

TÜRKİYE CUMHURİYETİ  
ANKARA ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**FARELERDE KORUNGA BİTKİSİNİN (ONOBRYCHIS  
VICIFOLIA) BAĞIRSAKLARA ETKİSİ**

Sinan İNCE

FARMAKOLOJİ VE TOKSİKOLOJİ ANABİLİM DALI  
DOKTORA TEZİ

DANIŞMAN  
Prof. Dr. Ayhan FİLAZİ

2007 – ANKARA

## İÇİNDEKİLER

Kabul ve Onay	ii
İçindekiler	iii
Önsöz	vi
Simgeler ve Kısaltmalar	vii
Şekiller Dizini	viii
Çizelgeler Dizini	ix
<b>1. GİRİŞ</b>	1
1.1. Korunga Türleri	1
1.1.1. Korunga (Onobrychis sativa Lam.)	2
1.1.2. Korunganın Bitkisel Özellikleri	3
1.1.3. Korunganın Kimyasal Bileşimi	4
1.1.4. Bitkilerle İlgili Yapılan Diğer Bazı Çalışmalar	8
1.1.5. Korunga İle Yapılan Diğer Bazı Çalışmalar	10
<b>2. GEREÇ VE YÖNTEM</b>	13
2.1. Araç ve Gereçler	13
2.1.1. Bitki Materyali	13
2.1.2. Deney Hayvanları	13
2.1.3. Deney Araçları	13
2.1.4. Kimyasal Maddeler	14
2.1.5. Kimyasal Maddelerin ve Ayıraçların Hazırlanması	16
2.1.6. Tyrode Çözeltisinin Bileşimi	17
2.2. Yöntem	18
2.2.1. Bitkinin Ekstraksiyonu	18
2.2.2. Bitkinin Organik Fosforlu ve Karbamat Türevi İnsektisid, Aflatoksin B <sub>1</sub> , B <sub>2</sub> , G <sub>1</sub> , G <sub>2</sub> ve Okratoksin Yönünden Analizi	18
2.2.3. Bitkinin Fitokimyasal Analizleri	19
2.2.4. Akut Zehirlilik Denemesi	21
2.2.5. Farmakodinami Çalışması	22
2.2.6. Protokoller	23

2.2.6.1.	Fare Jejunumu ve İleumu Üzerine Ekstraktın Etkisinin Tek Başına Araştırılması	23
2.2.6.2.	Fare Jejunumu ve İleumu Üzerine Ak'nin Etkisinin Tek Başına Araştırılması	23
2.2.6.3.	Fare Jejunumu ve İleumu Üzerine Betanekolün Etkisinin Tek Başına Araştırılması	23
2.2.6.4.	Fare Jejunumu ve İleumu Üzerine Ekstraktın Etkisinin Ak EC <sub>50</sub> Miktarı ile Birlikte Araştırılması	24
2.2.6.5.	Fare Jejunumu ve İleumu Üzerine Ekstraktın Etkisinin Betanekolün EC <sub>50</sub> Miktarı ile Birlikte Araştırılması	24
2.2.6.6.	Fare Jejunumu ve İleumu Üzerine Ekstraktın Etkisinin Atropin ile Birlikte Araştırılması	24
2.2.6.7.	Fare Jejunumu ve İleumu Üzerine Nikotin ve Histaminin Etkilerinin Tek Başlarına Araştırılması	25
2.2.7.	İstatistiksel Analiz	25
<b>3. BULGULAR</b>		26
3.1.	Bitki Ekstresinin Analiz Bulguları	26
3.2.	Bitkinin Organik Fosforlu ve Karbamat Türevi İnsektisid, Aflatoksin B <sub>1</sub> , B <sub>2</sub> , G <sub>1</sub> , G <sub>2</sub> ve Okratoksin Yönünden Analiz Bulguları	26
3.3.	Bitkinin Fitokimyasal Analiz Bulguları	26
3.4.	Akut Zehirlilik Çalışması Bulguları	28
3.5.	Farmakodinami Çalışması Bulguları	29
3.5.1.	Fare Jejunumu ve İleumu Üzerine Ekstraktın Tek Başına Etkisi	29
3.5.2.	Fare Jejunumu ve İleumu Üzerine Ak' nin Tek Başına Etkisi	30
3.5.3.	Fare Jejunumu ve İleumu Üzerine Betanekolün Tek Başına Etkisi	32
3.5.4.	Fare Jejunumu ve İleumu Üzerine Ekstraktın Ak EC <sub>50</sub> Miktarı ile Birlikte Etkisi	34

3.5.5.	Fare Jejunumu ve İleumu Üzerine Ekstraktın Betanekolün EC <sub>50</sub> miktarı ile Birlikte Etkisi	35
3.5.6.	Fare Jejunumu ve İleumu Üzerine Ekstraktın Atropin ile Birlikte Etkisi	36
3.5.7.	Fare Jejunumu ve İleumu Üzerine Nikotin ve Histaminin Tek Başlarına Etkisi	38
<b>4. TARTIŞMA</b>		39
<b>5. SONUÇ VE ÖNERİLER</b>		45
<b>ÖZET</b>		46
<b>SUMMARY</b>		47
<b>KAYNAKLAR</b>		48
<b>Ek – 1 (Etik Kurul Kararı)</b>		52
<b>ÖZGEÇMİŞ</b>		53

## ÖNSÖZ

Bir ülkenin en önemli doğal kaynaklarından birisini çayır ve meralar oluşturur. Bu alanlar hayvanların ihtiyacı olan kaba yemin en ucuz karşılandığı yer olma özelliğinin yanında, doğal bitki örtüsü, biyolojik çeşitlilik ve birçok tıbbi bitkinin kaynağı, çok çeşitli canlıya yaşam alanı oluşturması gibi birçok niteliklere de sahiptir. Çayır ve meralar toprak verimliliğinin artmasında ve toprakların yerinde tutulmasında, bölgenin su kaynaklarının muhafazasında ve geliştirilmesinde, erozyon kontrolünde önemli rol oynarlar.

Hayvancılıkta maliyetleri en aza indirerek karlılığı arttırmak yetiştiricilerin en çok arzuladığı bir anlayış biçimidir. Bunların başında hayvan yetiştiriciliğinde en az maliyetle besleme yapmak gelmektedir. Korunga bitkisi de yetiştiriciler tarafından tercih edilen üretimi kolay, ucuz ve tüketimi iyi olan bir yem bitkisi özelliğindedir.

Yapılan bu araştırmada, hayvan beslemede kullanım alanı bulan korunga bitkisinin fitokimyasal özellikleri, ekstraktının farelerdeki ağızdan akut ÖD<sub>50</sub> değeri ile fare jejunum ve ileumu üzerindeki etkileri *in vitro* testlerle ortaya konması amaçlanmıştır.

Bu çalışmada yardım, destek ve ilgilerini esirgemeyen, başta danışman hocam Prof. Dr. Ayhan FİLAZİ olmak üzere, tez izleme komitemde bulunan hocalarım Prof. Dr. Emine BAYDAN ve Prof. Dr. İlksin PİŞKİN' e, bilgi ve önerileriyle çalışmalarına yardımcı olan Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Sezai KAYA' ya, Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarla Bitkileri Bölümü Öğretim Üyesi Prof. Dr. Saime ÜNVER' e, Veteriner Hekim Dr. M. Alp ÇETİNKAYA' ya ve ayrıca laboratuvar çalışmalarım sırasında bana yardımcı olan başta Süreyya KARAASLAN olmak üzere tüm araştırma görevlisi arkadaşlarım ile Anabilim Dalı görevlilerine teşekkür ederim. Çalışmalarım sırasında sabır ve özverilerini esirgemeyen aileme de teşekkürü bir borç bilirim.

**SİMGELER ve KISALTMALAR**

<b>Ak</b>	Asetilkolin
<b>AkE</b>	Asetilkolinesteraz
<b>cm</b>	Santimetre
<b>EC<sub>50</sub></b>	En yüksek etkinin yarısını oluşturan derişim
<b>ED<sub>50</sub></b>	Denemeye alınan grubun yarısında etki oluşturan doz
<b>E<sub>max</sub></b>	En yüksek etkililik ölçüsü
<b>g</b>	Gram
<b>İTK</b>	İnce tabaka kromotografisi
<b>Kcal</b>	Kilokalori
<b>kg</b>	Kilogram
<b>L</b>	Litre
<b>m</b>	Metre
<b>M</b>	Molarite
<b>mg</b>	Miligram
<b>ml</b>	Mililitre
<b>mm</b>	Milimetre
<b>mM</b>	Milimolar
<b>µl</b>	Mikrolitre
<b>N</b>	Normalite
<b>ÖD<sub>50</sub></b>	Denemeye alınan grubun yarısında ölüm oluşturan doz
<b>pD<sub>2</sub></b>	EC <sub>50</sub> ' nin negatif logaritması
<b>PEG</b>	Polietilen glikol
<b>pH</b>	Bir sıvının sahip olduğu hidrojen iyonu konsantrasyonunu belirtmek üzere kullanılan simge
<b>P<sub>max</sub></b>	En yüksek etkin izometrik pik
<b>S.E.M.</b>	Standart hata
<b>UV</b>	Ultraviyole

## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1.	Korunga bitkisi	2
Şekil 1.2.	Korunga bitkisinin genel görünümü	3
Şekil 1.3.	Afzelinin kimyasal yapısı	6
Şekil 1.4.	Arbutinin kimyasal yapısı	6
Şekil 1.5.	Kuersetin kimyasal yapısı	6
Şekil 1.6.	Kaemferolün kimyasal yapısı	6
Şekil 3.1.	Fenollerin varlığı	28
Şekil 3.2.	Aminoasit varlığı	28
Şekil 3.3.	Flavonoidlerin varlığı	28
Şekil 3.4.	Kolin varlığı	28
Şekil 3.5.	Fare jejunumunda ekstraktın (0,1-6,4 mg/ml) kümülatif derişim-yanıtları	29
Şekil 3.6.	Fare ileumunda ekstraktın (0,1-6,4 mg/ml) kümülatif derişim-yanıtları	30
Şekil 3.7.	Fare jejunumunda Ak ( $10^{-8}$ - $10^{-4}$ M)' nin kümülatif derişim-yanıtları	31
Şekil 3.8.	Fare ileumunda Ak ( $10^{-8}$ - $10^{-4}$ M)' nin kümülatif derişim-yanıtları	31
Şekil 3.9.	Fare jejunumunda betanekolün ( $10^{-8}$ - $10^{-4}$ M) kümülatif derişim-yanıtları	32
Şekil 3.10.	Fare ileumunda betanekolün ( $10^{-8}$ - $10^{-4}$ M) kümülatif derişim-yanıtları	33
Şekil 3.11.	Fare jejunumu ve ileumu üzerinde Ak ve betanekolün % kasılma yanıtları	33
Şekil 3.12.	Fare jejunum ve ileumunda ekstrakt (3,2 ve 4,8 mg/ml) inkubasyonunun Ak EC <sub>50</sub> değeri üzerine etkisi	34
Şekil 3.13.	Fare jejunum ve ileumunda ekstrakt (3,2 ve 4,8 mg/ml) inkubasyonunun betanekol EC <sub>50</sub> değeri üzerine etkisi	36
Şekil 3.14.	Fare jejunum ve ileumunda atropin ( $10^{-8}$ ve $10^{-7}$ M) inkubasyonunun ekstrakt (6,4 mg/kg) üzerine etkisi	37

**ÇİZELGELER DİZİNİ**

Çizelge 1.1.	Çeşitli devrelerde biçilen korungada kimyasal kompozisyonun değişimi	4
Çizelge 1.2.	Korungadaki mineral madde kompozisyonu	5
Çizelge 2.	Hayvan grupları ve ekstrakt çözeltilerinin miktarları	21
Çizelge 3.1.	Korunga bitkisi ve/veya ekstraktının fitokimyasal analiz bulguları	27
Çizelge 3.2.	Ekstraktın erkek ve dişi farelerdeki ağızdan akut ÖD <sub>50</sub> miktarı	28
Çizelge 3.3.	Fare jejunumu ve ileumunda Ak derişim-yanıt eğrilerinin E <sub>max</sub> , pD <sub>2</sub> ve EC <sub>50</sub> değerleri	30
Çizelge 3.4.	Fare jejunumu ve ileumunda betanekol derişim-yanıt eğrilerinin E <sub>max</sub> , pD <sub>2</sub> ve EC <sub>50</sub> değerleri	32
Çizelge 3.5.	Ekstrakt varlığında Ak EC <sub>50</sub> ' nin fare jejunum ve ileumundaki % ortalama kasılma değerleri	34
Çizelge 3.6.	Ekstrakt varlığında betanekol EC <sub>50</sub> ' nin fare jejunum ve ileumundaki % ortalama kasılma değerleri	35
Çizelge 3.7.	Atropin varlığında ekstraktın fare jejunum ve ileumundaki % ortalama gevşeme değerleri	37



## 1. GİRİŞ

Bitkilerin, özellikle çayır-mera otlarının, ot yiyen hayvanların, vahşi yaşamlarından beri temel yem kaynaklarını oluşturduğu bildirilmektedir. Bu durumun günümüzde de evcil herbivor hayvanların beslenmesinde önemini sürdürdüğü vurgulanmaktadır. Hayvanların otlatılması için ayrılan alanlara mera, otlarının biçilmesi için tahsis edilen yerlere ise çayır denilmektedir. Farklı şekillerde kullanılan bu kavramların aynı anlamı da ifade ettiği bildirilmektedir. Çayır-mera bitkilerinin (buğdaygil, baklagil, odunumsu bitkiler, yabancı otlar); hayvanlar tarafından otlatıldığı, biçilip kurutulmuş halde özellikle kış yemlemesinde kullanıldığı ya da silaj yapılarak değerlendirildiği belirtilmektedir. Bu otların kimyasal ve fiziksel özelliklerinin; bitki florası, bitkilerin vejetasyon dönemi, toprağın yapısı, iklim özelliği, denizden yükseklik gibi faktörlerden etkilendiği bildirilmektedir. Hayvancılığı ileri ülkelerde çayır-mera alanlarının fazla, otların verimlilik düzeylerinin yüksek ve vejetasyon sürelerinin uzun olduğu ve dolayısıyla üretilen hayvansal ürün maliyetlerinin de düşük olduğu belirtilmektedir. Çayır-meraların Amerika Birleşik Devletleri'nin toplam yüzölçümü içinde % 26,08; Avustralya'da % 58,89; Arjantin'de % 52,19; Fransa'da % 25,37; Türkiye'de ise % 27,94'lük bir orana sahip olduğu bildirilmiştir (Kaya ve Karademir, 2002).

### 1.1. Korunga Türleri

Korunga (*Onobrychis*) cinsine bağlı 100 kadar türün olduğu, bunlardan yabancı korungaların Baltık Denizi'nden, Akdeniz, Ön Asya ve Sibiryaya kadar uzanan çok geniş bir alana yayıldığı bildirilmektedir. Yurdumuzda 70 kadar korunga türünün doğal olarak yetiştiği belirtilmektedir. Çoğu korunga türünün morfolojik olarak birbirinden kolaylıkla ayrılamadığı, bu nedenle, korunga türlerinin kesin teşhislerinde güçlüklerle karşılaşıldığı bildirilmektedir. Korunga cinsindeki tür zenginliğine karşılık sadece üç türün; adi korunga (*Onobrychis sativa* L.), Anadolu korungası (*Onobrychis arenaria*) ve Kafkas korungasının (*Onobrychis*

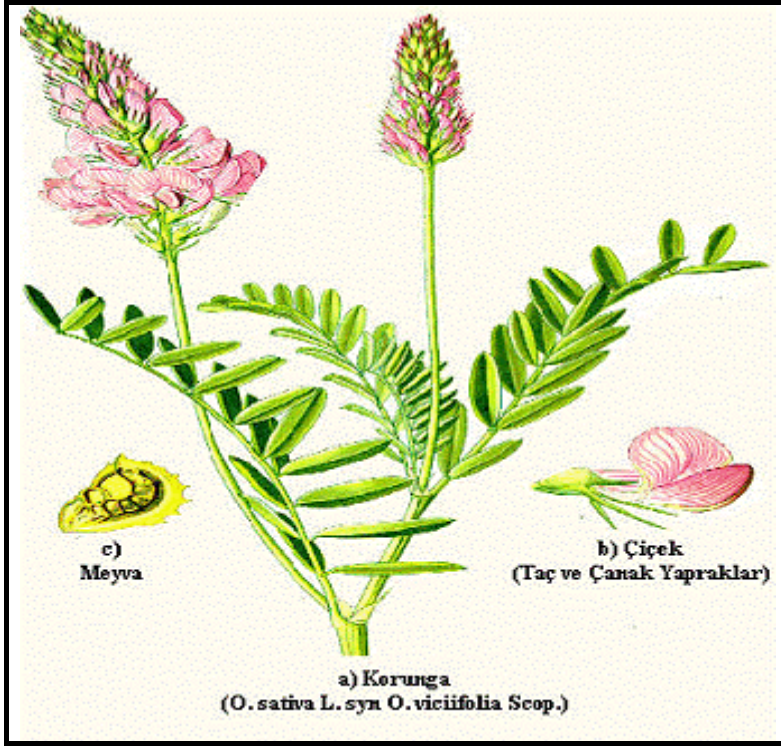
*transcaucacia*) tarımsal açıdan önem taşıdığı, bu türler içerisinde adi korunga veya kısaca korunga olarak adlandırılan *Onobrychis sativa* (Syn. *O. viciaefolia* veya *O. viciifolia* Scop.) türünün yaygın olarak yetiştirildiği bildirilmiştir (Açıkgöz, 2001).

### 1.1.1. Korunga (*Onobrychis sativa* Lam.)

Yurdumuzun özellikle Orta ve Doğu Anadolu ile geçit bölgelerinde yaygın olarak yetiştirilen korunganın (Şekil 1.1.), soğuğa ve kurağa çok dayanıklı olduğu, diğer bitkilerin yetişemediği kıraç kireçli topraklarda iyi geliştiği rapor edilmektedir. Korunganın, iklim ve toprak koşullarına bağlı olarak 15–20 yıl yaşamını sürdürdüğü (Açıkgöz, 2001; TİGEM, 2004), kalkerli ve sulanmayan topraklarda yoncadan daha verimli olduğu bildirilmektedir. Hasat işleminden sonra yavaş gelişmesi nedeniyle, yoncadan daha az sayıda biçim ve ot verimi alındığı kaydedilmiştir. Otunun yonca kadar besleyici, protein oranının oldukça yüksek ve mineral maddelerce zengin olduğu da bildirilmiştir. Yoncanın aksine, korunga otunun hayvanlarda şişkinlik yapmadığı, süt ineklerine yedirildiğinde sütün ve tereyağın kalitesinin yükseldiği bildirilmiştir. Diğer baklagiller gibi toprağı azotlu maddelerce zenginleştirdiği de belirtilmiştir. Kurak bölgelerde korunga köklerinin toprağın 8–10 m derinlerine kadar indiği, kuvvetli ve dallanmış kökleri ile alt katmanlardaki bitki besin maddelerini ve suyu yukarı çektiği, bu nedenle diğer yem bitkilerine tercih edildiği rapor edilmiştir (Açıkgöz, 2001).



Şekil 1.1. Korunga bitkisi (Somerville, 2003).



Şekil 1.2. Korunga bitkisinin genel görünümü (Yüksek ve ark., 2002).

