Anabilim Dalı	Fen Fakültesi	E	
Prof.Dr.Fatin CEDDEN (Üye)	Hayvan Yetiştirme Anabilim Dalı	Ziraat Fakültesi	E	
Prof.Dr.Mine KIRKAĞAÇ (Üye)	Su Ürünler Anabilim Dalı	Ziraat Fakültesi	K	
Prof.Dr.Emine DEMİREL YILMAZ (Üye)	Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı	Tıp Fakültesi	K	

Adres: Ankara Üniversitesi Rektörlüğü 06100 - Tandoğan / ANKARA Tel: 0 (312) 212 60 40 / 2064 Faks: 0 (312) 212 60 49

Ek-2. Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Kararı

Yrd.Doç.Dr.Mehmet SAĞLAM (Üye)	Cerrahi Anabilim Dalı	Veteriner Fakültesi	E	
Yrd.Doç.Dr.Atilla ÖZGÜR (Üye)	Veteriner Hekimliği Tarihi ve Deontoloji Anabilim Dalı	Veteriner Fakültesi	E	
Yrd.Doç.Dr.Gülnur GÖLLÜ BAHADIR (Üye)	Çocuk Cerrahisi Anabilim Dalı	Tıp Fakültesi	K	
Uzm.Vet.Hek.Atilla İŞGÖREN (Üye)	Deney Hayvanları Yetiştirme ve Araştırma Laboratuvarı	Tıp Fakültesi	E	
Vet.Hek.Dr.Akife KAYA (Üye)	Referans Veteriner Kliniği	Serbest	K	
Uzm.Vet.Hek.Hüseyin DEDE (Üye)	Veteriner Hekimler Derneği	Serbest	E	
Fatma Aysun ÇOSKUN (Üye)	İktisat	Serbest	K	

Ek-2. Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Kararı (Devam)



T.C.
ANKARA ÜNİVERSİTESİ REKTÖRLÜĞÜ
Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü

Sayı : 64299502-604.01.03-E.75346

06.11.2017

Konu : 16H0237004 Kod Nolu Sonuç Raporu

Sayın Yard.Doç.Dr. Sinem Aslan ERDEM
Eczacılık Fakültesi Eczacılık Meslek Bilimleri Bölümü

İlgi : 02.08.2017 tarihli yazınız.

Yürütücüsü bulunduğunuz **16H0237004** kod nolu "**Ferula elaeochytris Korovin ve Ferula communis L. Bitkilerinin Farmakognozik Açıdan Araştırılması ve Ferula elaeochytris Korovin Bitkisinden Hazırlanan Ekstrelerin Erektile Disfonksiyon Üzerinde Etkisinin İn Vivo ve İn Vitro Araştırılması**" başlıklı Hızlandırılmış Destek Projenize ait Sonuç Raporunuz, Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonunun **27/10/2017** tarih ve **07** sayılı toplantısında alınan kararla **kabul** edilmiştir.

Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimine gösterdiğiniz ilgi ve gerçekleştirdiğiniz çalışma için teşekkür eder, araştırma sonuçlarının özellikle bilimsel atıf indekslerine giren uluslararası bilimsel dergilerde, nitelikli bir yayına dönüştürülmesi ve uygunluğu durumunda patent ve faydalı model haklarının alınmasına müracaatlarınızı beklediğimizi bir kez daha belirtmek isterim.

Bilgilerinizi ve gereğini saygılarımla rica ederim.

NOT: I- BAP Komisyonumuz tarafından kabul edilen sonuç raporunuzun son halini kabul tarihinden itibaren en geç 1(bir) ay içerisinde Birimimizden temin ettiğiniz cilt kapağı ile ciltlenmiş ve CD ortamına yüklenmiş halde Koordinatörlüğümüze teslim etmeniz gerekmektedir.

II- İlgili BAP projenizden elde edilen bilimsel yayınınız söz konusu ise, yayımlandıktan sonra yayın bilgilerini proje takip sistemi üzerinden online girmeniz gerekmektedir.

e-imzalıdır

Prof. Dr. Ayhan ELMALI
Rektör a.
Rektör Yardımcısı

Not: 5070 sayılı Elektronik İmza Kanunu gereği bu belge elektronik imza ile imzalanmıştır.

Ankara Üniversitesi Rektörlüğü-BAP- 06100 Tandoğan / Ankara /ANKARA
Telefon No: 0312 215 90 01
e-posta: -

Bilgi için: Oya UĞUZ
Bilgisayar İşletmeni

Ek-3. Ankara Üniversitesi BAP Koordinatörlüğü Proje Rapor Kabul Yazısı

ÖZGEÇMİŞ

I- Bireysel Bilgiler

Adı: Ali Rifat
Soyadı: GÜLPINAR
Doğum yeri ve tarihi: Hatay/İskenderun, 01.11.1983
Uyruğu: Türkiye Cumhuriyeti
Medeni durumu: Evli
Askerlik durumu: Muaf-Bedelli
İletişim adresi ve telefonu: Yıldızevler Mah. 738. Cd. Havuzlubag
Sit., B1 Blok, No. 17,
Çankaya/ANKARA
Tel: 0(534)7762223