### 1.1.2. Korunganın Bitkisel Özellikleri

Dik veya yatık olarak gelişen şekilleri bulunan korunganın, zayıf ve yüzlek topraklarda iyi geliştiği, toprağın derinlerine kadar inebilen çok gelişmiş bir ana köke sahip olduğu, bu köklerin çapının bazen 5 cm'ye kadar ulaşabildiği bildirilmiştir. Bir taçtan 10–30 kadar sap çıktığı, enine kesitinin yuvarlak, taban kısmının boş, yukarı kısımlarının ise içi dolu olduğu belirtilmiştir. Kuru ot elde etmek amacıyla yetiştirilen bitkilerin 100–120 cm'ye kadar boylanabildiği, yapraklarının karşılıklı bileşik yapıda olduğu, yaprağı meydana getiren yaprakçıkların her birinin ters yumurta şeklinde veya dar uzun, alt yüzeylerinin hafif tüylü ve her yaprağında 5–30 yaprakçık bulunduğu, yaprakçıkların 10–25 mm uzunluğunda ve 3–8 mm genişliğinde, kenarlarının düz olduğu rapor edilmiştir (Şekil 1.2) (Açıkgöz, 2001; TİGEM, 2004).

Çiçeklerinin salkım şeklinde ve genel olarak pembe renkli, her birinin uzunluğunun 1 cm olduğu, bunların uzunca bir sap etrafından birleşerek bir salkım meydana

getirdiği, bir salkımda 5–80 çiçek bulunduğu, salkımında çiçeklerin aşağıdan yukarıya doğru ağığı bildirilmiştir (Açıkgöz, 2001; Yüksek ve ark., 2002). Çiçeklerin çok ender olarak kendi kendine döllenendiği, tozlaşmanın bal arısı (*Apis mellifera*) ve bazı yaban arıları tarafından gerçekteşirildiği kaydedilmiştir. Bal arılarının, bal özü taşıdıklarından dolayı korunga çiçeklerini severek ziyaret ettiği, bu arada tozlaşmayı yaparak döllenmeyi sağladığı bildirilmiştir. Çiçeklenmenin bitkilerin en kritik dönemi olduğu, çiçeklerin uzun süre döllenmeden bekleyemediği, kuruyup döküldüğu kaydedilmiştir (TİGEM, 2004). Meyvelerin tek tohumlu yarım daire şeklinde, küçük, yassı bir bakla görünümünde, kenarının çıkıntı şeklinde dikenli olduğu ve meyve kabuğunun tohumun etrafını sardığı bildirilmiştir. Tohumunun fasulye şeklinde ve koyu kahverengi, 1000 tane ağırlığının 17–32 g kadar (Açıkgöz, 2001) ve optimum çimlenme ısısının 20–30 °C, çimlenme süresinin ise 4–14 gün olduğu rapor edilmiştir (TİGEM, 2004).

### 1.1.3. Korunganın Kimyasal Bileşimi

Diğer baklagillerde olduğu gibi çiçeklenme öncesinde korunganın % 20'den fazla protein iğerdiği (Çizelge 1.1), bu oranın gelişme ile birlikte azaldığı, ancak kuru ot veriminin arttığı rapor edilmiştir (Açıkgöz, 2001).

**Çizelge 1.1.** Çeşitli devrelerde biçilen korungada kimyasal kompozisyonun değişimi (%) (Açıkgöz 2001).

<b>Biçim Devresi</b>	<b>Ham Protein</b>	<b>Ham Yağ</b>	<b>Ham Selüloz</b>	<b>Azotsuz Öz Madde</b>
Çiçeklenme Öncesi	21,2	2,1	22,3	44,7
Çiçeklenme Başlangıcı	18,9	3,2	29,8	42,6
Tam Çiçeklenme	17,3	3	33,7	41,0

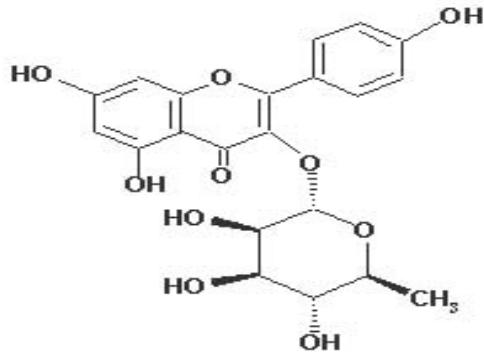
Korungada bulunan mineral maddeler Çizelge 1.2’de verilmektedir. Mineral madde yönünden diğer çayır bitkilerine göre daha zengin, fakat kalsiyum ve sodyum miktarının ise diğer baklagil yemlerine göre daha az miktarda bulunduğu kaydedilmiştir (Spedding ve Diekmahns, 1972).

**Çizelge 1.2.** Korungadaki mineral madde kompozisyonu (Spedding ve Diekmahns, 1972).

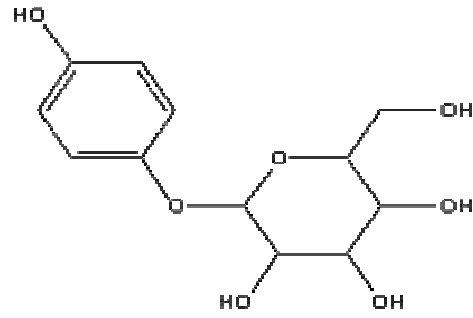
Mineral madde	Miktar (g/kg kuru madde)	Mineral madde	Miktar (mg/kg kuru madde)
Fosfor	2,0-5,5	Demir	73-360
Potasyum	11,8-36,9	Mangan	44-62
Kalsiyum	8,4-13,1	Çinko	20-41
Kükürt	2,0-3,4	Bakır	5-10,4
Sodyum	0,1-0,5	Kobalt	0,10-0,24
Klor	3,2-4,6	Molibden	0,18

Korunga yaprağı ekstraktlarının kimyasal incelemesiyle, hayvan yemi olarak besin değerine katkıda bulunmasında oynadığı rolün bir kısmına açıklık getirildiği belirtilmiştir. Nükleer manyetik rezonans spektroskopisiyle incelenmesinde 7 sinamik asit türevi, 9 flavonoid glikozidin ve düşük molekül ağırlığa sahip fenolik bileşiklerin olduğu rapor edilmiştir (Lu ve ark., 2000).

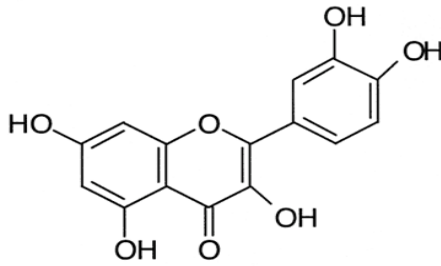
Marais ve ark., (2000)’nin sulu aseton ekstraksiyon yöntemiyle yaptığı bir çalışmada, korunga bitkisinden; afzelin (Şekil 1.3), arbutin (Şekil 1.4), kuersetin (Şekil 1.5), kaemferol (Şekil 1.6), rutin, kuersetin-3-(2(G)-ramnosilrutinoz), L-triptofan, inositol (+)-pinitol, yüksek oranda sukroz (yaklaşık ekstrakte materyalin % 35’i) ve kondanse tanenler elde edilmiştir. Korungadaki kondanse tanenlerin tahminen hetero ve homopolimerler içeren prosiyanidin ve prodelfinidin birimlerinden oluştuğu, 47:53’den 90:10’a kadar değişen oranlarda cis-trans ve 36:64’den 93:7’ye varan aralıkta delfinidin:siyanidin oranıyla oldukça yüksek değişkenlik gösterdiği vurgulanmıştır.



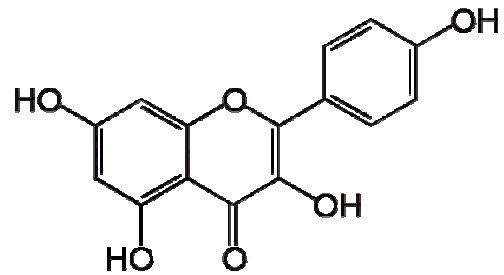
Şekil 1.3. Afzelinin kimyasal yapısı (NIAID, 2007)



Şekil 1.4. Arbutinin kimyasal yapısı (Murrey, 1991)



Şekil 1.5. Kuersetinin kimyasal yapısı (Juurlink, 2003)



Şekil 1.6. Kaemferolün kimyasal yapısı (Wikipedia, 2007)

Korungada bulunan tanenlerin, kondanse tanenler (kateşik tanenler; kateşinin kondenzasyon ürünüdürler) şeklinde bulunduğu, besleme ve kuru madde sindirilebilirliğini baskıladığından ruminantlar için antinutrisyonel olarak değerlendirilmesine rağmen, rumen ortamında mikrobiyel hidroliz ve deaminasyon ile oluşabilen protein çökmelerini engellemesi nedeniyle besleme açısından yararlı olabileceği bildirilmiştir. Özellikle timpaniye karşı korunganın koruyucu özelliğinin bulunması kondanse tanen içermesiyle ilişkilendirilmiştir (Jones ve ark., 1994).

Arbutinin, böbreklerde hidrokuinonlara çevrilirken üriner sistem üzerine antibakteriyel ya da antiseptik ajan olarak rol oynadığı, ayrıca tirozin aktivitesinin engellenmesiyle melanin sentezini önleyerek pigmentasyon önleyici ajan olarak kullanıldığı bildirilmiştir (Chemicaland21, 2004). Korungadaki flavonolların kuersetin ve kaemferol olduğu (Marais ve ark., 2000), bunların antidiaretik, antiülser ve yangı önleyici etkileri olduğu kadar hüresel proliferasyonu önleyici, enzimatik aktiviteyi ayarlayıcı ve serbest radikallerin azaltılması gibi *in vitro* biyolojik etkilerinin de bulunduğu kaydedilmiştir (Ross ve Kasum, 2002). Antioksidan, yangı

önleyici, antikarsinojen, antitrombotik, hücre ve damar koruyucu etkinliğe sahip rutin in ise kuersetin ve disakkarid rutinozdan oluşmuş bir glikozid olduğu rapor edilmiştir (PDRhealth, 2004).

Yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) ile korunga yapraklarında proantosiyanidin kompozisyonunun belirlendiği çalışmada; floroglusinolün parçalanma ürünleri olarak kateşin, epikateşin ve gallokateşinin belirlendiği, epigallokateşinin tüm aşamalarda son birim olduğu, ancak erken aşamada az da olsa kateşinin son birim olabileceği bildirilmiştir. Epigallokateşin ve gallokateşinin ağırlıklı olarak uzayan birimi oluşturduğu, kateşinin ise uzayan birime dahil olmadığı, polimerizasyonun ortalama moleküler ağırlık miktarı ve derecesinin yaprağın gelişimiyle arttığı bildirilmiştir. Cis-izomer kompozisyonunun % 83'den % 48'e azaldığı ve yaprağın olgunlaşmasıyla trihidroksillenmiş B-halkalarının oranının % 60'dan % 90'na kadar arttığı rapor edilmiştir (Koupai-Abyazani ve ark., 1993).

Yapılan bir çalışmada, korunganın tohumlarından elde edilen lektinin % 2,6 (a/a)'sını doğal karbonhidrat içeren glikoprotein ve % 6 (a/a)'sını glikozaminin oluşturduğu belirtilmektedir. Jel filtrasyon kromatografisiyle lektinin proteolitik sindiriminden elde edilen karbonhidratın, gerçek glikoproteinin % 70'ini oluşturan glikopeptid olduğu bildirilmiştir. Gaz likit kromatografisi ve aminoasit analizlerinde glikozil kısmını glukozamin, mannoz, ksiloz ve fukozun oluşturduğu belirtilmiştir. Aminoasit kısmının serin, aspartat, glutamat ve threoninden oluştuğu, glikozil kısmın peptide n-glikozidik bağla (asparajin ve glukozamin arasında) birleştiği rapor edilmiştir (Namen ve Hapner, 1979). Yine bu çalışmaya benzer başka bir incelemede; korunga tohumlarındaki lektinin aminoasit kompozisyonunun büyük bir çoğunluğunu (% 41) aspartat, glutamat, threonin ve serinin oluşturduğu bildirilmiştir (Hapner ve Robbins, 1979).

Kuersetinin hayvanlarda trombosit kümeleşmelerini, oksidatif enzimleri ve anafilaksiyi önlediği bildirilmektedir. Kuersetin ve diğer bazı flavonoidlerin ayrıca kobaylarda histamin, baryum klorür, asetilkolin (Ak), leukotrien D4, prostaglandin E2 ve elektriksel olarak uyarılan ileum kas kasılmalarını da engellediği rapor

edilmiştir. Kuersetinin etkisinin, kalsiyum kanal blokörü olan verapamil ile veya dışarıdan az miktarda verilen kalsiyumla arttırıldığı bildirilmiştir. Kuersetinin farelerde tıbbi kömürün gastrointestinal geçişini azalttığı ve bu etkinin de verapamille arttırıldığı kaydedilmiştir (Meli ve ark., 1990).

Yapılan başka bir araştırmada, kuersetinin farelere periton içi uygulanmasıyla bağırsak geçişinin önemli bir şekilde yavaşladığı, bu etkinin yohimbin ve fentolamin ile önlendiği, atropin veya naloksan ile önlenemediği kaydedilmiştir. Kuersetinin bağırsak içi sıvı birikimini ve hint yağı ile oluşturulan sürgünü azalttığı ve bu etkilerinin de yohimbin ile antagonize edildiği, sonuçta kuersetinin gastrik ülserin alanını azalttığı fakat etkisinde bir değişiklik yapmadığı, bağırsak motilitesi ve sekresyonu üzerine etkisinin  $\alpha_2$  adrenerjik reseptörler ile ilişkili olduğu vurgulanmıştır (Di carlo ve ark., 1994).

Di carlo ve ark., (1993)'nin yaptığı bir çalışmada, bazı flavonoidlerin (apigenin, flavon, kaemferol, morin, mirisetin, naringin ve rutin; 12,5–50 mg/kg) farelere periton içi uygulamasıyla ince bağırsak (% 28–69) ve kalın bağırsaktaki (% 83–134) geçişin önemli bir şekilde yavaşladığı bildirilmiştir. Diğer flavonoidler (naringenin, silibinin, silimarin ve taksifolin; 100–200 mg/kg) % 23–41 oranında bağırsak geçişini azaltırken, kateşin, hesperitin ve floridzin (200 mg/kg'a kadar)'in etki etmediği kaydedilmiştir. Yohimbinin (% 92–96) ise flavonoidlerin engelleyici etkileri üzerine antagonistik etki göstermediği, buna karşın, verapamilin flavonolların etkilerini güçlendirdiği rapor edilmiştir. Bu sonuçlara göre görülen etkiler, moleküllerin yapılarıyla,  $\alpha_2$  adrenerjik reseptörler ve kalsiyumla ilişkilendirilmiştir.

#### **1.1.4. Bitkilerle İlgili Yapılan Diğer Bazı Çalışmalar**

*Sida veronicaefolia* bitkisinin alkolik ekstraktı izole kobay ileumunda ve tavşan duodenumunda çalışılmıştır. Atropin, hekzametonyum ve mepiramin kullanılarak yapılan agonist/antagonist çalışmalarla bitkinin başlıca muskarin benzeri etkili olduğu rapor edilmiştir. Ekstraktın kimyasal incelemesinde pseudotanenler,



oligosakkaritler, flavonoidler, kolin, fruktoz, peptidler, histidin, glisin, tirozin, okzalik asit ve fenolik asitin tespit edildiği bildirilmiştir (Lutterodt, 1988).

Nijerya'nın kuzeyinde ve diğer Kuzey Afrika ülkelerinde yetişen ve solunum sistemi hastalıklarına yönelik ilaç üretilmesinde yaygın bir kullanım alanı bulan *Pavetta crassipes* bitkisinin yaprak ekstraktının izole tavşan jejunumu, kobay ileumu ve rat uterus düz kaslarının spontan motilitesi üzerinde derişime bağılı olarak önleyici etki yaptığı belirtilmiştir. Ekstraktın önleyici bu etkisinin propranolol ya da yohimbenden etkilenmediği, ancak verapamil ile tamamen bloke edildiği bildirilmiştir. Buna göre bitkinin kalsiyum kanalları boyunca etki oluşturduğu sonucuna varılmıştır. Ayrıca bitki yapraklarının flavonoidler, tanenler ve antrakuinonları içerdiği belirtilmiştir (Amos ve ark., 1998).

Tozları yara ve ülserin, dekoksasyonu sindirim sistemi hastalıklarının, kökleri de frenginin tedavisinde kullanılan *Terminalia avicennoides* bitkisinin köklerinin sıvı ekstraktı izole tavşan jejunum dokusunda ve hint yağı ile diare oluşturulmuş farelerde incelenmiştir. Yapılan bu çalışmada ekstraktın doza bağılı şekilde izole tavşan jejunumunun spontan kasılmalarını azalttığı, farelerde ise doza bağılı olarak mide bağırsak içeriği geçişini yavaşlattığı ve hint yağı ile oluşturulan diareye karşı önemli bir derecede koruma sağladığı bildirilmiştir. Farelerde ekstraktın periton içi ÖD<sub>50</sub>'sinin 871,4–917,4 mg/kg olduğu, kimyasal analizinde tanenler, saponinler ve flavonoidlerin tespit edildiği rapor edilmiştir (Abdullahi ve ark., 2001).

*Indigofera dendroides* bitkisinin yaprak ekstraktı farelerde bağırsak motilitesi ile kobay ve rat izole düz kasları üzerinde incelenmiştir. Rat ileal düz kasında kalsiyumsuz ortamda ve fizyolojik çözelti içerisinde Ak, potasyum klorür ve ekstraktın kasıcı etkileri belirlenmiştir. Çalışma sonucunda *Indigofera dendroides* yaprak ekstraktının kobay ve rat ileum üzerinde derişime bağılı olarak kasılma yanıtları oluşturduğu, bu yanıtların mepiramin, verapamil, ya da pirenzepin ile engellenmediği, atropin ile tamamen bloke edildiği, periton içi ÖD<sub>50</sub>'sinin ise 692,82 mg/kg olarak tespit edildiği bildirilmiştir (Amos ve ark., 2003).

Yapılan bir çalışmada; *Thymus piperella* yapraklarının metanol, hekzan, diklorometan ve butanol ekstraktları farmakolojik ve histolojik açıdan incelenmiştir. Tüm ekstraktların farelerdeki ağızdan akut zehirliliği denenmiş ve ÖD<sub>50</sub>'sinin 2g ekstrakt/kg canlı ağırlığından daha büyük olduğu belirtilmiştir. Hekzan ekstraktı daha güçlü olmakla birlikte, metanol, diklorometan ve butanol ekstraktlarının doza bağımlı olarak izole rat ileumunda Ak'nin kasılmalarını önemli derecede engellediği rapor edilmiştir. Buna rağmen, metanol ekstraktının izole rat aortunda ve kobay trakeasında noradrenalin ve histamin kasılmalarını değiştirmediği belirtilmiştir. Çalışma ile halk arasında kullanılan bu bitkinin özelliklerinin bir bakıma açıklandığı vurgulanmıştır (Marti ve ark., 2005).

#### 1.1.5. Korunga İle Yapılan Diğer Bazı Çalışmalar

Korunganın sindirim sistemindeki nematodlar üzerine etkisinin belirlenmesi amacıyla süt keçilerinin kullanıldığı bir çalışmada, kapalı alanda 60 keçiye 10 gün için 1,36 kg korunga, 60 keçiye ise normal kaba ot yedirilmiş ve çalışma sonunda, korunga verilen grubun dışkıdaki nematod yumurtalarının görülme sıklığının çok düşük düzeyde gözlemlendiği bildirilmiştir (Hoste ve ark., 2005).

Korunga kondanse tanenlerinin dört çeşit rumen bakterisinin gelişmesi ve proteolizisi üzerindeki etkilerinin incelendiği bir çalışmada; korunga yaprağı kondanse tanenlerinin *Butyrivibrio fibrisolvens* A38 ve *Streptococcus bovis* 45S1'in proteaz aktivitelerini ve gelişmelerini engellediği fakat *Prevotella ruminicola* B14 ya da *Ruminobacter amylophilus* WP225 üzerine etkilerinin ise daha az olduğu bildirilmiştir. *B. fibrisolvens* ve *S. bovis*'in hücre duvarındaki morfolojik değişikliklerin tanenin zehirliliğinden kaynaklandığı ve tanenlerin bakterilerin hücre tabaka polimerlerine bağlandığı belirtilmiştir (Jones ve ark., 1994).