II- Eğitimi

Doktora: Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Ens.
Farmakognozi A.D. (2009-).
Yüksek Lisans: Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Ens.
Farmakognozi A.D. (2006-2009).
Lisans: Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi (2001-2006).
Lise: Hatay/İskenderun İbn-i Sina Anadolu Lisesi (1994-2001).
İlkokul: Hatay/İskenderun Mithat Paşa İlkokulu (1990-1994).
Hatay/Belen Sebati Gönenç İlkokulu (1989-1990).
Yabancı Dil: İngilizce

III- Ünvanları:

Eczacı (2006)
Uzman Eczacı (2009)

IV- Mesleki Deneyimi

Araştırma Görevlisi:	Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmakognozi A.D. (2007-2011).
Serbest Eczacılık:	Yeni Asya Eczanesi, Keçiören/ANKARA (2011'den beri).
Kurucu Ortak:	Bioart Tıbbi Cihazlar ve Doğal Ürünleri Biyomedikal Kozmetik Araştırma Geliştirme Dan. Gıda San. ve Tic. Ltd.Şti., Ankara Üniversitesi Teknokent (2014'ten beri).

Ankara Eczacı Odası ARGE Komisyonu Üyesi (2017-2019 Dönemi)

Ankara Eczacı Odası Kooperatif Komisyonu Üyesi (2017-2019 Dönemi)

V- Üye Olduğu Bilimsel Kuruluşlar

Farmakognozi ve Fitoterapi Derneği

VI- Bilimsel İlgi Alanları

1. Uluslararası Hakemli Dergilerdeki Yayınlar

KAN Y, KARTAL M, UCAN U, GULPINAR A, KAN R (2008). Antimicrobial activity and composition of the essential oils of *Echinacea* species cultivated under organic farming conditions in Turkey. *Planta Medica*, **74(09)**: PI55.

ORHAN I, ŞENOL FS, GÜLPINAR AR, KARTAL M, ŞEKEROĞLU N, DEVECİ M, KAN Y, ŞENER B (2009). Acetylcholinesterase inhibitory and antioxidant properties of *Cyclotrichium niveum*, *Thymus praecox* subsp. *caucasicus* var. *caucasicus*, *Echinacea purpurea* and *E. pallida*. *Food and Chemical Toxicology*, **47(6)**: 1304-1310.

ORHAN IE, BELHATTAB R, ŞENOL F, GÜLPINAR A, HOŞBAŞ S, KARTAL M (2010). Profiling of cholinesterase inhibitory and antioxidant activities of *Artemisia absinthium*, *A. herba-alba*, *A. fragrans*, *Marrubium vulgare*, *M. astranicum*, *Origanum vulgare* subsp. *glandulosum* and essential oil analysis of two *Artemisia* species. *Industrial Crops and Products*, **32(3)**: 566-571.

GULPINAR AR, ORHAN IE, KAN A, SENOL FS, CELIK SA, KARTAL M (2012). Estimation of *in vitro* neuroprotective properties and quantification of rutin and fatty acids in buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) cultivated in Turkey. *Food Research International*, **46(2)**: 536-543.

ORHAN IE, SENOL FS, GULPINAR AR, SEKEROGLU N, KARTAL M, SENER B (2012). Neuroprotective potential of some terebinth coffee brands and the unprocessed fruits of *Pistacia terebinthus* L. and their fatty and essential oil analyses. *Food Chemistry*, **130(4)**: 882-888.

SEKEROGLU N, SENOL FS, ORHAN IE, GULPINAR AR, KARTAL M, SENER B (2012). *In vitro* prospective effects of various traditional herbal coffees consumed in Anatolia linked to neurodegeneration. *Food Research International*, **45(1)**: 197-203.

ORHAN IE, KARTAL M, GÜLPINAR AR, COS P, MATHEEUSSEN A, MAES L, TASDEMİR D (2013). Assessment of antimicrobial and antiprotozoal activity of the olive oil macerate samples of *Hypericum perforatum* and their LC–DAD–MS analyses. *Food Chemistry*, **138(2-3)**: 870-875.

SEVİM D, SENOL FS, GULPINAR AR, ORHAN IE, KAYA E, KARTAL M, SENER B (2013). Discovery of potent *in vitro* neuroprotective effect of the seed extracts from seven *Paeonia* L.(peony) taxa and their fatty acid composition. *Industrial Crops and Products*, **49**: 240-246.

ORHAN IE, KARTAL M, GÜLPINAR AR, YETKİN G, ORLIKOVA B, DIEDERICH M, TASDEMİR D (2014). Inhibitory effect of St. John' s Wort oil macerates on TNF α -induced NF- κ B activation and their fatty acid composition. *Journal of Ethnopharmacology*, **155(2)**: 1086-1092.

OKE-ALTUNTAS F, ASLİM B, DUMAN H, GULPINAR AR, KARTAL M (2015). The relative contributions of chlorogenic acid and rutin to antioxidant activities of two endemic *Prangos* (Umbelliferae) species (*P. heynia* and *P. denticulata*). *Journal of Food Biochemistry*, **39(4)**: 409-416.

ORHAN IE, TOSUN F, GÜLPINAR AR, KARTAL M, DURAN A, MIHOGLUGİL F, AKALGAN D (2015). LC–MS quantification of parthenolide and cholinesterase inhibitory potential of selected *Tanacetum* L.(Emend. Briq.) taxa. *Phytochemistry Letters*, **11**: 347-352.

2. Diğer Yayınlar

KARTAL M, GÜLPINAR AR (2009). Soğuk Algınlığının Önlenmesi ve Tedavisinde: *Echinacea*, *Modern Fitofarmakoterapi ve Doğal Farmasötikler* **1**: 25-39

GÜLPINAR AR, GÜLPINAR Ö, KARTAL M (2012) *Ferula* Türleri ve Erektile Disfonksiyon. *Modern Fitofarmakoterapi ve Doğal Farmasötikler* 5: 37-40

3. Kitap Bölümleri

KARTAL M, GÜLPINAR AR (2011). *Pelargonium sidoides* (Sardunya). Tedavide Kullanılan Bitkiler (FFD Monografları) 2. Baskı, Ed.: Demirezer LÖ, Saraçoğlu İ, Şener B. Nobel Tıp Kitabevi, Ankara. s.: 487-492

KARTAL M, GÜLPINAR AR (2017). *Ferula* Türleri (Çakşır). FFD Monografları Bitkiler ve Etkileri 3. Baskı, Ed.: Demirezer LÖ, Ersöz T, Saraçoğlu İ, Şener B, Köroğlu A, Yalçın FN. Akademisyen Kitabevi, Ankara. s.: 463-471

KARTAL M, GÜLPINAR AR (2017). *Tribulus terrestris* (Çobançökerten). FFD Monografları Bitkiler ve Etkileri 3. Baskı, Ed.: Demirezer LÖ, Ersöz T, Saraçoğlu İ, Şener B, Köroğlu A, Yalçın FN. Akademisyen Kitabevi, Ankara. s.: 1049-1058

4. Sözlü Bildiriler

KARTAL M, KAN Y, GÜLPINAR AR, ZEMPLICKA M, SVAJDLENKA E (2008). LC and LC-MS analysis of *Echinacea purpurea* and *Echinacea pallida* Cultivated in Turkey. 5th CMAPSEEC, Brno, Czech Republic.

5. Poster Sunumları

Tanacetum parthenium (L.) Schultz Bip. Bitkisinde HPLC/LC-MS Yöntemi ile Partenolit Miktar Tayini (2010) 19. BİHAT, Mersin, Türkiye.

Determination of Fatty Acid Compositions of *Paeonia daurica* Andrews and *P. peregrina* Mill. Seeds (2010) 6th CMAPSEEC, Antalya, Türkiye.

Türkiye’de Kültürü Yapılan iki *Echinacea* türünün Antikolinesteraz ve Antioksidan Aktivitesi (2008), BİHAT, İstanbul.

Cyclotrichium niveum (Boiss.) Manden. et Scheng. Bitkisinin Antikolinesteraz ve Antioksidan Aktivitesi, (2008), BİHAT, İstanbul.

GC-MS Analysis of Essential Oil Composition of *Echinacea purpurea* and *Echinacea pallida* Cultivated in Turkey (2007) ISEO, Graz, Avusturya.

6. Tezler

Türkiye'de Kültürü Yapılan *Echinacea purpurea* (L.) Moench ve *Echinacea pallida* (Nutt.) Nutt Türleri Üzerinde Farmakognozik Araştırmalar (2009). Türkiye Cumhuriyeti Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Farmakognози Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi, Danışman; Prof. Dr. Murat KARTAL

VII- Bilimsel Etkinlikleri

1. Bilimsel Projeler

ASLAN ERDEM S, GÜR S, YILMAZ D, GÜLPINAR AR. *Ferula elaeochytris* Korovin ve *Ferula communis* L. Bitkilerinin Farmakognozik Açıdan Araştırılması ve *Ferula elaeochytris* Korovin Bitkisinden Hazırlanan Ekstrelerin Erektile Disfonksiyon Üzerinde Etkisinin *İn vivo* ve *İn vitro* Araştırılması. Ankara Üniversitesi BAP Koordinatörlüğü, Hızlı Destek Programı (2016-2017).

2. Seminerler

Pelargonium sidoides D.C. Kökünün Farmakognози Açısından Önemi ve Kullanılışı (2009)

Erkeklerde Cinsel Güç Artırmak Amacıyla Kullanılan Bilimsel Açıdan Güncel Bitkiler (2011)

Bitkisel Ürünlerin Kalite Kontrolünde LC-MS Uygulamaları (2011)

VII- Diğer Bilgiler

- ASLAN ERDEM S, ÖZ UC, GÜLPINAR AR (2015). Yaşlanma Karşıtı Doğal Kaynaklı Bileşikler ve Standardize Bitki Ekstreleri İçeren Gıda Takviyesi Kapsüllerinin Geliştirilmesi ve Üretilmesi , TÜBİTAK 1512 Girişimcilik Desteği Projesi.