Paolini ve ark., (2004)'nın yaptıkları bir çalışmada; 3 odunumsu bitkinin (*Rubus fruticosus*, *Quercus robur*, *Corylus avellana*) *trichostrongyles*'ler üzerine etkileri, baklagil bitkisi olan korunga ile karşılaştırılarak incelenmiştir. Bu bitkilerden elde

edilen ekstraktların parazit türlerine ve aşamalarına olan etkisine bakılmıştır. Odunumsu bitkilerin abomasumda ki türlerin etkinliğini önemli derecede engellediği bildirilmiştir. Korunganın *T. colubriformis* ve *H. contortus* L3 ve abomasumdaki erişkin solucanlar üzerine önemli etkiler yaptığı rapor edilmiştir. Ayrıca tanenlerin etkinliğini belirlemek için engelleyici etkisi olan polietilen glikol (PEG) fındık ağacı, meşe ve korunga ekstraktlarına ilave edilmiştir. PEG'siz olanlarda L3 ve ergin solucanlar üzerine engelleyici etkilerinin önemli bulunduğu, PEG ilave edildikten sonra ise çoğu kez erginlerin çoğalmas ve larval üremenin yeniden canlandığı bildirilmiştir. Görülen bu etkilerin parazit ve bitkilerle ilişkili olan faktörlere bağlı olduğu ve bu faktörler içerisinde tanenlerin de rol aldığı vurgulanmıştır.

Keçilerde 3. aşama larva dönemi ile başlatılan *Haemonchus contortus* enfeksiyonu üzerine, quebracho ve korunga otunun etkisinin incelendiği diğer bir çalışmada iki bitkinin de *H. contortus* L3 üzerine etkili olduğu ve nematod sayısında sırasıyla % 33 ve % 38'lik azalma meydana getirdikleri rapor edilmiştir. Çalışma sonucunda tanenin etkisinin parazit aşamalarına değil, türleri üzerinde etkili olduğu bildirilmiştir (Paolini ve ark., 2005).

Kurutulmuş korunga otu ile silajlanmış korunganın antiparaziter etkisinin araştırıldığı bir çalışmada (Heckendorn ve ark., 2006) koyunlarda deneysel olarak oluşturulan *Haemonchus contortus* (abomasum) ve *Cooperia curticei* (ince bağırsak) enfestasyonlarına karşı korunganın etkili olabileceği bildirilmiştir. Korunganın antiparaziter etkisinin içeriğinde bulunan tanenden ileri geldiği rapor edilmiştir. Barrau ve ark., (2005) ise *Haemonchus contortus* L3 üzerine *in vitro* olarak yaptıkları çalışmada korunganın antiparaziter etkisinin içeriğinde bulunan kondanse tanenler yanında flavonol glikozidlerinden (rutin, nikotiflorin, narsissin) de kaynaklanabileceği sonucuna varmışlardır.

Korunganın köklerinin derine gitmesi, fakir topraklarda dahi yetişmesi, toprakta serbest olmayan fosforu serbest duruma getirmesi nedeniyle, özellikle buğdaygil yem bitkileri ile birlikte kullanılan iyi bir toprak ıslah bitkisi olduğu bildirilmiştir. Kök sisteminde yaşayan *Rhizobium* bakterileri sayesinde havanın serbest azotunu tespit

ederek kendisinden sonra gelen bitkiye çok elverişli bir toprak bırakabileceği ve ayrıca bu bitkiden erozyon kontrolünde de etkili bir şekilde faydalanılacağı belirtilmektedir. Korunganın bol miktarda bal özü vermesi nedeniyle aynı zamanda iyi bir arı merası olabileceği de ileri sürülmüştür. Ülkemizde de yaygın olarak yetişen korunga, hayvan beslemede önemli bir yer tutmaktadır. Bu bitkinin ülkemizde hayvan besleme alanında önemine ilişkin çalışmalar olmasına karşın *in vitro* ortamlarda farmakolojik etkilerine yönelik bir çalışma bulunmamaktadır. Korunganın içeriğinde bulunan tanenlerin, tek başlarına bağırsaklar üzerine büzüştürücü etki yaptıkları ve sindirim kanalı salgılarını azalttıkları, flavonoidlerin ise gevşettikleri bilinmektedir. Ayrıca birçok çalışma ile (Paolini ve ark., 2004; Barrau ve ark., 2005; Hoste ve ark., 2005; Paolini ve ark., 2005; Heckendorn ve ark., 2006) korunga otunun bağırsak üzerinde yaşayan nematodlar üzerine etkili olduğu ve doğal antelmentik madde olarak değerlendirilmeye alındığı da belirtilmektedir.

Bu çalışmada amaç, hayvan beslemede yaygın şekilde kullanılan korunga bitkisinin (*Onobrychis viciifolia*) ekstraksiyonla içeriğini belirlemek, *in vitro* olarak fare jejunum ve ileumunda çeşitli agonist (Ak, betanekol) ve antagonistleri (atropin) kullanarak etkilerini değerlendirmek ve ağızdan akut öldürücü dozunu belirlemektir. Böylece önemli bir kaba yem bitkisi olan korunganın fareler kullanılarak memelilerin sindirim kanalına olan etkisi ve olası zehirliliği üzerine bir fikir edinilmesi mümkün olabilecektir.

## 2. GEREÇ VE YÖNTEM

### 2.1. Araç ve Gereçler

#### 2.1.1. Bitki Materyali

Korunga bitkisi materyali Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarla Bitkileri Bölümünden 2005 yılı mayıs ve temmuz ayları arasında temin edildi. Korunga bitkisi, çiçeklenme döneminde, topraktan 5 cm yukarıda, yaklaşık 30–40 cm uzunluğunda alındı. Daha sonra gövde ve yaprakları distile suyla yıkandı, küçük parçalara kesilerek oda ısısında kurutuldu ve öğütülerek toz haline getirildi. Toz halindeki bitki, ışık görmeyen ortamda, içinde nem çekici özelliğe sahip susuz kalsiyum klorür bulunan desikatöre konularak analiz için saklandı.

#### 2.1.2. Deney Hayvanları

Çalışmada, 25–35 g ağırlığında Wistar Albino soyu, öldürücü doz çalışması için 60 dişi ve 60 erkek, farmakodinami çalışması için ise 18 erkek fareden oluşan, en az 2 aylık toplam 138 adet fare kullanıldı. Farelere  $23 \pm 2$  °C sıcaklıkta barınma koşulları sağlandı. Besin maddesi olarak her gün, 5 mm'lik pelet yem (% olarak, Kuru madde: 88; Ham protein: 12; Ham kül: 9; Ham selüloz: 14 ve Metabolik enerji: 2500 Kcal/kg) ve temiz içme suyu *ad libitum* (serbestçe) verildi. Denemelere başlanmadan 24 saat önce fareler aç bırakıldı. Çalışma ile ilgili Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Etik Kurulu'ndan onay alındı.

#### 2.1.3. Deney Araçları

Evaporatör (Büchi Rotavapor, R-110)

Sokselet cihazı

pH metre (Mod. 390 WTW Messgerät)

Santrifüj cihazı (Heraeus Labofuge 200)

Desikatör

İzole Organ Banyosu

TDA 97 polygraph sistem (MAY)

FDT-10A izometrik gerim ileticisi (MAY)

WBC 3446V2 su banyosu ve sirkülasyon sistemi (MAY)

Bilgisayar

% 95 O<sub>2</sub>, % 5 CO<sub>2</sub> içeren gaz karışım tüpü

Hassas terazi (Sartorius Basic BA110S)

Otomatik pipetler (Jencons – Sealpette; 10–100 µl)

(Biohit Proline – Isolab; 100–1000 µl)

Cam malzemeler {Erlenmayer (50-100 ml), beher (25-50-100 ml), petri kutusu, mezür, ağzı rodajlı balon, tüp}

Cerrahi malzemeler (pens, makas, ip)

Ependorf tüpü

Enjektör (1 ve 10 ml'lik)

Distile su cihazı

#### 2.1.4. Kimyasal Maddeler

Amonyum hidroksit (% 25): Merck 105422

Asetik asit (CH<sub>3</sub>COOH) (% 100): J.T.Baker 6003

Asetilkolin klorür {(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>N<sup>+</sup>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OCOCH<sub>3</sub>Cl}: Sigma A 6625

Atropin sülfat {(C<sub>17</sub>H<sub>23</sub>NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>.H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>): Sigma A 0257

Bakır sülfat pentahidrat (CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O): Merck 102792

Betanekol (C<sub>7</sub>H<sub>17</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>Cl): Sigma 5259

Bizmut(III)-nitrat (Bi<sub>5</sub>H<sub>9</sub>N<sub>4</sub>O<sub>22</sub>): Merck 101878

Civa-II-klorür (HgCl<sub>2</sub>): Merck 104419

D (+)-Glikoz monohidrat (C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>O<sub>6</sub>.H<sub>2</sub>O): Merck 104074

D-Arjinin monohidroklorid (C<sub>6</sub>H<sub>14</sub>N<sub>4</sub>O<sub>2</sub>HCl): Sigma A6757

Demir-III-klorür (FeCl<sub>3</sub>): Merck 803945

Distile su

DL-Metiyonin  $\{\text{CH}_3\text{SCH}_2\text{CH}_2\text{CH}(\text{NH}_2)\text{COOH}\}$ : Sigma M9500  
Etanol ( $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ ): Merck 100983  
Folin-ciocalteu ayracı: Merck 109001  
Hidroklorik asit ( $\text{HCl}$ ) (% 37): J.T.Baker 6081  
Histamin dihidroklorid ( $\text{C}_5\text{H}_9\text{N}_3 \cdot 2\text{HCl}$ ): Sigma H 7250  
İTK tabakaları (20×20 cm silika jel G-60): Merck 105721  
Jelatin: Merck 104078  
Kalsiyum klorür ( $\text{CaCl}_2$ ) (% 95): Riedel-de Haen 12018  
Kloroform ( $\text{CHCl}_3$ ): Merck 102445  
Kolin klorid  $\{(\text{CH}_3)_3\text{N}(\text{Cl})\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}\}$ : Sigma C 7017  
Kurşun asetat  $\{\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2\}$ : Merck 107372  
L-lizin  $\{\text{H}_2\text{N}(\text{CH}_2)_4\text{CH}(\text{NH}_2)\text{CO}_2\text{H}\}$ : Sigma L 5501  
Magnezyum klorür heksahidrat ( $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ): Merck 105891  
N-butanol  $\{\text{CH}_3(\text{CH}_2)_3\text{OH}\}$ : Merck 100988  
Nikotin hidrojen tartrat ( $\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{N}_2 \cdot 2\text{C}_4\text{H}_6\text{O}_6$ ): Sigma N 5260  
Ninhidrin ( $\text{C}_9\text{H}_6\text{O}_4$ ): Merck 159655  
Platin-II-klorür ( $\text{Cl}_2\text{Pt}$ ): Merck 824566  
Potasyum ferrisiyanür  $\{\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6\}$ : Merck 104971  
Potasyum iyodür ( $\text{KI}$ ): Merck 105040  
Potasyum klorür ( $\text{KCl}$ ): Merck 104935  
Rezorsinol ( $\text{C}_6\text{H}_6\text{O}_2$ ): Merck 107593  
Sodyum bikarbonat ( $\text{NaHCO}_3$ ): J.T.Baker 0263  
Sodyum dihidrojenfosfat dihidrat ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ): Merck 106345  
Sodyum hidroksit ( $\text{NaOH}$ ): Merck 106498  
Sodyum klorür ( $\text{NaCl}$ ): Merck 116104  
Sodyum potasyum tartrat ( $\text{C}_4\text{H}_4\text{KNaO}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ): Merck 108087  
Susuz kalsiyum klorür ( $\text{CaCl}_2$ ): Merck 102389  
Sülfürik asit ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) (% 96): Carlo Elba 306657  
Tannik asit: Merck 100773  
Vanillin ( $\text{C}_8\text{H}_8\text{O}_3$ ): Merck 818718

### 2.1.5. Kimyasal Maddelerin ve Ayıraçların Hazırlanması

*Amonyak alkol (% 10):* 1 kısım % 25'lik amonyum hidroksit çözeltisi + 9 kısım etil alkol şeklinde hazırlandı.

*Demir klorür çözeltisi (% 1):* 1 g demir-III-klorür distile suda çözdürüldü ve distile su ile 100 ml'ye tamamlandı.

*Mayer's ayıracı:* 1,4 g civa klorür ve 5 g potasyum iyodür distile suda çözdürüldü ve distile su ile 100 ml'ye tamamlandı.

*Dragendorff's ayıracı:* a: 0,2 g bizmut subnitrat + 2,5 ml asetik asit distile su ile 10 ml'ye tamamlandı. B: 4 g potasyum iyodür 10 ml distile suda çözdürüldü; 10a + 10b + 20 ml asetik asit karışımı distile su ile 100 ml'ye tamamlandı.

*Kurşun asetat çözeltisi (% 10):* 10 g kurşun asetat distile suda çözdürüldü ve distile su ile 100 ml'ye tamamlandı.

*Fehling çözeltisi:* 1 ml Fehling A (69,38 g bakır sülfat pentahidratın 1 L distile sudaki çözeltisi) + 1ml Fehling B ( 250 g sodyum hidroksit distile suda çözdürüldü ve üzerine 346 g sodyum potasyum tartrat ilave edilerek distile su ile 1 L'ye tamamlandı) karışımıyla hazırlandı.

*Seliwanoff's ayıracı:* 4 M hidroklorik asitin 1 L'deki çözeltisine 0,5 g rezorsinol katılarak hazırlandı.

*Ninhidrin ayıracı:* 1,5 g ninhidrin 5 ml asetik asitle çözdürülüp % 95'lik etanol ile 500 ml'ye tamamlandı.

*İodoplatinat ayıracı:* 0,125 g platin klorür 1,25 ml distile suda çözdürüldü. 2,5 ml % 30'luk potasyum iyodür ilave edildi ve distile su ile 25 ml'ye tamamlandı. Daha sonra içerisine 0,5 ml hidroklorik asit katıldı.

*Demir-III-klorür/potasyum ferri siyanür çözeltisi:* Maddelerin distile su ile % 1'lik çözeltileri hazırlandı ve 1:1 oranında karıştırıldı.

*Tannik asit çözeltisi (% 10):* 10 g tannik asit distile suda çözdürüldü ve distile su ile 100 ml'ye tamamlandı.



*Vanillin/hidroklorik asit çözeltisi:* 10 ml konsantre hidroklorik asit içerisinde 1 g vanillinin çözündürülmesiyle hazırlandı.

*Vanillin/sülfürik asit çözeltisi:* % 10'luk etanolde hazırlanmış vanillinin, konsantre sülfürik asit ile 2:1 oranında karıştırılmasıyla hazırlandı.

*Jelatin çözeltisi (% 1):* 1 g jelatin distile suda çözündürüldü ve distile su ile 100 ml'ye tamamlandı.

*Fizyolojik tuzlu su:* % 0,85'lik sodyum klorür çözeltisidir.

*Biüret ayıracı:* 10 ml dilue sodyum hidroksit çözeltisi içerisine 2 damla dilue bakır sülfat çözeltisinin katılmasıyla hazırlandı.

*Bakır sülfat çözeltisi (% 1):* 0,1 g bakır sülfat distile suda çözündürüldü ve distile su ile 100 ml'ye tamamlandı.

*Sodyum hidroksit çözeltisi (% 10):* 10 g sodyum hidroksit distile suda çözündürüldü ve distile su ile 100 ml'ye tamamlandı.

*Asetilkolin klorür:* Distile suda 0,1 M stok çözeltisi günlük olarak hazırlandı ve distile su ile hazırlanan sulandırmaları kullanıldı.

*Betanekol:* Distile suda 0,1 M stok çözeltisi günlük olarak hazırlandı ve distile su ile hazırlanan sulandırmaları kullanıldı.

*Atropin sülfat:* Distile suda 0,1 M stok çözeltisi günlük olarak hazırlandı ve distile su ile hazırlanan sulandırmaları kullanıldı.

*Nikotin hidrojen tartrat:* Distile suda 0,1 M stok çözeltisi günlük olarak hazırlandı ve distile su ile hazırlanan sulandırmaları kullanıldı.

*Histamin dihidroklorid:* Distile suda 0,1 M stok çözeltisi günlük olarak hazırlandı ve distile su ile hazırlanan sulandırmaları kullanıldı.

### **2.1.6. Tyrode Çözeltisinin Bileşimi**

Sodyum klorür (NaCl): 136,9 mmol

Potasyum klorür (KCl): 2,68 mmol

Kalsiyum klorür ( $\text{CaCl}_2$ ): 1,8 mmol

Magnezyum klorür heksahidrat ( $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ): 1,05 mmol

Sodyum bikarbonat ( $\text{NaHCO}_3$ ): 11,9 mmol

Sodyum dihidrojenfosfat dihidrat ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ): 0,4 mmol

D (+)-Glikoz monohidrat ( $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ): 5,5 mmol

Distile su

## **2.2. Yöntem**

### **2.2.1. Bitkinin Ekstraksiyonu**

Ekstraksiyon işlemi Lutterodt (1988)'un bildirdiği yöntemle yapıldı. 300 g toz edilmiş bitkinin üzerine 2 L % 95'lik etanol ilave edildi ve 90–100 °C de Soxhlet cihazında ekstrakte edildi. Elde edilen ekstrakt evaporatörde uçuruldu ve 6 defa 50 ml ılık distile su ile yıkanarak sıvı kısmı ayrıldı. Ayrılan sıvı kısım dakikada 1600 devirde 10 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası elde edilen ekstraktın pH'sı 0,2 N'lik sodyum hidroksit ile 7,4 olacak şekilde ayarlandı. Bu ekstrakt distile su ile (stok çözelti) 1000 mg/ml olacak şekilde tamamlandı ve deneylere kadar derin dondurucuda saklandı. Deneylerde kullanılacak sulandırmalar distile su kullanılarak hazırlandı.

### **2.2.2. Bitkinin Organik Fosforlu ve Karbamat Türevi İnsektisid, Aflatoksin B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub>, G<sub>2</sub> ve Okratoksin Yönünden Analizi**

Çalışma için kullanılacak korunga bitkisinin organik fosforlu ve karbamat türevi insektisid, aflatoksin B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub>, G<sub>2</sub> ve okratoksin kirliliği yönünden analizleri, Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalı Laboratuvarı'nda, Kaya (2006) tarafından bildirilen ince tabaka kromatografisi (İTK) esasına dayanan yöntemlerden yararlanılarak yapıldı.

### 2.2.3. Bitkinin Fitokimyasal Analizleri

Korunga bitkisinin kimyasal incelemesinde; alkaloidlerin, saponinlerin, tanenlerin, peptid/proteinlerin, şekerlerin, aminoasitlerin, fenoller ve fenolik asitlerin, kolin ve flavonoidlerin varlığı araştırıldı. Analizler Harborne (1973) ve Lutterodt (1988)'un bildirdiği yöntemlere göre yapıldı.

a) *Alkaloid aranması*: 50 g toz materyale amonyak alkol katıldı, karıştırıldı, süzülerek filtrat alındı ve uçuruldu. Uçurulan kalıntının üzerine % 1'lik sülfürik asit ilave edilip karıştırıldı ve süzüldü. Karışım üzerine kloroform ilave edilerek karıştırıldı ve kloroform tabakası ayrılarak evaporatörde uçuruldu. Uçurulan materyalin üzerine % 1'lik sülfürik asit ilave edilip çözdürüldü. Alkaloid aranması için kullanılan genel test ayraçları; Mayer's, Dragendorff's ve tannik asit çözeltileri uygulandı (Lutterodt, 1988).

b) *Saponin aranması*: Saponin varlığında oluşan köpükleşmeyi belirlemek için, 1 g toz bitki distile su bulunan test tüpü içine konulup karıştırıldı. Hemoliz testi; 0,1 ml sitratlı kan bulunan 2 test tüplerinden birine 0,5 ml ekstrakt diğerine 0,5 ml normal fizyolojik tuzlu su konuldu. İki tüpte oda ısısında 2 dakika santrifüj edildi ve hemolizin olup olmadığı belirlendi (Lutterodt, 1988).

c) *Tanenlerin aranması*: 0,5 g toz edilmiş bitki, 25 ml distile su içerisinde 5 dakika kaynatıldıktan sonra soğutulup filtre edilerek sırasıyla; a) 1 ml filtrat distile suyla 10 ml'ye tamamlandı ve 5 damla % 10'luk kurşun asetat çözeltisi ilave edilerek, çökmeye tanenlerin varlığı, b) 10 ml'lik bu filtrata % 1'lik demir klorür çözeltisinin damlatılmasıyla pseudotanenlerin varlığı, c) 3 ml % 1'lik jelatin çözeltisi 5 ml'lik filtrata katılarak gerçek tanenlerin varlığı incelendi (Lutterodt, 1988).

d) *Peptitler ve proteinlerin aranması*: Ekstrakt biüret deneyine tabi tutuldu. Bunun için tüp içerisine 1 ml ekstrakt ve 1 ml %10'luk sodyum hidroksit çözeltisi konuldu. Tüp çalkalanarak üzerine birkaç damla %0,1'lik bakır sülfat çözeltisi eklendi.

Menekşe rengin oluşup oluşmadığına bakıldı (Lutterodt, 1988). Ayrıca araştırmada kullanılan korunga bitkisinin ham protein miktarı, Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Hayvan Besleme ve Beslenme Hastalıkları Anabilim Dalı Laboratuvarı'nda Association of Official Analytical Chemists (AOAC) (1990)'de bildirilen yöntemlere göre belirlendi.

e) *Şekerlerin aranması*: Fehling çözeltisi içerisinde 1 g toz edilmiş bitkinin kaynatılmasıyla yapıldı. Ayrıca Seliwanoff's testi uygulanarak ketohekzoslara bakıldı. Bunun için tüp içerisine 5 ml Seliwanof's ayıracı konuldu. Üzerine 5–6 damla ekstrakt ilave edildi. Tüp, su banyosunda ısıtıldı ve oluşan kırmızı renk ile sukroz varlığı araştırıldı (Lutterodt, 1988).

Aminoasitlerin, fenoller ve fenolik asitlerin, kolin ve flavonoidlerin aranması için toz edilmiş bitki 2 M hidroklorik asit ile 30–40 dakika 100 °C de bekletildi. Soğutulan çözelti etil asetatla 2 kere ekstrakte edildi ve birleştirildi. Birleştirilen ekstrakt evaporatörde uçuruldu ve küçük miktarda etanol ile çözdürülerek kromatografiye uygulandı (Harborne, 1973).

f) *Aminoasitlerin aranması*: Sıvı alkolik ekstrakt İTK (silika jel G-60)'ya uygulandı, n-butanol/asetik asit/su (4:1:5 oranında) solvent sistemi ile geliştirildi ve ninhidrin ayıracı püskürtüldü. Plaka 10 dakika 105 °C de ısıtıldı. Rf değeri ve lekelerin renkleri referans aminoasit hızlarıyla ve renkleriyle aynı plakada karşılaştırıldı (Harborne, 1973).

g) *Fenoller ve fenolik asitlerin aranması*: Ekstrakt İTK (silika jel G-60)'ya uygulandı ve asetik asit/kloroform (1:9 oranında) solvent sistemi ile geliştirildi. Daha sonra 3 farklı ayıraç: a) Folin-ciocalteu ayıracı püskürtüldü ve amonyak buharına tutuldu (katekol ve hidrokuinonlar için) b) vanillin/hidroklorik asit çözeltisi (orsinol ve rezorsinol gibi basit fenolik bileşiklerin belirlenmesi için); ve c) vanillin/sülfürik asit çözeltisi (florglusinol türevlerini belirlemek için) püskürtüldü ve renk değişimlerine bakıldı (Harborne, 1973).

*h) Kolin aranması:* Kurutulmuş alkolik ekstrakt, suda ve kloroformda çözdürülerek, İTK (silika jel G-60)'ya uygulandı. N-butanol/asetik asit/su (4:1:5 oranında) çözeltisinde geliştirildi. Dragendorff's ve iodoplatinat ayıraçları püskürtülerek incelendi (Harborne, 1973).

*l) Flavonoidlerin aranması:* Ekstrakt plakaya ekilerek, n-butanol/asetik asit/su (4:1:5 oranında) solvent sistemi ile geliştirildi. Plaka; a) amonyak buharına tabi tutulan şekli ve tutulmayan şekliyle uzun ve kısa UV fluoressan dalga boylarında; b) plakaya demir-III-klorür/potasyum ferri siyanür çözeltisi ve c) Folin-ciocalteu ayırıcı püskürtülerek incelendi (Harborne, 1973).

#### 2.2.4. Akut Zehirlilik Denemesi

Bu çalışma için toplam 120 fare kullanıldı. Ekstrakt uygulanmadan 24 saat önce hayvanlar aç bırakıldı. Su *ad libitum* olarak verildi. Çalışma, ön deneme sonuçlarına göre belirlenen 6 doz halinde ve ağızdan tek seferde uygulandı. Her doz miktarı için 10 erkek ve 10 dişiden oluşan 20 hayvan kullanıldı. Ekstrakt uygulanmasını takiben, hayvanlar 48 saat süreyle klinik belirtiler yönünden izlendi (Doull ve ark., 1975). Bu süre içinde ölen hayvanların sayısı belirlenerek probit analizine göre ÖD<sub>50</sub>'si belirlendi. Dişi ve erkek farelere mide sondası ile uygulanan doz miktarları Çizelge 2.'de verilmiştir.

**Çizelge 2.** Hayvan grupları ve ekstrakt çözeltilerinin miktarları.

Dişi hayvan grupları (n: 10)	Ağızdan verilen doz miktarı (mg/kg)	Erkek hayvan grupları (n: 10)	Ağızdan verilen doz miktarı (mg/kg)
1.	28500	1.	28500
2.	25500	2.	23000
3.	23000	3.	20000
4.	20000	4.	17000
5.	18500	5.	14000
6.	17000	6.	11000

### 2.2.5. Farmakodinami Çalışması

Yaklaşık 25–35 g ağırlığındaki toplam 18 adet en az 2 aylık erkek fareler deneylere başlamadan bir gece önce aç bırakılarak sadece su verildi. Hayvanlar eter anestezisi altında servikal dislokasyon yöntemi ile uyutuldu.

Hayvanın karın boşluğu, sternumdan başlayarak ventrale doğru ve göğüs kafesinin karın boşluğuna birleştiği hat boyunca yanlara doğru “T” şeklinde açıldı. İnce bağırsağın tamamı, iliosekal bağlantı ve pilorus kısımlarından ve çevre dokularla olan bağlantılarından kesilerek % 95 O<sub>2</sub>, % 5 CO<sub>2</sub> gaz karışımıyla zenginleştirilmiş Tyrode çözeltisi bulunan bir petriye alındı. İlgili ince bağırsak segmentleri tespit edilip mezenteriyum ve pankreas gibi çevre doku kalıntılarından temizlendi. Yaklaşık 1 cm uzunluğunda kesilen ince bağırsak parçaları daha önceden hazırlanmış ve içinde 15 ml Tyrode çözeltisi (37 °C; pH 7,4) bulunan 4 gözlü izole organ banyosuna, her bir dokudan ikişer adet ve her iki ucu kapalı olacak şekilde bağlanarak, 1 g gerim verilerek asıldı. Deney boyunca dokuya % 95 oksijen ve % 5 karbondioksit gaz karışımı uygulandı. Gün içinde çalışmayı bekleyen bağırsak parçaları ise Tyrode çözeltisi içinde buzdolabında (1–4 °C) deneme anına kadar saklandı (Blattner ve ark., 1978).

Bir saat süreyle dengelenmeye bırakılan doku, her 15 dakikada bir Tyrode çözeltisi ile 3 kez yıkandı. Dengelenme sonrasında deneylere başlanarak elde edilen kasılmalar ve gerimdeki değişimler izometrik gerim ileticisi aracılığı ile ölçüldü ve bilgisayara kaydedildi. Elde edilen yanıtların değerlendirilmesi, söz konusu ilaçların EC<sub>50</sub> parametrelerinin karşılaştırılması ile yapıldı. En yüksek kasılmada elde edilen değer % 100 kabul edilerek, diğer derişimlerde elde edilen kasılmaların % değerleri hesaplandı. Bu hesaplar, “SPSS 11,5” paket programı kullanılarak istatistiksel olarak değerlendirildi.

## 2.2.6. Protokoller

### 2.2.6.1. Fare Jejunumu ve İleumu Üzerine Ekstraktın Etkisinin Tek Başına Araştırılması

Dokular organ banyosunda dengelendikten sonra ekstrakt her seferinde 2 katı artışla 0,1; 0,2; 0,4; 0,8; 1,6; 3,2 ve 6,4 mg/ml derişim aralığında ve her bir doz aralığı 3 dakika olacak şekilde kümülatif olarak hem jejunum hem de ileum dokusuna ayrı ayrı uygulandı. Dokular 15 dakika arayla 3 defa yıkanması koşuluyla belirtilen her bir derişim bireysel olarak hem jejunum hem de ileum dokusuna ayrı ayrı uygulandı. Dokulara uygulanan ekstrakt miktarları literatür incelemesi (Amos ve ark., 1998; Vongtau ve ark., 2000; Abdullahi ve ark., 2001; Amos ve ark., 2003) ve ön denemeleri yapıldıktan sonra uygulanmasına karar verildi.

### 2.2.6.2. Fare Jejunumu ve İleumu Üzerine Ak'nin Etkisinin Tek Başına Araştırılması

Dokular organ banyosunda dengelendikten sonra Ak her seferinde 0,5 log artışla  $10^{-8}$ – $10^{-4}$  M derişim aralığında ve her bir doz aralığı 3 dakika olacak şekilde kümülatif olarak hem jejunum hem de ileum dokusuna ayrı ayrı uygulandı. Elde edilen yanıtların  $pD_2$ ,  $E_{max}$  ve  $EC_{50}$  değerleri hesaplandı.

### 2.2.6.3. Fare Jejunumu ve İleumu Üzerine Betanekolün Etkisinin Tek Başına Araştırılması

Dokular organ banyosunda dengelendikten sonra betanekol her seferinde 0,5 log artışla  $10^{-8}$ – $10^{-4}$  M derişim aralığında ve her bir doz aralığı 3 dakika olacak şekilde kümülatif olarak hem jejunum hem de ileum dokusuna ayrı ayrı uygulandı. Elde edilen yanıtların  $pD_2$ ,  $E_{max}$  ve  $EC_{50}$  değerleri hesaplandı.

Ayrıca hem Ak (protokol 2.2.6.1.) hem de betanekolün (protokol 2.2.6.2.) jejunum ve ileum dokuları üzerindeki  $E_{max}$  değerlerinin karşılaştırılması yapıldı.

#### **2.2.6.4. Fare Jejunumu ve İleumu Üzerine Ekstraktın Etkisinin Ak $EC_{50}$ Miktarı ile Birlikte Araştırılması**

Dokular organ banyosunda dengelendikten sonra jejunum ve ileum için sırasıyla Ak'nin  $EC_{50}$  miktarı olan ( $2,11 \times 10^{-5}$  M;  $5,10 \times 10^{-6}$  M) derişimler ayrı ayrı uygulandı. Dokunun yanıtları alındıktan sonra, 15 dakika ara ile doku 3 kez yıkandı. Daha sonra doku ekstrakt (ön deneme sonuçlarına göre etki göstermeyen derişim olan 3,2 mg/ml değeri ile en iyi gevşemeyi veren derişim -6,4 mg/ml- ve etki göstermeyen derişimi arasında olan 4,8 mg/ml değerinin uygulamalarda kullanılmasına karar verildi) ile 10 dakika süreyle inkübe edildi, üzerine Ak  $EC_{50}$  derişimleri uygulandı. Elde edilen yanıtların % değerleri hesaplandı.

#### **2.2.6.5. Fare Jejunumu ve İleumu Üzerine Ekstraktın Etkisinin Betanekolün $EC_{50}$ Miktarı ile Birlikte Araştırılması**

Dokular organ banyosunda dengelendikten sonra jejunum ve ileum için sırasıyla betanekolün  $EC_{50}$  miktarı olan ( $2,04 \times 10^{-5}$  M;  $1,24 \times 10^{-5}$  M) derişimler ayrı ayrı uygulandı. Dokunun yanıtları alındıktan sonra, 15 dakika ara ile doku 3 kez yıkandı. Daha sonra doku ekstrakt (ön deneme sonuçlarına göre etki göstermeyen derişim olan 3,2 mg/ml değeri ile en iyi gevşemeyi veren derişim -6,4 mg/ml- ve etki göstermeyen derişimi arasında olan 4,8 mg/ml değerinin uygulamalarda kullanılmasına karar verildi) ile 10 dakika süreyle inkübe edildi, üzerine betanekolün  $EC_{50}$  derişimleri uygulandı. Elde edilen yanıtların % değerleri hesaplandı.

#### **2.2.6.6. Fare Jejunumu ve İleumu Üzerine Ekstraktın Etkisinin Atropin ile Birlikte Araştırılması**



Dokular organ banyosunda dengelendikten sonra ekstraktın en iyi gevşeme cevabı veren 6,4 mg/ml’lik miktarı 10 dakika süre ile hem jejunum hem de ileum dokusuna ayrı ayrı uygulandı. Dokunun yanıtları alındıktan sonra, 15 dakika ara ile doku 3 kez yıkandı. Daha sonra doku atropin (ön deneme sonuçlarına göre etki gösteren  $10^{-6}$  M derişiminin etki göstermeyen iki alt değeri olan  $10^{-7}$  M ve  $10^{-8}$  M derişimlerinin uygulamalarda kullanılmasına karar verildi) ile 10 dakika süreyle inkübe edildi, üzerine ekstraktın 6,4 mg/ml’lik derişimi uygulandı. Elde edilen yanıtların % değerleri hesaplandı.

#### **2.2.6.7. Fare Jejunumu ve İleumu Üzerine Nikotin ve Histaminin Etkilerinin Tek Başlarına Araştırılması**

Dokular organ banyosunda dengelendikten sonra nikotin ve histamin her seferinde 0,5 log artışla  $10^{-8}$ – $10^{-4}$  M derişim aralığında ve her bir doz aralığı 3 dakika olacak şekilde kümülatif olarak hem jejunum hem de ileum dokusuna ayrı ayrı uygulandı. Dokuların 15 dakika arayla 3 defa yıkanması koşuluyla belirtilen her bir derişim bireysel olarak hem jejunum hem de ileum dokusuna ayrı ayrı uygulandı.

#### **2.2.7. İstatistiksel Analiz**

İstatistiksel hesaplamalarda “SPSS 11,5” (SPSS, 2002) ve grafik çiziminde “GraphPad Prism version 4,00 for Windows” (Graphpad, 2006) paket programı kullanıldı. Çalışmadan elde edilen veriler aritmetik ortalama ve standart hata şeklinde ifade edildi. Ak ve betanekol kontrolü ile ilaçların tek başlarına veya bitki ekstraktı ile bir arada, atropin ile ekstraktın birlikte uygulanması denemelerinde karşılaştırılacak ikili gruplarda T testi (One sample T test) kullanıldı. Ak ve betanekolün etkilerinin jejunum ve ileum bölümleri arasındaki farklarının kıyaslanmasında Mann-Whitney U testi kullanıldı. İstatistiksel olarak önemlilik  $p<0,05$  şeklinde ifade edildi. Akut zehirlilik denemesinde  $ÖD_{50}$  değerinin hesaplanmasında probit analizi (SPSS, 2002) kullanıldı.

### 3. BULGULAR

#### 3.1. Bitki Ekstresinin Analiz Bulguları

Korunga bitkisinin alkolde ekstraksiyonu yapıp, kalan alkolün uçurulmasından sonra yeşilimsi siyah renkte, nemli, % 9,5 (a/a) (elde edilen ekstraktın ağırlığı/toz edilmiş bitkinin ağırlığı) oranında ekstrakt elde edildi. Eldeki ekstrakt distile su ile yoğunluğu 1 g/ml olacak şekilde ayarlandı ve değişik seyreltmeleri denemelerde kullanıldı.

#### 3.2. Bitkinin Organik Fosforlu ve Karbamat Türevi İnsektisid, Aflatoksin B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub>, G<sub>2</sub> ve Okratoksin Yönünden Analiz Bulguları

Yapılan analizler neticesinde korunga bitkisinde organik fosforlu ve karbamat türevi insektisid, aflatoksin B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub>, G<sub>2</sub> ve okratoksin kirliliği gözlenmedi.

#### 3.3. Bitkinin Fitokimyasal Analiz Bulguları

Toz ve ekstrakte edilmiş bitkinin fitokimyasal incelemesinde, kurşun asetat çözeltisinin damlatılmasıyla görülen çökme ile tanenler; demir klorür çözeltisinin damlatılmasıyla da yeşilimsi siyah rengin oluşmasıyla pseudotanenler, AOAC (1990)'de bildirilen yöntemle ham protein miktarı % 14,58, Seliwanoff's testi ile oluşan kırmızı rengin görülmesiyle sukroz, İTK ile plakaya Folin-ciocalteu ayırıcının püskürtülmesiyle oluşan mavi renkli leke ile hidrokinon (Şekil 3.1), plakaya ninhidrin ayırıcının püskürtülmesiyle oluşan kırmızı-menekşe renkle aminoasitler (Şekil 3.2), plakaya demir klorür/potasyum ferri siyanür çözeltisi ve Folin-ciocalteu ayırıcı püskürtülerek, UV ışık altında incelenmesinde donuk kırmızımsı renk ve amonyak buharına tutulduktan sonra oluşan mavi rengin görülmesiyle flavonoidlerin (Şekil 3.3) varlığı tespit edildi. Alkaloid, saponin, kolin (Şekil 3.4) ve basit şekerlerin varlığı ise gözlenemedi (Çizelge 3.1).

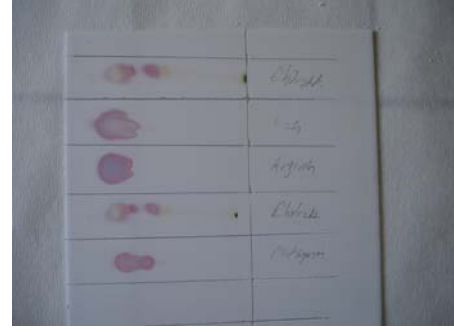
Çizelge 3.1. Korunga bitkisi ve/veya ekstraktının fitokimyasal analiz bulguları.

Aranan madde	Test	Sonuç
Alkaloid	Mayer's	—
	Dragendorff's	—
	Tannik asit	—
Saponin	Köpükleşme	—
	Hemoliz	—
Tanenler	Kurşun asetat	+
	Demir klorür	+
	Jelatin	—
Peptitler ve proteinler	Biüret	—
	AOAC	+
Basit şekerler	Fehling	—
Sukroz	Seliwanoff's	+
Aminoasitler	Ninhidrin	+
Fenoller ve fenolik asitler	Folin-ciocalteu	+
	Vanillin/hidroklorik asit	—
	Vanillin/sülfürik asit	—
Kolin	Dragendorff's	—
	İodoplatinat	—
Flavonoidler	UV floresan dalga boyları	+
	Demir-III-klorür/potasyum ferri siyanür	+
	Folin-ciocalteu	+

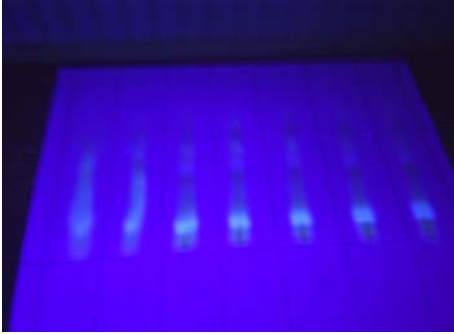
(—): varlığı belirlenmemiş; (+): varlığı belirlenmiş.



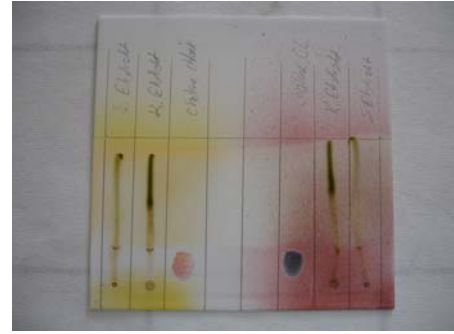
Şekil 3.1. Fenollerin varlığı



Şekil 3.2. Aminoasit varlığı



Şekil 3.3. Flavonoidlerin varlığı



Şekil 3.4. Kolin varlığı

### 3.4. Akut Zehirlilik Çalışması Bulguları

Korunga bitkisi ekstraktının farelerdeki ağızdan akut  $ÖD_{50}$  miktarı, sırasıyla, erkeklerde  $\geq 19000$  mg/kg ve dişilerde ise  $\geq 20000$  mg/kg olarak belirlendi (Çizelge 3.2).

Çizelge.3.2. Ekstraktın erkek ve dişi farelerdeki ağızdan akut  $ÖD_{50}$  miktarı.

Grup	Akut $ÖD_{50}$ miktarı ( $\geq$ mg/kg)	% 95 Güvenlik sınırı (mg/kg) (en alt-en üst değerler)
Erkek (n: 60)	19000	13700–21280
Dişi (n: 60)	20000	16670–22770

Yüksek dozlarda ekstrakt uygulamasını takiben hayvanlarda kısa süre içerisinde hareketsiz bir şekilde yatma, solunum sayılarının hızlanmasıyla kendini gösteren zehirlenme belirtileri gözlemlendi. Ölümler yaklaşık 2 saat içinde gelişti.

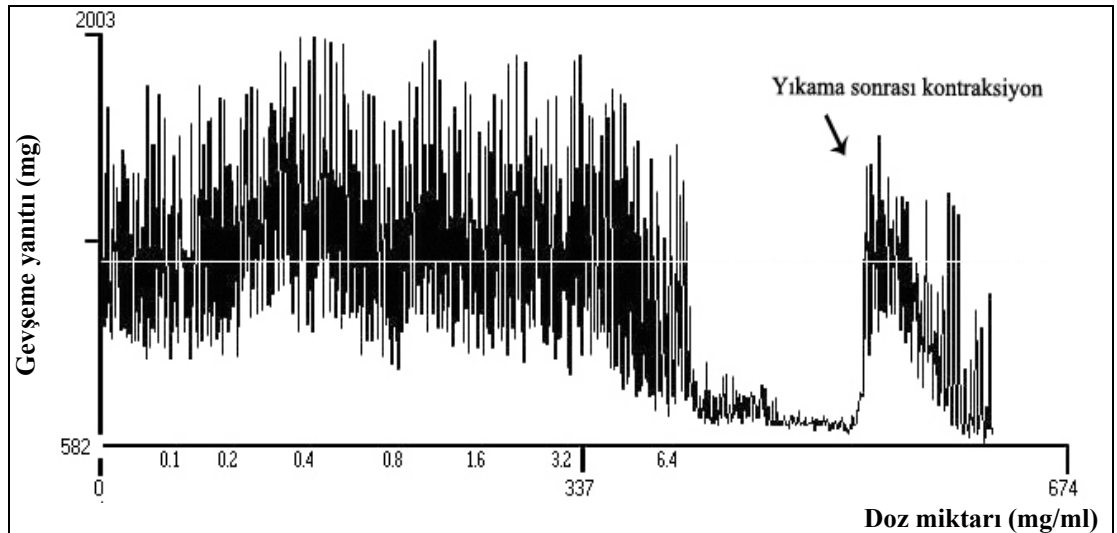
Orta dozlarda ekstrakt verilmesini takiben hayvanlarda huzursuzluk, hareketlerde yavaşlama ve yine hızlı solunum ile kendini gösteren belirtiler kaydedildi. Ölümür ise 1 ile 2 gün arasında gözlemlendi.

Düşük dozlarda ekstrakt verilen hayvanlarda ise bu belirtiler daha yüzeysel olarak ve bu gruplarda ölümlerin ise nadir şekillendiği gözlemlendi.

### 3.5. Farmakodinami Çalışması Bulguları

#### 3.5.1. Fare Jejunumu ve İleumu Üzerine Ekstraktın Tek Başına Etkisi

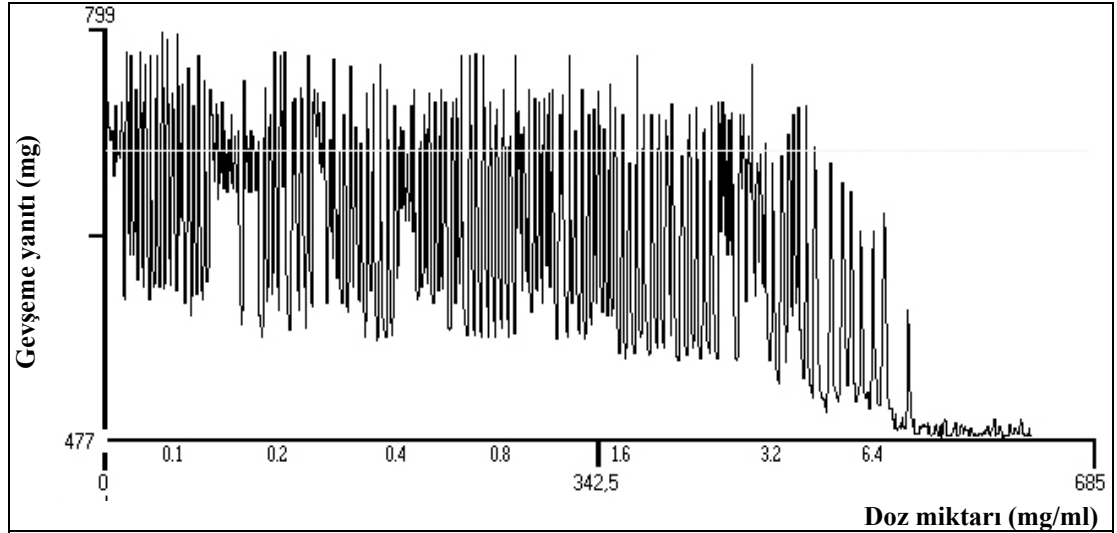
Ekstraktın 0,1; 0,2; 0,4; 0,8; 1,6; 3,2 ve 6,4 mg/ml derişimlerde kümülatif uygulaması sonucu fare jejunumu ve ileumunda farklı derişimlerde spesifik kademeli derişim-yanıtına uygun olmayan gevşemelere sebep olduğu görüldü (Şekil 3.5 ve Şekil 3.6). Bu yanıtlarda derişime bağıli kademeli bir gevşeme olmadığından uygun  $E_{max}$  ve  $pD_2$  değerleri hesaplanamadı (n:12).



Şekil 3.5. Fare jejunumunda ekstraktın (0,1-6,4 mg/ml) kümülatif derişim-yanıtları.

Ekstraktın dokulara 0,1–6,4 mg/ml derişimlerinin kümülatif ve bireysel olarak uygulanmasında 6,4 mg/ml dışındaki derişimlerin dokular üzerinde belirgin bir yanıt

oluşturmadığı, belirtilen derişimin uygulanması sonucunda dokulardaki normal (fazik) kontraksiyonların engellendiği; ayrıca, ekstraktın dokulara bireysel (6,4 mg/ml) ve kümülatif uygulanmasının akabinde yıkama yapıldıktan sonra dokulardaki kontraksiyonların yeniden başladığı gözlemlendi.



Şekil 3.6. Fare ileumunda ekstraktın (0,1-6,4 mg/ml) kümülatif derişim-yanıtları.

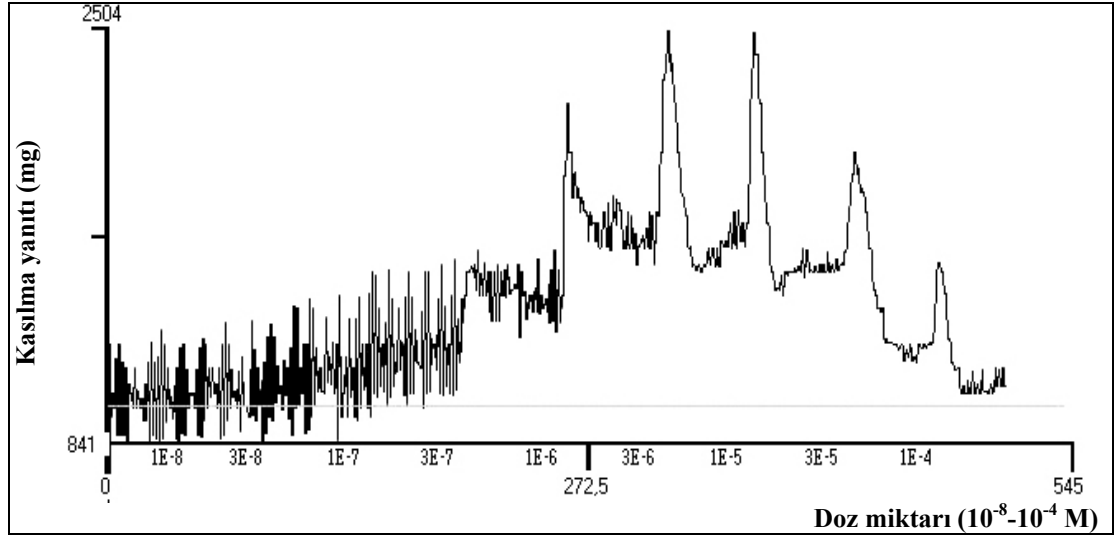
### 3.5.2. Fare Jejunumu ve İleumu Üzerine Ak'nin Tek Başına Etkisi

Deneyleerde Ak'nin  $EC_{50}$  değeriinin bulunması amacıyla kullanılan Ak ( $10^{-8}$ – $10^{-4}$  M) uygulamalarının hem jejunum hem de ileum dokusundaki kümülatif Ak derişim-yanıt eğrilerinin  $E_{max}$ ,  $pD_2$  ve  $EC_{50}$  değeriileri Çizelge 3.3'de gösterildi. Fare jejunum ve ileum dokularının kümülatif Ak uygulamalarına verdiği yanıtlar Şekil 3.7 ve Şekil 3.8'de gösterildi.

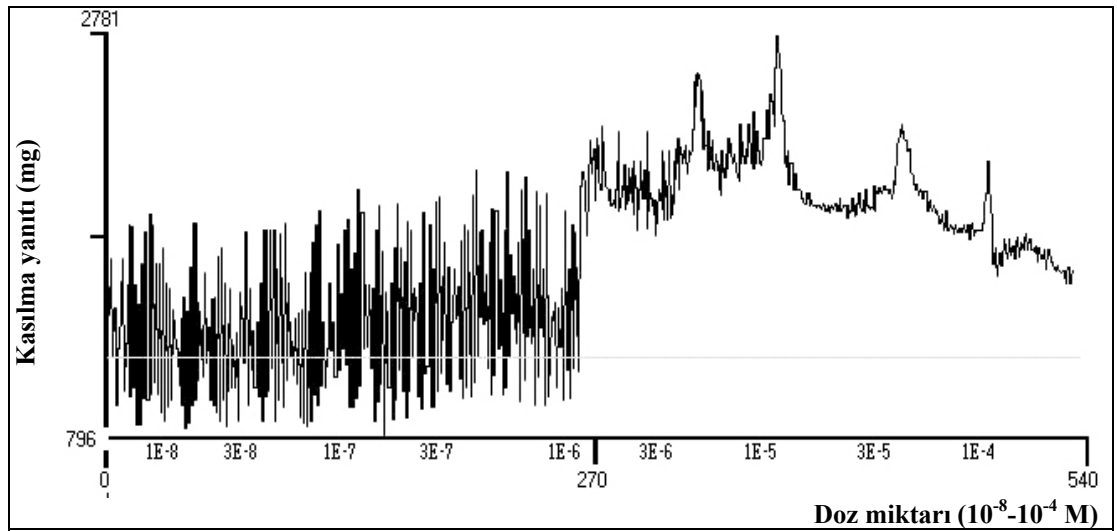
Çizelge 3.3. Fare jejunumu ve ileumunda Ak derişim-yanıt eğrilerinin  $E_{max}$ ,  $pD_2$  ve  $EC_{50}$  değeriileri.

Madde	Doku	$E_{max}$ (%) $\pm$ SEM	$pD_2 \pm$ SEM	$EC_{50}$ (M)	N
Ak ( $10^{-8}$ – $10^{-4}$ M)	Jejunum	85,02 $\pm$ 1,51	6,186 $\pm$ 0,111	$2,11 \times 10^{-5}$	34
	Ileum	84,53 $\pm$ 2,62	6,203 $\pm$ 0,131	$5,10 \times 10^{-6}$	35

Elde edilen sonuçlara göre Ak'nin kümülatif uygulaması sonucu fare jejunumundaki  $E_{max}$ ,  $pD_2$  ve  $EC_{50}$  değerleri sırasıyla  $85,02 \pm 1,51$ ;  $6,186 \pm 0,111$  ve  $2,11 \times 10^{-5}$  M olarak, ileumda ise sırasıyla  $84,53 \pm 2,62$ ;  $6,203 \pm 0,131$  ve  $5,10 \times 10^{-6}$  M olarak bulundu.



Şekil 3.7. Fare jejunumunda Ak ( $10^{-8} - 10^{-4}$  M)'nin kümülatif derişim-yanıtları.



Şekil 3.8. Fare ileumunda Ak ( $10^{-8} - 10^{-4}$  M)'nin kümülatif derişim-yanıtları.

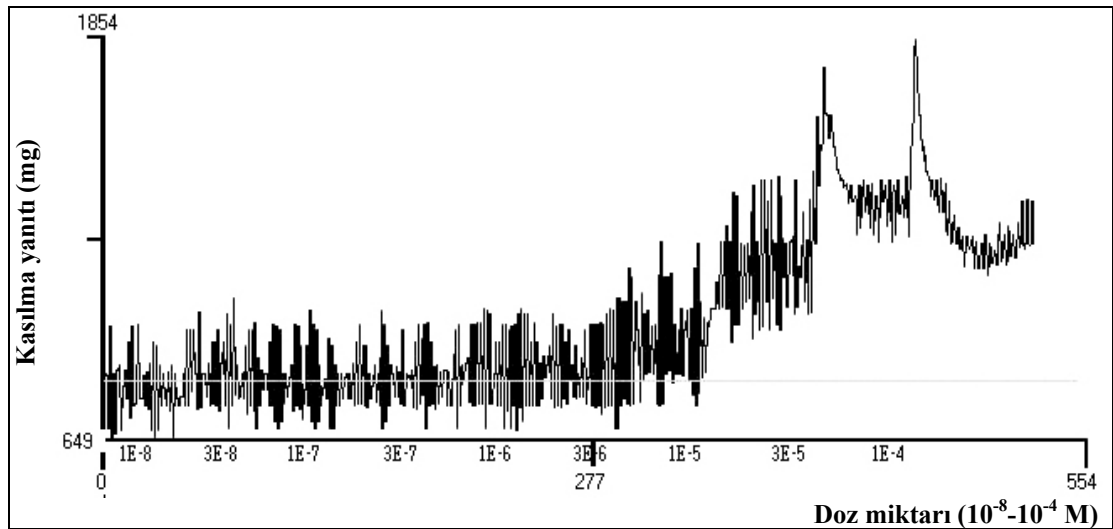
### 3.5.3. Fare Jejunumu ve İleumu Üzerine Betanekolün Tek Başına Etkisi

Deneyleerde betanekolün  $EC_{50}$  değeriinin bulunması amacıyla kullanılan betanekol ( $10^{-8}$ – $10^{-4}$  M) uygulamalarının hem jejunum hem de ileum dokusundaki kümülatif betanekol derişim-yanıt eğrilerinin  $E_{max}$ ,  $pD_2$  ve  $EC_{50}$  değeri Çizelge 3.4’de gösterildi. Fare jejunum ve ileum dokularının kümülatif betanekol uygulamalarına verdiği yanıtlar Şekil 3.9. ve Şekil 3.10.’da gösterildi.

Elde edilen sonuçlara göre betanekolün kümülatif uygulaması sonucu fare jejunumundaki  $E_{max}$ ,  $pD_2$  ve  $EC_{50}$  değeriileri sırasıyla  $116,00 \pm 5,06$ ;  $4,871 \pm 0,097$  ve  $2,04 \times 10^{-5}$  M olarak, ileumda ise sırasıyla  $103,40 \pm 3,30$ ;  $5,024 \pm 0,066$  ve  $1,24 \times 10^{-5}$  M olarak bulundu.

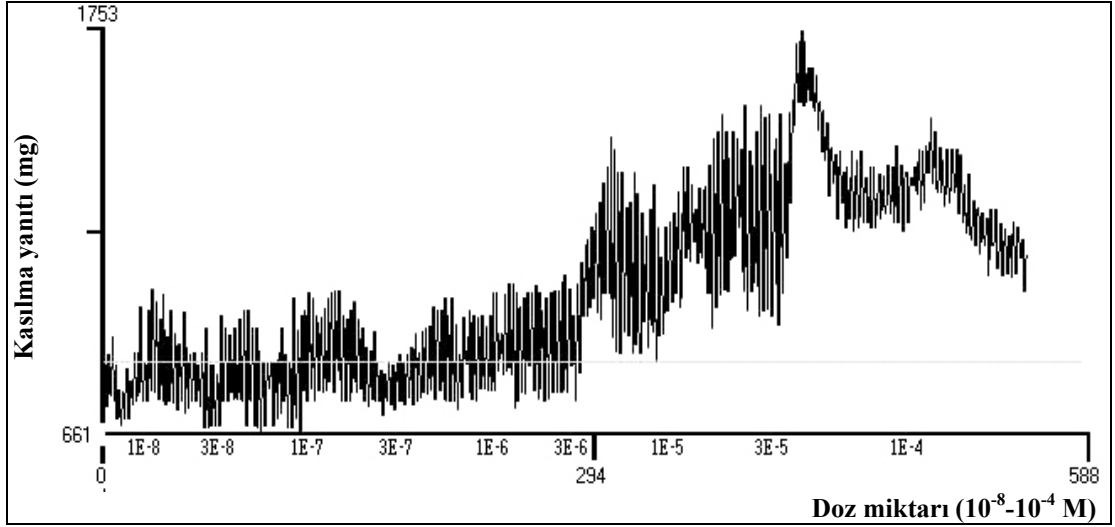
**Çizelge 3.4.** Fare jejunumu ve ileumunda betanekol derişim-yanıt eğriilerinin  $E_{max}$ ,  $pD_2$  ve  $EC_{50}$  değeriileri.

Madde	Doku	$E_{max}$ (%) $\pm$ SEM	$pD_2 \pm$ SEM	$EC_{50}$ (M)	N
Betanekol ( $10^{-8} - 10^{-4}$ M)	Jejunum	$116,00 \pm 5,06$	$4,871 \pm 0,097$	$2,04 \times 10^{-5}$	20
	Ileum	$103,40 \pm 3,30$	$5,024 \pm 0,066$	$1,24 \times 10^{-5}$	23



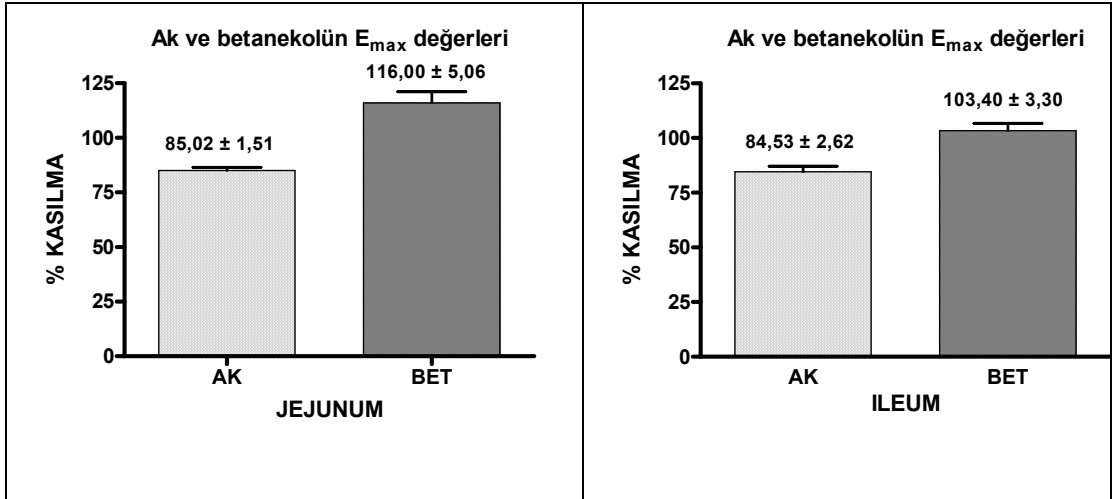
**Şekil 3.9.** Fare jejunumunda betanekolün ( $10^{-8} - 10^{-4}$  M) kümülatif derişim-yanıtları.





Şekil 3.10. Fare ileumunda betanekolün ( $10^{-8} - 10^{-4}$  M) kümülatif derişim-yanıtları.

Fare jejunumu ve ileumu üzerine Ak ve betanekolün dokulara kümülatif uygulanması sonucunda elde edilen  $E_{max}$  değerleri karşılaştırıldığında, Ak kasılma yanıtlarına göre betanekol kasılma yanıtlarının (Şekil 3.11) şiddetli olduğu ( $p < 0,05$ ) görülmektedir.



Şekil 3.11. Fare jejunumu ve ileumu üzerinde Ak ve betanekolün % kasılma yanıtları.

### 3.5.4. Fare Jejunumu ve İleumu Üzerine Ekstraktın Ak EC<sub>50</sub> Miktarı ile Birlikte Etkisi

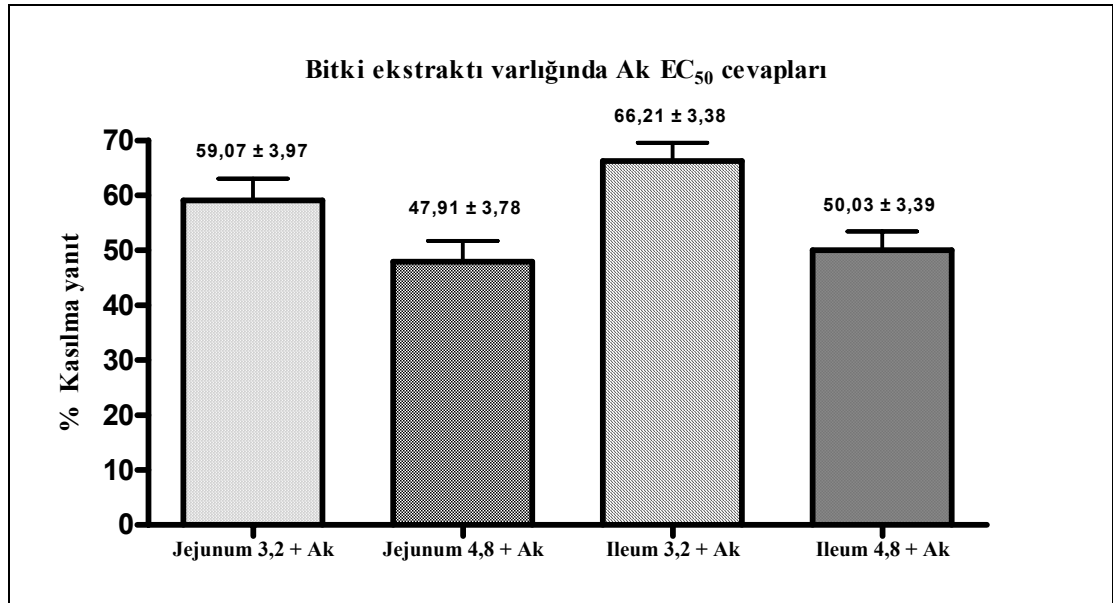
Ekstrakt (3,2 ve 4,8 mg/ml) ile 10 dakika inkubasyondan sonra fare jejunumunda ve ileumundaki Ak EC<sub>50</sub>'nin % ortalama kasılma değerleri Çizelge 3.5 ve Şekil 3.12'de gösterildi. Ekstrakt inkubasyonu yapılmamış dokulara kıyasla, ekstrakt 3,2 ve 4,8 mg/ml uygulaması yapılan jejunum ve ileum dokularında Ak EC<sub>50</sub>'nin % ortalama kasılma değerlerinde bir azalma (sırasıyla, 59,07±3,97; 47,91±3,78; 66,21±3,38; 50,03±3,39) belirlendi (p<0,05).

**Çizelge 3.5.** Ekstrakt varlığında Ak EC<sub>50</sub>'nin fare jejunum ve ileumundaki % ortalama kasılma değerleri.

Doku (n:12)	Ak EC <sub>50</sub> (M)	Ortalama mg ± SEM	Derişim (mg/ml)	Ortalama mg ± SEM	Ortalama (%) ± SEM
Jejunum	$2,11 \times 10^{-5}$	955,8 ± 121,8	3,2	601,5 ± 102,3	59,07 ± 3,97 <sup>a,*</sup>
Jejunum	$2,11 \times 10^{-5}$	955,8 ± 121,8	4,8	492,3 ± 83,1	47,91 ± 3,78 <sup>b,*</sup>
İleum	$5,10 \times 10^{-6}$	1279,5 ± 116,9	3,2	830,5 ± 69,2	66,21 ± 3,38 <sup>c,*</sup>
İleum	$5,10 \times 10^{-6}$	1279,5 ± 116,9	4,8	617,3 ± 47,5	50,03 ± 3,39 <sup>d,*</sup>

\*: Sütunlar arası fare jejunum ve ileumu üzerinde, Ak kontrolüne göre ekstrakt varlığında (3,2-4,8 mg/ml) alınan Ak EC<sub>50</sub> ortalama kasılma yanıtları önemlidir (p<0,05).

p<0,05: a-b, c-d (satırlar arası).



**Şekil 3.12.** Fare jejunum ve ileumunda ekstrakt (3,2 ve 4,8 mg/ml) inkubasyonunun Ak EC<sub>50</sub> değeri üzerine etkisi.

Fare jejunum ve ileum dokularına farklı derişimlerde (3,2 ve 4,8 mg/ml) verilen ekstrakt sonucu oluşan Ak EC<sub>50</sub>'nin % ortalama kasılma değerleri arasındaki fark önemli (p<0,05) bulundu. Jejunum ve ileum dokularına aynı derişimlerde (3,2 ve 4,8 mg/ml) verilen ekstrakt sonucu oluşan Ak EC<sub>50</sub>'nin % ortalama kasılma değerleri arasındaki fark önemli bulunmadı.

### 3.5.5. Fare Jejunumu ve İleumu Üzerine Ekstraktın Betanekolün EC<sub>50</sub> Miktarı ile Birlikte Etkisi

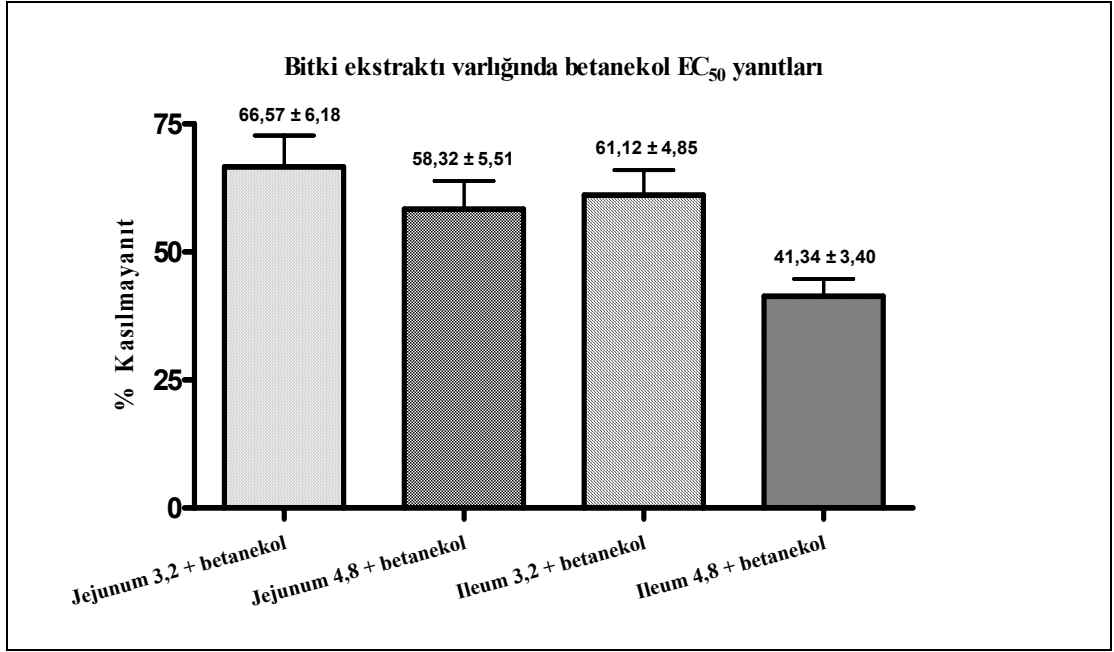
Ekstrakt (3,2 ve 4,8 mg/ml) ile 10 dakika inkubasyondan sonra fare jejunumunda ve ileumundaki betanekol EC<sub>50</sub>'nin % ortalama kasılma değerleri Çizelge 3.6 ve Şekil 3.13'de gösterildi. Ekstrakt inkubasyonu yapılmamış dokulara kıyasla, ekstrakt 3,2 ve 4,8 mg/ml uygulaması yapılan jejunum ve ileum dokularında betanekol EC<sub>50</sub>'nin % ortalama kasılma değerlerinde bir azalma (sırasıyla, 66,57±6,18; 58,32±5,51; 61,12±4,85; 41,34±3,40) belirlendi (p<0,05).

**Çizelge 3.6.** Ekstrakt varlığında betanekol EC<sub>50</sub>'nin fare jejunum ve ileumundaki % ortalama kasılma değerleri.

Doku (n:12)	Betanekol EC <sub>50</sub> (M)	Ortalama mg ± SEM	Derişim (mg/ml)	Ortalama mg ± SEM	Ortalama (%) ± SEM
Jejunum	2,04 × 10 <sup>-5</sup>	533,8 ± 46,4	3,2	339,6 ± 32,1	66,57 ± 6,18 <sup>a,*</sup>
Jejunum	2,04 × 10 <sup>-5</sup>	533,8 ± 46,4	4,8	297,5 ± 27,8	58,32 ± 5,51 <sup>b,*</sup>
İleum	1,24 × 10 <sup>-5</sup>	762,3 ± 91,9	3,2	432,9 ± 45,1	61,12 ± 4,85 <sup>c,*</sup>
İleum	1,24 × 10 <sup>-5</sup>	762,3 ± 91,9	4,8	300,2 ± 32,1	41,34 ± 3,40 <sup>d,*</sup>

\*: Sütunlar arası fare jejunum ve ileumu üzerinde betanekol kontrolüne göre ekstrakt varlığında (3,2–4,8 mg/ml) alınan betanekol EC<sub>50</sub> ortalama kasılma yanıtları önemlidir (p<0,05).

**p<0,05:** b-d, c-d (satırlar arası).



**Şekil 3.13.** Fare jejunum ve ileumunda ekstrakt (3,2 ve 4,8 mg/ml) inkubasyonunun betanekol EC<sub>50</sub> değeri üzerine etkisi.

Fare ileum dokusuna farklı derişimlerde (3,2 ve 4,8 mg/ml) verilen ekstrakt sonucu oluşan betanekol EC<sub>50</sub>'nin % ortalama kasılma değerleri arasındaki fark önemli ( $p < 0,05$ ) bulunurken, jejunum dokusuna farklı derişimlerde (3,2 ve 4,8 mg/ml) verilen ekstrakt sonucu oluşan betanekol EC<sub>50</sub>'nin % ortalama kasılma değerleri arasındaki fark önemli bulunmadı. Jejunum ve ileum dokularına 3,2 mg/ml derişiminde verilen ekstrakt sonucu oluşan betanekol EC<sub>50</sub>'nin % ortalama kasılma değerleri arasındaki fark önemli bulunmadı. Fakat jejunum ve ileum dokularına 4,8 mg/ml derişiminde verilen ekstrakt sonucu oluşan betanekol EC<sub>50</sub>'nin % ortalama kasılma değerleri arasındaki fark önemli ( $p < 0,05$ ) bulundu.

### 3.5.6. Fare Jejunumu ve İleumu Üzerine Ekstraktın Atropin ile Birlikte Etkisi

Atropin ( $10^{-8}$  M ve  $10^{-7}$  M) ile 10 dakika inkubasyondan sonra fare jejunumunda ve ileumunda ekstraktın (6,4 mg/ml) % ortalama gevşeme değerleri Çizelge 3.7 ve Şekil 3.14'de gösterildi. Atropin inkubasyonu yapılmamış dokulara kıyasla, atropin  $10^{-8}$  M ve  $10^{-7}$  M uygulaması yapılan jejunum ve ileum dokularında ekstraktın % ortalama

gevşeme değerlerinde bir azalma (sırasıyla,  $53,95 \pm 4,61$ ;  $39,33 \pm 4,07$ ;  $65,80 \pm 3,21$ ;  $47,93 \pm 2,12$ ) belirlendi ( $p < 0,05$ ).

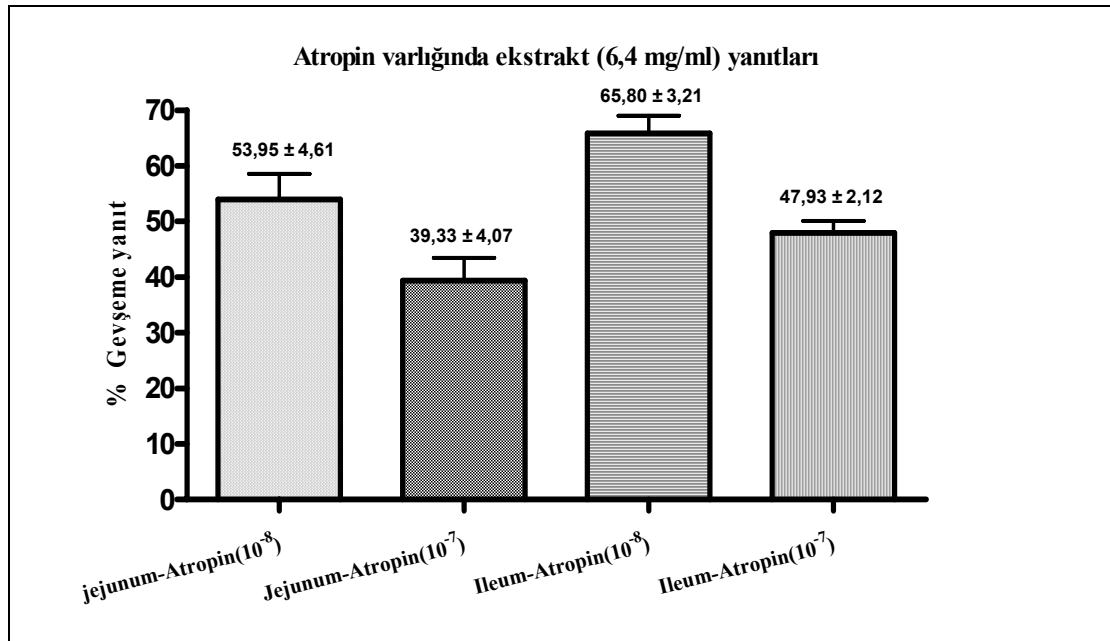
**Çizelge 3.7.** Atropin varlığında ekstraktın fare jejunum ve ileumundaki % ortalama gevşeme değerleri

Doku (n:12)	Atropin Derişim (M)	Ortalama mg $\pm$ SEM	Ekstrakt (mg/ml)	Ortalama mg $\pm$ SEM	Ortalama (%) $\pm$ SEM
Jejunum	$10^{-8}$	$421,5 \pm 25,0$	6,4	$217,0 \pm 12,6$	$53,95 \pm 4,61$ <sup>a,*</sup>
Jejunum	$10^{-7}$	$421,5 \pm 25,0$	6,4	$157,7 \pm 13,5$	$39,33 \pm 4,07$ <sup>b,*</sup>
İleum	$10^{-8}$	$492,6 \pm 31,3$	6,4	$316,3 \pm 15,2$	$65,80 \pm 3,21$ <sup>c,*</sup>
İleum	$10^{-7}$	$492,6 \pm 31,3$	6,4	$235,75 \pm 17,1$	$47,93 \pm 2,12$ <sup>d,*</sup>

\*: Sütunlar arası fare jejunum ve ileumu üzerinde ekstrakt kontrolüne göre atropin varlığında ( $10^{-8}$ - $10^{-7}$  M) alınan ekstrakt ortalama gevşeme yanıtları önemlidir ( $p < 0,05$ ).

**p < 0,05:** a-b, c-d (satırlar arası).

Fare jejunum ve ileum dokularına farklı derişimlerde ( $10^{-7}$  M ve  $10^{-8}$  M) atropin inkubasyonu ile oluşan ekstraktın % ortalama gevşeme değerleri arasındaki fark da önemli ( $p < 0,05$ ) bulundu.



**Şekil 3.14.** Fare jejunum ve ileumunda atropin ( $10^{-8}$  ve  $10^{-7}$  M) inkubasyonunun ekstrakt (6,4 mg/kg) üzerine etkisi.

### **3.5.7. Fare Jejunumu ve İleumu Üzerine Nikotin ve Histaminin Tek Başlarına Etkisi**

Histaminin  $10^{-8}$ – $10^{-4}$  M derişimlerde kümülatif ve bireysel uygulanması sonucu fare jejunumu ve ileumunda normal (fazik) kontraksiyonların frekansını arttırdığı fakat kademeli bir kasılma cevabı oluşturmadığı gözlendi. Nikotinin  $10^{-8}$ – $10^{-4}$  M derişimlerde kümülatif ve bireysel uygulanması sonucu fare jejunumu ve ileumunda bir yanıt oluşturmadığı gözlendi.

#### 4. TARTIŞMA

Korunga bitkisinin fitokimyasal analizlerinde; toz haline getirilerek distile su ilave edilmiş karışıma kurşun asetat çözeltisinin damlatılmasıyla oluşan çökelti tanenlerin varlığına işaret etmiştir. Tanenin niteliğini belirlemek için yapılan testlerde oluşan çökeltiyeye demir klorür çözeltisinin ilavesiyle görünür bir hale gelmeleri, ancak jelatin çözeltisinin herhangi bir reaksiyon vermemesi sonucu korunga bitkisinde bulunan tanenlerin pseudotanen niteliğinde oldukları anlaşılmıştır. Nitekim Marais ve ark. (2000) da korunga bitkisinin pseudotanen içerdiğini vurgulamışlardır.

İTK'ya ninhidrin ayırıcının püskürtülmesi ile görülen aminoasitlerin ve AOAC'de bildirilen yöntemle bulunan ham protein (%14,58), bitkinin protein içerdiğini göstermektedir. Jel filtrasyon kromatografisiyle korunga tohumlarından elde edilen lektinin incelendiği çalışmalarda; korunga aminoasit kısımlarının serin, asparajin, glutamik asit ve threoninden oluştuğu belirtilmektedir (Hapner ve Robins, 1979; Namen ve Hapner, 1979). Kantitatif olarak protein varlığının belirlenmesinde kullanılan biüret deneyinin duyarlılığının az olması nedeniyle (1–10 mg/ml) (Anon, 2006), ekstraktta bulunan proteinlerin varlığını saptamada yetersiz kaldığı sonucuna varılmıştır. Marais ve ark. (2000) belirttikleri çalışmada sukroz oranının oldukça yüksek olduğunu vurgulamışlardır. Yapılan analiz neticesinde de Seliwanoff's testinde alınan renk reaksiyonu ile sukroz olduğu tespit edilmiştir.

Harborne (1973)'un bildirdiği yöntemle göre de fenoller ve fenolik asitlerin varlığının araştırılması İTK yöntemi ile de yapılabilmektedir. Bu yöntemle göre yapılan incelemede plakaya ayıraçların uygulanmasıyla görülen leke ve bunun Rf değerinin karşılaştırılmasıyla hidrokuinon olduğu gözlenmiştir. Lu ve ark., (2000) yaptıkları çalışmada korungada düşük molekül ağırlığına sahip fenolik bileşiklerin olduğunu rapor etmişlerdir.

Yapılan inceleme sonucunda korunganın flavonoid içerdiği gözlenmiştir. Lu ve ark. (2000) ve Marais ve ark. (2000) yaptıkları çalışmalarda korunganın içeriğinde flavonoidleri saptamış olmaları bu çalışmadaki bulguya benzerlik göstermiştir.

Korunganın fitokimyasal analizlerine yönelik yapılan birçok araştırmada (Lu ve ark., 2000; Marais ve ark., 2000) alkaloid, saponin, kolin veya basit şekerlerin varlığına yönelik herhangi bir kayıt olmaması, bu çalışmada yapılan analizlerde anılan maddelerin bulunmamasını destekler niteliktedir.

Korunga bitkisi ekstraktının farelerde ağızdan akut  $ÖD_{50}$  miktarının, sırasıyla, erkeklerde  $\geq 19000$  mg/kg ve dişilerde ise  $\geq 20000$  mg/kg olduğu tespit edilmiştir. Mutajen ve kanserojen etkinliği bilinen tannik asit ya da tanenlerin ratlardaki ağızdan  $ÖD_{50}$ 'sinin  $>2000$  mg/kg olduğu (Inchem, 1971), baklagil bitkisi olan fasulyenin (*Vicia faba*) ekstraktının farelerdeki ağızdan akut  $ÖD_{50}$ 'sinin 19000 mg/kg canlı ağırlık olduğu bildirilmektedir (Duke, 1983). Marti ve ark., (2005)'nin yaptığı bir çalışmada, *Thymus piperella* bitkisi ekstraktının farelerdeki ağızdan akut  $ÖD_{50}$ 'sinin  $>2$  g/kg canlı ağırlık olduğu tespit edilmiştir. Böylece korunganın hayvanlardaki zehirliliğinin baklagil yem bitkisi olan fasulyenin zehirlilik miktarına benzer olduğu görülmektedir.

Herhangi bir maddenin zehirliliği genellikle o maddenin alınan veya uygulanan miktarıyla ilişkilendirilir. Lennon ve ark. (1971) ile Kaya ve ark. (2002)'nin yaptıkları sınıflandırmaya göre ratlara ağızdan  $ÖD_{50}$ 'ye göre maddelerin zehirlilik derecesi incelendiğinde, bir maddenin pratikte zehirsiz olarak değerlendirilebilmesi için o maddenin ratlardaki ağızdan akut  $ÖD_{50}$ 'sinin  $> 15000$  mg/kg olması gerekir. Bu değerlendirmeye göre korunga bitkisinin hayvanlarda pratik olarak zehirsiz olduğu anlaşılmıştır. Ayrıca, bu bitkiyi yiyen hayvanlarda şimdiye kadar herhangi bir istenmeyen etkiyle karşılaşılması bu bulguyu destekler niteliktedir.

Fare jejunum ve ileumu üzerinde Ak ve betanekolün ( $10^{-8}$ - $10^{-4}$  M) tek başlarına uygulandıklarında elde edilen  $E_{max}$  değerleri mukayese edildiğinde, betanekolün maksimum etkinliğinin Ak'ye göre şiddetli olduğu ( $p<0,05$ ) görülmüştür. Bu durum



betanekolün intrinsik etki gücünün Ak'den daha fazla olduğunu göstermektedir. Parasempatik sinir sisteminde uyarı, sinir uçlarından salıverilen Ak ile olmaktadır. Spontan uyarıların azaldığı ve terapötik müdahalenin gerektiği durumlarda Ak verilebilir. Fakat Ak, AkE tarafından hızlı bir şekilde hidrolize edildiği için etkisi geçicidir. Betanekol kolinesterazla hidrolize edilmez ve böylece Ak'den çok daha uzun süre etki gösterir (Adams, 2001a). Kedilerin sidik kesesi düz kası üzerinde betanekolün etkisinin incelendiği bir çalışmada, betanekol ile oluşturulan kasılma yanıtlarının Ak ile oluşturulan yanıtlara göre daha fazla olduğu belirtilmiştir. Betanekol  $P_{max}$  (2,29)'ı Ak'nin  $P_{max}$  (1,87)'in dan daha büyük ve betanekol  $ED_{50}$  (16,11)'si Ak'nin  $ED_{50}$  (772,4)'sinden daha küçük olduğu bundan dolayı da betanekolün potensinin Ak'den daha fazla olduğu bildirilmiştir. Betanekol ile oluşturulan yanıtların muskarinik reseptörlerle ortaya çıktığı ve hem hücre dışı hem de hücre içi kalsiyumun kedilerin sidik kesesi düz kas kontraksiyonlarının normal mekanizmasında önemli bir rolü olduğu vurgulanmıştır (Buranakarlı ve ark., 2001).

Ekstraktın (0,1-6,4 mg/ml) fare jejunum ve ileum dokularına tek başına ve kümülatif olarak uygulanması sonucunda 6,4 mg/ml derişiminde bağırsağın fazik kasılmalarını engellediği ve dokulara yıkama yapıldıktan sonra da kasılmaların yeniden başladığı görülmüştür. Bu durum ekstraktın, bağırsak düz kası üzerinde kasılmaları önleyici özellikte etkin maddeleri ihtiva ettiğini göstermektedir. Benzer olarak Mekonnen (1999)'nin yaptığı bir çalışmada *Moringa stenopetala* bitkisi yaprağının alkolik ekstraktının izole fare ve kobay duodenum düz kası üzerinde kasılmaları engelleyici etki oluşturduğu ve dokuların yıkanmasından sonra da kasılmaların yeniden başladığı belirtilmiştir.

Ekstraktın fare jejunum ve ileum dokularına 3,2 ve 4,8 mg/ml derişimlerde 10 dakika inkubasyonu ile Ak  $EC_{50}$  (sırasıyla,  $2,11 \times 10^{-5}$  M;  $5,10 \times 10^{-6}$  M)'nin incelenmesi ile ortalama kasılma değerlerinde bir azalma ( $p < 0,05$ ) gözlenmiştir. *Neorautanenia mitis* bitkisinin sulu ekstraktının farmakolojik etkisinin incelendiği çalışmada, artan doza bağlı olarak ekstraktın izole rat uterusun normal ritmik kasılmalarını ortadan kaldırdığı ve ayrıca oksitosinle oluşturulan kasılmaları engellediği belirtilmiştir. Ak ile uyarılan uterus kasılmalarının ekstraktın en yüksek derişimi ile engellendiği bu

blokajın da Ak derişiminin arttırılmasıyla azaltıldığı belirtilmiştir. Bu uygulamanın tavşan jejunumunda da aynı şekilde olduğu vurgulanmıştır. Çalışma sonunda ekstraktın düz kasları engelleyici etkisinin flavonoid içermesinden olduğu bildirilmiştir. Bitkinin saponin glikozidleri, flavonoidleri, tanenleri ve alkaloidleri ihtiva ettiği belirtilmiştir (Vongtau ve ark., 2000). *Pavetta crassipes* yapraklarının sulu ekstraktının izole tavşan jejunumu, kobay taenia coli ve ileumu üzerinde kasılmaları önleyici etki oluşturduğu belirtilmektedir. Bu engelleyici etkinin ise verapamille bloke edildiği, bunun da bitki yaprağı ekstraktındaki flavonoid içeriğinden kaynaklandığı vurgulanmaktadır. *Pavetta crassipes* yapraklarının flavonoidleri, tanenleri ve antrakuinonları içerdiği bildirilmiştir (Amos ve ark., 1998). *Moringa stenopetala* yaprağının etanol ekstraktının fare ve kobay duodenum ve ileumundaki etkisinin incelendiği çalışmada, ekstraktın zamana ve doza bağı olarak uygulanmasında Ak yanıtlarını azalttığı ve muhtemel antagonistik etkinin de Ak ile yarışmalı şekilde reseptörlere bağlanma ilgisiyle olabileceği vurgulanmaktadır (Mekonnen, 1999). Di carlo ve ark., (1993)'nın yaptığı bir çalışmada da, flavonoidlerin fare ve ratlarda intestinal motilite ve sekresyonu engelleyici etkisini araştırmışlardır. Çalışma sonunda da; flavonoidlerin bu etkilerinin  $\alpha_2$  adrenerjik reseptörler ve kalsiyum sistemleriyle ilişkili olduğunu belirtmişlerdir.

Ekstraktın fare jejunum ve ileum dokularına aynı derişimlerde (3,2 ve 4,8 mg/ml) uygulanması sonrası elde edilen Ak EC<sub>50</sub> yanıtları arasında farkın olmadığı görülmüştür. Bu durum dokular arasındaki bölümlerin Ak'nin alınan yanıtları üzerinde önemli bir etki oluşturmadığını göstermektedir. Fare jejunum ve ileum dokularına farklı derişimlerde (3,2 ve 4,8 mg/ml) verilen ekstrakt dokular arasında alınan Ak EC<sub>50</sub> yanıtlarında bir azalma (p<0,05) oluşturmuştur. Bu oluşan farklılık ekstraktın yoğunluğu ile ilgilidir. Şöyle ki; uygulanan bitki ekstraktının miktarı arttıkça dokular üzerindeki engelleyici etkisi de artmaktadır. Vongtau ve ark., (2000) ve Amos ve ark., (1998) yaptıkları çalışmalarla artan doza bağı olarak bitki ekstraktlarının alınan yanıtları azalttığını bildirmişlerdir.

Ekstraktın 3,2 ve 4,8 mg/ml derişimlerde fare jejunum ve ileum dokularına 10 dakika inkubasyonu ile betanekol EC<sub>50</sub> (sırasıyla,  $2,04 \times 10^{-5}$  M;  $1,24 \times 10^{-5}$  M)'sinin

incelenmesi ile ortalama kasılma değerlerinde bir azalma ( $p<0,05$ ) gözlenmiştir. Bu durum ekstraktın muskarinik etkili olan betanekolün etkisini reseptörler ( $M_2$ ) düzeyinde azalttığını ve kısmen antimuskarinik etkili bir ajan olarak rol oynadığını göstermektedir. Süt ineklerinde, abomazum ve duodenumdan alınan düz kaslar üzerinde, sisaprid, metoklopramid ve betanekolün etkilerinin *in vitro* koşullarda incelendiği bir çalışmada, dokular üzerinde sisaprid ve metoklopramidin bir etkisinin gözlenmediği belirtilirken, betanekolün abomazum düz kasının bazal tonusunu önemli şekilde arttırdığı, duodenum düz kasının bazal tonusunu ise etkilemediği bildirilmiştir. Bu etkinin atropin ( $10^{-5}$  M) ile engellendiği belirtilmiştir (Michel ve ark., 2003).

Fare ileum dokusuna farklı derişimlerde (3,2 ve 4,8 mg/ml) verilen ekstrakt sonucu elde edilen betanekol  $EC_{50}$ 'sinin yanıtlarında bir azalma ( $p<0,05$ ) oluşmuştur. Bu da ekstraktın önleyici etkisinin doza bağlı olarak şekillendiğini göstermektedir. Jejunum dokusunda ise ekstrakt derişimine bağlı bu durum önemli bulunmamıştır.

Fare jejunum ve ileum dokularına 3,2 mg/ml derişiminde verilen ekstrakt sonucu oluşan betanekol  $EC_{50}$  yanıtları arasındaki fark önemli değildir. Ekstraktın 4,8 mg/ml'lik derişimi, uygulanan jejunum ve ileum dokuları arasında, alınan betanekol  $EC_{50}$  yanıtlarında bir azalma ( $p<0,05$ ) oluşturmuştur. Bu durum ekstrakt derişiminin yüksek olması ve dokular arasındaki yapısal farklılıktan ileri gelmektedir. Fare bağırsak düz kasının kasıcı etkinliğinin incelendiği bir çalışmada; farelerden alınan jejunum ve ileum kas şeritleri 6 saatlik bir süre içerisinde organ banyosunda tutulmuş, spontan kasılmaları ile betanekol ve norepinefrinle oluşturulan doz yanıt eğrileri incelenmiştir. Çalışmaya başlamadan önce dokular bir saatlik soğuk ortamda (buzdolabında) muhafaza edilmiştir. Buzdolabından alınan dokuların banyoya asılıp normal kasılma ve frekansları incelendiğinde ise önemli bir değişimin görülmediği vurgulanmıştır. Ayrıca bu dokular üzerinde betanekolle kasılma ve norepinefrinle gevşeme yanıtları doza bağlı olarak incelenmiştir. Betanekol uygulamasıyla alınan %  $ED_{50}$  değerlerinin birinci ve daha sonrasında alınan ikinci değerleri arasında fark yaratmadığı buna karşın norepinefrinle alınan birinci ve ikinci gevşeme yanıtları arasında farkın oluştuğu rapor edilmiştir (Ueno ve ark., 2004).

Fare jejunum ve ileum dokuları üzerinde atropin ( $10^{-8}$  M ve  $10^{-7}$  M) inkubasyonu ile elde edilen ekstraktın (6,4 mg/ml) gevşeme yanıtlarının azaldığı ( $p < 0,05$ ) görülmüştür. Antimuskarinik etkili olan atropin ile muskarinik reseptörler bir düzeyde kapatılmış ve ekstraktın bağırsak düz kası üzerinde kasılmaları önleyici etkisinin azalması söz konusu olmuştur.

Fare jejunum ve ileum dokularına farklı derişimlerde ( $10^{-8}$  M ve  $10^{-7}$  M) atropin uygulanması ile alınan ekstrakt (6,4 mg/ml) yanıtları arasındaki farkın önemli ( $p < 0,05$ ) olduğu görülmüştür. Bu durum da ekstraktın gevşetici etkisinin artan derişimlerde atropin uygulanması ile büyük ölçüde engellendiğini göstermektedir.

Fare jejunumu ve ileumu üzerinde nikotinin ( $10^{-8}$ – $10^{-4}$  M) etkisinin olmadığı, histaminin ( $10^{-8}$ – $10^{-4}$  M) ise dokular üzerinde kademeli bir kasıcı etki yapmadığı sadece fazik kasılmaların frekansını arttırdığı gözlenmiştir. Bu gözlenen durumlar tür farkından ileri gelmektedir. Histamin insan, köpek, at, domuz, keçi, tavşan, koyun gibi birçok memeli türünde  $H_1$  reseptörleri vasıtasıyla solunum düz kaslarında kasılma yapmaktadır. Aşırı duyarlılığı bilinen kobaylarda histamine çok düşük miktarlarda maruz kalınması ile bronşlarda daralmayla oluşan ölümlerin görüldüğü bildirilmektedir. Histaminin bağırsaklar üzerindeki etkisi ise  $H_1$  reseptörleri aracılığında, hayvan türlerine ve uygulanan bölgeye bağlı olarak oluşan kasılma şeklindeki yanıtlardır (Adams, 2001b). Koyun trakeası üzerinde levamisolün etkisinin incelendiği bir diğer çalışmada; levamisol varlığında alınan histamin yanıtlarının kontrol yanıtlarına göre önemli ölçüde azaldığı, nikotin yanıtlarının ise kontrol yanıtlarına göre zayıf bir şekilde arttığı bildirilmiştir (Baydan ve ark., 2005).

## SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışma ile korunga bitkisinin kurutulmuş tozu ve ekstraktının fitokimyasal analizi ile tanen, sukroz, aminoasit, protein, flavonoid ve fenollerini içerdiği, alkaloid, saponin, basit şeker ve kolin ihtiva etmediği saptanmıştır. Ekstraktın farelerdeki ağızdan akut zehirliliği de düşük düzeyde bulunmuştur. Böylece üretiminin kolay, maliyetinin az olduğu bilinen ve zehirliliğinin de düşük olduğu gözlemlenen korunga bitkisi hayvanlar için son derece güvenli bir besin maddesi özelliğini taşımaktadır.

Ayrıca korunganın, fare ileum ve jejunum bağırsak düz kaslarının spontan kasılmalarını, Ak ve betanekol yanıtlarını önemli derecede engellediği, atropin varlığında ise etkisinin zayıfladığı tespit edildiğinden antimuskarinik ajan olarak rol oynadığı ve bu etkisini de reseptörler üzerinden gerçekleştirdiği ortaya konulmuştur. Bu etkinin görülmesinde içeriğinde bulunan etkin maddelerin özellikle flavonoidlerin rol oynadığı düşünülmektedir. Bu durumda korunga bitkisinin fazla miktarda tüketilmesi sonucu bağırsak hareketlerinin yavaşlayacağı ve sindirim sistemi rahatsızlıklarının ortaya çıkabileceği belirtilebilir.

Korunga ile ilgili besin madde içeriği ve hayvan besleme alanına ilişkin çalışmalar oldukça fazla, buna karşın *in vitro* etkileri ile ilgili araştırmalar daha az sayıda bulunmaktadır. Bu sebeple korunga ile ya da diğer baklagil yem bitkileriyle ilgili detaylı çalışmaların yapılarak, bu tür bitkilerin varsa farmakolojik özellikleri açığa çıkarılarak bilime katkı yapılabilmesi düşünülmektedir.

## ÖZET

### Farelerde Korunga Bitkisinin (*Onobrychis viciifolia*) Bağırsaklara Etkisi

Bu araştırmada, Türkiye’de yaygın bir şekilde yetiştirilen korunga bitkisinin fitokimyasal özellikleri, ekstraktının farelerde ağızdan akut ÖD<sub>50</sub> değeri ile fare jejunum ve ileumu üzerindeki etkilerinin *in vitro* testlerle ortaya konması amaçlanmıştır.

Çalışmada; Wistar albino soyu en az iki aylık farelerden alınan ince bağırsak düz kası (jejunum-ileum) kullanıldı. Yaklaşık 1 cm uzunluğundaki ince bağırsak segmentine, 15 ml tyrode çözeltisi içeren izole organ banyosunda 1 g gerim uygulanarak çalışıldı. Jejunum ve ileum dokusunda, Ak EC<sub>50</sub>, betanekol EC<sub>50</sub>, atropin (10<sup>-8</sup>-10<sup>-7</sup> M) ve korunga ekstraktı 0,1-6,4 mg/ml derişimlerde uygulanarak tek başlarına ve bir arada doku üzerindeki etkileri incelendi. Ayrıca histamin ve nikotinin jejunum ve ileum üzerindeki etkileri ile bitkinin fitokimyasal incelemesi ve ekstraktın farelerdeki ağızdan akut zehirliliği incelendi.

Araştırmada elde edilen veriler; ekstraktın (6,4 mg/ml) fare jejunum ve ileum düz kası üzerinde gevşetici etki yaptığı, Ak EC<sub>50</sub> ve betanekol EC<sub>50</sub>’nin ekstrakt (3,2 ve 6,4 mg/ml) varlığında kastırıcı etkilerinin azaldığı, atropin varlığında ekstraktın (6,4 mg/ml) gevşetici etkisinin azaldığı ve böylece bitkinin antimuskarinik ajan olarak rol oynadığı tespit edildi. Farelerde ağızdan akut ÖD<sub>50</sub> değerinin erkeklerde ≥19000 ve dişilerde ≥20000 mg/ kg. canlı ağırlık olduğu, bitkinin veya ekstraktının fitokimyasal incelemesinde tanen, aminoasit, protein, sukroz, fenol ve flavonoidlerin olduğu, alkaloid, basit şeker, saponin ve kolin varlığının olmadığı gözlemlendi.

Bitkinin farelerdeki ağızdan akut zehirliliğinin düşük olduğu, bağırsaklar üzerindeki etkilerini reseptörler düzeyinde oluşturduğu, bu etkinin görülmesinde içeriğinde bulunan etkin maddelerin özellikle de flavonoidlerin rol oynadığı sonucuna varılmıştır.

**Anahtar sözcükler:** Bağırsak, fare, izole organ, korunga.

## SUMMARY

### **The Effects of Sainfoin (*Onobrychis viciifolia*) on Intestine in Mice**

This in vitro study was aimed to determine the phytochemical properties, acute LD<sub>50</sub> of oral administration of the extract and the effects on mice jejunum and ileum of sainfoin which is largely distributed in Turkey.

The effects of the extract of sainfoin were studied on the intestine smooth muscle (jejunum-ileum) of Wistar albino mice of at least 2 months age. The segments of the small intestine measuring about 1 cm was cut out and mounted in a 15 ml tissue bath containing Tyrode's solution with 1 g tension. The effects of acetylcholine EC<sub>50</sub>, betanecol EC<sub>50</sub>, atropine (10<sup>-8</sup>-10<sup>-7</sup> M) and 0,1-6,4 mg/ml concentration of the sainfoin extract were studied by the administration alone and in combinations to jejunum and ileum. Furthermore, the effects of histamine and nicotine on jejunum and ileum; phytochemical properties and acute toxicity of the extracts of the sainfoin were studied.

The present study revealed that the extract (6,4 mg/ml) has inhibitory effects on the smooth muscles of mice jejunum and ileum; the contractions of acetylcholine EC<sub>50</sub> and betanecol EC<sub>50</sub> was decreased by the presence of the extract at 3,2 and 6,4 mg/ml concentrations and the inhibitory effects of the extract at 6,4 mg/ml concentration was decreased by the presence of atropine. These results revealed that this plant acts as an antimuscarinic agent. Acute oral LD<sub>50</sub> of sainfoin was found as  $\geq 19000$  mg/kg for males and  $\geq 20000$  mg/kg for females. Phytochemical analysis of the extract revealed the presence of tannins, amino acids, proteins, sucrose, phenolic contents; however the presence of alkaloids, simple sugars, saponins and choline were not observed.

The acute toxicity of the plant orally administered to mice was low and its effects on the receptors of intestine were probably mediated due to its active components, especially flavonoids.

**Key words:** Intestine, mice, isolated organ, sainfoin

## KAYNAKLAR

- AOAC (1990). Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists. 14th Ed., Virginia, USA.
- ABDULLAHI, A.L., AGHO, M.O., AMOS, S.K., GAMANIEL, S., WAMBEBE, C. (2001). Antidiarrhoeal activity of the aqueous extract of *Terminalia avicenoides* roots. *Phytother. Res.* **15**: 431–434.
- AÇIKGÖZ, E. (2001). Yem Bitkileri. 3. Baskı. Vipaş A.Ş. Bursa. s: 1–95. ISBN: 975–564–124–6.
- ADAMS, R. (2001a). Cholinergic pharmacology: autonomic drugs. In: Veterinary Pharmacology and Therapeutics. 8th ed., eds., H. Richard Adams, Ames: Iowa state press. s: 117-124.
- ADAMS, R. (2001b). Autacoids and anti-inflammatory drugs. In: Veterinary Pharmacology and Therapeutics. 8th ed., eds., H. Richard Adams, Ames: Iowa state press. s: 403-407.
- AMOS, S., OKWUASABA, F.K., GAMANIEL, K., AKAH, P., WAMBEBE, C. (1998). Inhibitory effects of the aqueous extract of *Pavetta crassipes* leaves on gastrointestinal and uterine smooth muscle preparations isolated from rabbits, guinea pigs and rats. *J. Ethnopharmacol.* **61**: 209–213.
- AMOS, S., BINDA, L., KUNLE, O.F., OKAFOR, I., EMEJE, M., AKAH, P.A., WAMBEBE, C., GAMANIEL, K. (2003). Smooth muscle contraction induced by *Indigofera dendroides* leaf extracts may involve calcium mobilization via potential sensitive channels. *Phytother. Res.* **17**: 792–796.
- ANON, 2006. Proteinlerin saflaştırılması. Erişim: [http://yunus.hacettepe.edu.tr/~umut/lab\\_pdf/408.pdf](http://yunus.hacettepe.edu.tr/~umut/lab_pdf/408.pdf) Erişim Tarihi: 08.12.2006.
- BARRAU, E., FABRE, N., FOURASTE, I., HOSTE, H. (2005). Effect of bioactive compounds from sainfoin (*Onobrychis viciifolia Scop.*) on the in vitro larval migration of *Haemonchus contortus*: role of tannins and flavonol glycosides. *J. Parasitol.* **131**: 1–8.
- BAYDAN, E., ÜSTÜNER, E., İNCE, S. (2005). Tavşan ve koyun trakeası üzerine levamizolün etkisinin tek başına ve organik fosforlu (OF) bileşiklerle birlikte araştırılması. 2002-K-120-120130-8 kod nolu Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projesi. Rapor tarihi: 27.7.2005.
- BLATTANER, R., CLASSEN, H.G., DEHNERT, H., DÖRİNG, H.J. (1978). Experiments on Isolated Smooth Muscle Preparations. Hugo Sachs Elektronik KG, Germany.
- BURANAKARL, C., KIJTAWORNAT, A., ANGKANAPORN, K., KOMOLVANICH, S., BOVEE, K.C. (2001). Effects of bethanecol on canine urinary bladder smooth muscle function. *Res. Vet. Sci.* **71**: 175–181.
- CHEMICAL LAND21 (2004). Erişim: <http://www.chemicalland21.com/arokorhi/lifescience/foco/ARBUTIN.htm>. Erişim tarihi: 09.12.2004.
- Di CARLO, G., AUTORE, G., IZZO, A.A., MAIOLINO, P., MASCOLO, N., VIOLA, P., DIURNO, M.V., CAPASSO F. (1993). Inhibition of intestinal motility and secretion by flavanoids in mice and rats: structure-activity relationships. *J. Pharm. Pharmacol.* **45**: 1054–1059.



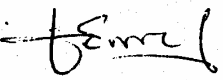


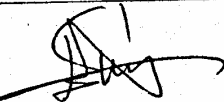
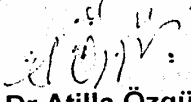
- Di CARLO, G., MASCOLO, N., IZZO, A.A., CAPASSO F. (1994). Effects of quercetin on gastrointestinal tract in rats and mice. *Phytother. Res.* **8**: 42–45.
- DOULL, J., KLAASSEN, C.D., AMDUR, O.M (1975). Casarett and Doull's Toxicology: the basic science of poisons. 2th ed., Macmillan, New york. p: 19.
- DUKE, J.A. (1983). Handbook of energy crops. (unpublished). Erişim: [http://www.hort.purdue.edu/newcrop/duke\\_energy/Vicia\\_faba.html](http://www.hort.purdue.edu/newcrop/duke_energy/Vicia_faba.html). Erişim tarihi: 28.12.2006.
- GRAPHPAD (2006). GraphPad Prism version 4.00 for windows paket programı. Erişim: <http://www.graphpad.com/welcome.htm?CFID=2071082&CFTOKEN=47c6521e98c29e46-72CCB5AA-1635-5B5F-C511A9504270311D>. Erişim tarihi: 25.09.2006.
- HAPNER, K.D., ROBBINS, J.E. (1979). Isolation and properties of lectin from sainfoin (*Onobrychis viciifolia*, Scop.). *Biochimica et Biophysica Acta* **580**: 186–197.
- HARBORNE, J.B. (1973). Phytochemical Metods: A guide to modern techniques of plant analysis. Chapman and Hall. London. s:1–232.
- HECKENDORN, F., HÄRING, D.A., MAURER, V., ZİNSSTAG, J., LANGHANS, W., HERTZBERG, H. (2006). Effect of sainfoin (*Onobrychis viciifolia*) silage and hay on established populations of *Haemonchus contortus* and *Cooperia curticei* in lambs. *Vet Parasitol.* **142**: 293–300.
- HOSTE, H., GAILLARD, L., FRILEUX, L.Y. (2005). Consequences of the regular distribution of sainfoin hay on gastrointestinal parasitism with nematodes and milk production in dairy goats. *Small Ruminant Res.* **59**: 265–271.
- INCHEM (1971). Toxicological evaluation of some extraction solvents and certain other substances. FAO Nutrition Meetings Report Series No. 48A WHO/FOOD ADD/70.39. Erişim: <http://www.inchem.org/documents/jecfa/jecmono/v48aje14.htm> Erişim tarihi: 28.12.2006.
- JONES, G.A., McALLISTER, T.A., MUIR A.D., CHENG, K.J. (1994). Effects of sainfoin (*Onobrychis viciifolia* Scop.) condensed tannins on growth and proteolysis by four strains of ruminal bacteria. *Appl. Envir. Microb.* **60**: 1374–1378.
- JUURLINK, B. (2003). The beginning of the nutri-geno-proteo-metabolo-mics era of nutritional studies. PBI bulletin (1). Erişim: [http://pbi-ibp.nrc-cnrc.gc.ca/en/bulletin/2003issue1/images/page4\\_04.gif](http://pbi-ibp.nrc-cnrc.gc.ca/en/bulletin/2003issue1/images/page4_04.gif). Erişim tarihi: 09.04.2007.
- KAYA, İ., KARADEMİR, B. (2002). Çayır-meranın Kars yöresi çiftlik hayvanlarının beslenmesi ve hastalık oluşturma-bulaştırmadaki rolü. *Lalahan Hay. Araşt. Enst. Derg.* **42**: 59–66.
- KAYA, S. (2006). Zehirli Maddelerin Labaratuar Analizi. Medisan Yayınevi. Ankara. s: 56–70.
- KAYA, S., BİLGİLİ, A. (2002). Zehirlenme ve zehirlilik denemeleri. Alınmıştır: Veteriner Hekimliğinde Toksikoloji. 2. Baskı. Ed.: Kaya,S., Pirinçci, İ., Bilgili., A. Medisan Yayınevi. Ankara s: 22.
- KOUPAI-ABYAZANI, M., McCALLUM, J., MUIR, A.D., BOHM, B.A., TOWERS, G.H.N., GRUBER, M.Y. (1993). Developmental changes in the composition of proanthocyanidins from leaves of sainfoin (*Onobrychis viciifolia* Scop.) as determined by HPLC analysis. *J. Agric. Food. Chem.* **41**: 1066–1070.

- LENNON, R.E., HUNN, J.B., SCHNICK, R.A. (1971). Reclamation of ponds, lakes and streams with fish toxicants: a review. FAO Fisheries Technical Papers - T100. Erişim: <http://www.fao.org/docrep/003/b0465e/B0465E09.htm#CH9.2>
- LU, Y., SUN, Y., FOO, L.Y., MCNABB, W.C., MOLAN, A.L. (2000). Phenolic glycosides of forage legume *Onobrychis viciifolia*. *Phytochemistry* **55**: 67–75.
- LUTTERODT, G.D. (1988). Responses of gastrointestinal smooth muscle preparations to a muscarinic principle present in *Sida veronicaefolia*. *J. Ethnopharmacol.* **23**: 313–322.
- MARAIS J.P.J., MUEULLER-HARVEY, I., BRANDT E.V., FERREIRA., D. (2000). Polyphenols, condensed tannins and other natural products in *Onobrychis viciifolia* (Sainfoin). *J. Agric. Food. Chem.* **48**: 3440–3447.
- MARTI, D., VILLAGRASA, V., MARTINEZ-SOLIS, I., BLANQUER, A., CASTILLO, E., MORENO, L.R. (2005). Hystological and pharmacological study of *Thymus piperella* (L.). *Phytother. Res.* **19**: 298–302.
- MEKONNEN, Y. (1999). Effects of ethanol extract of *Moringa stenopetala* leaves on guinea-pig and mouse smooth muscle. *Phytother. Res.* **13**: 442–443.
- MELI, R., AUTORE, G., Di CARLO, G., CAPASSO, F. (1990). Inhibitory action of quercetin on intestinal transit in mice. *Phytother. Res.* **4**: 201–202.
- MICHEL, A., MEVISSSEN, M., BURKHARDT, H.W., STEINER, A. (2003). In vitro effects of cisapride, metoclopramide and bethanechol on smooth muscle preparations from abomasal antrum and duodenum of dairy cows. *J. Vet. Pharmacol. Therap.* **26**: 413–420.
- MURRAY, M. (1991) Encyclopedia of Natural Medicine, Prima Publishing, Rocklin CA. pp. 258. Erişim: [http://medplant.nmsu.edu/arctostaphylos\\_arbutin.jpg](http://medplant.nmsu.edu/arctostaphylos_arbutin.jpg). Erişim tarihi: 09.04.2007.
- NAMEN, A.E., HAPNER, K.D. (1979). The glycosyl moiety of lectin from sainfoin (*Onobrychis viciifolia* Scop.). *Biochimica et Biophysica Acta* **580**: 198–209.
- NIAID (2007). National institute of allergy and infectious diseases. Erişim: [http://chemdb2.niaid.nih.gov/struct\\_search/images/structures/088684.gif](http://chemdb2.niaid.nih.gov/struct_search/images/structures/088684.gif). Erişim Tarihi: 09.04.2007.
- PAOLINI, V., FOURASTE, I., HOSTE H. (2004). In vitro effects of three woody plant and sainfoin extracts on 3rd-stage larvae and adult worms of three gastrointestinal nematodes. *J. Parasitol.* **129**: 69–77.
- PAOLINI, V., PREVOT, F., DORCHIES, P.H., HOSTE, H. (2005). Lack of effects of quebracho and sainfoin hay on incoming third-stage larvae of *Haemonchus contortus* in goats. The *Veterinary Journal* **170**: 260–263.
- PDRHEALTH (2004). Erişim: [http://www.gettingwell.com/drug\\_info/nmdrugprofiles/nutsupdrugs/rut\\_0230.shtml](http://www.gettingwell.com/drug_info/nmdrugprofiles/nutsupdrugs/rut_0230.shtml). Erişim tarihi: 09.12.2004.
- ROSS, J.A., KASUM, C.M. (2002). Dietary flavonoids: bioavailability, metabolic effects and safety. *Annu. Rev. Nutr.* **22**:19-34.
- SOMERVILLE, J. (2003). British wild flowers. Erişim: [www.british-wild-flowers.co.uk/.../Sainfoin.htm](http://www.british-wild-flowers.co.uk/.../Sainfoin.htm) Erişim Tarihi: 29.01.2007.

- SPEEDING, C.R.W., DIEKMAHNS E.C. (1972). Grasses and Legumes in British Agriculture. *Pastures Bulletin* No. 49, Commonwealth Bureau of Pastures and Field Crops, Farnham Royal, s: 511.
- SPSS (2002). Statistical Package for the Social Sciences. SPSS for Windows 11,5. serial no: 9024147.
- TİGEM (2004). Korunga ziraati. Erişim: <http://www.tigem.gov.tr/guncel/Korungatarimi.asp>. Erişim Tarihi: 03.12.2004.
- UENO, T., DUENES, J.A., KOST, L.J., SARR, M.G. (2004). Contractile activity of mouse small intestinal longitudinal smooth muscle. *J. Surg. Res.* **118**: 136–143.
- WIKIPEDIA (2007). Image: Kaempferol.png. Erişim: <http://en.wikipedia.org/wiki/Image:Kaempferol.png>. Erişim tarihi: 09.04.2007.
- VONGTAU, H.O., AMOS, S., BINDA, L., KAPU, S.D., GAMANIEL, K.S., KUNLE, O.F., WAMBEBE, C. (2000). Pharmacological effects of the aqueous extract of *Neorautanenia mitis* in rodents. *J. Ethnopharmacol.* **72**: 207–214.
- YÜKSEK, T., SARIYILDIZ, T., TÜFEKÇİOĞLU, A., KALAY, H.Z. (2002). Korunga (*Onobrychis viciifolia* Scop.) bitkisinin Gümüşhane tarım ve hayvancılığı açısından irdelenmesi. Gümüşhane ve yöresinin kalkınması sempozyumu. Bildiriler Kitabı. Cilt II. s: 616–626.

## Ek – 1 (Etik Kurul Kararı)

ANKARA ÜNİVERSİTESİ VETERİNER FAKÜLTESİ  
Etik Kurul Kararları

Karar Sayısı : 2005/03	Karar Tarihi: 05 Ocak 2005	
<p>Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Etik Kuruluna Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalından gönderilen "Farelerde Korunga Bitkisinin Bağırsaklara Etkisi" başlıklı proje değerlendirilmiştir.</p> <p>Çalışmada, toplam 150 adet fare kullanılacaktır.</p> <p>Projenin deney hayvanlarına ilişkin yönlerinin Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Etik Kurul Yönergesinin 13. Maddesinde belirtilen "etik kurallara uygunluk esası" dikkate alınarak hazırlandığı belirlenmiştir.</p> <p>Yönergede belirtilen "Araştırmacıların Sorumlulukları" ve "Hayvan Deneyleri ile İlgili İlkeler" başlıkları altındaki etik kurallar saklı kalmak koşuluyla projenin hazırlanmasında "Etik Kurul Yönergesi" ilkelerine uyulduğuna karar verilmiştir.</p>		
 Prof. Dr. Bahri Emre Başkan	 Prof. Dr. Öznur Poyraz Başkan Yardımcısı	 Prof. Dr. Bahattin Koç Üye
 Doç. Dr. Ender Yarsan Üye	 Yrd. Doç. Dr. Atilla Özgür Raportör	

## ÖZGEÇMİŞ

### I- Bireysel Bilgiler

Adı	Sinan
Soyadı	İnce
Doğum yeri ve tarihi	Eskişehir; 19 Temmuz 1976
Medeni durumu	Evli
Askerlik durumu	Yaptı
İletişim adresi ve tlf.	Afyonkarahisar Kocatepe Üniversitesi Veteriner Fakültesi Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalı Tel: 0-272-2281312

### II. Eğitimi

Lisans	Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi (1993-1998)
Lise	Eskişehir Cumhuriyet Lisesi (1990-1993)
Orta öğretim	Eskişehir Cumhuriyet Lisesi (1987-1990)
İlk okul	Eskişehir Milli Zafer İlköğretim Okulu (1982-1987)
Yabancı dil	İngilizce

### III. Ünvanlar

Araştırma Görevlisi	2001-
---------------------	-------

### IV. Mesleki Deneyimi

Özel Sektör	Çamlı Yem Besicilik Sanayi ve Pazarlama A.Ş.- saha veteriner hekimi (2000-2001)
-------------	---

### V. Bilimsel İlgi Alanları

Yayımları	Özdemir, M., Yavuz, H., <b>İnce, S.</b> (2004). Afyon bölgesi kuyu sularında nitrat ve nitrit düzeylerinin belirlenmesi. <i>Ankara Üniv. Vet. Fak. Derg.</i> 51(1); 25-48. Filazi, A. ve <b>İnce, S.</b> (2006). Genetiği değiştirilmiş organizmalar. <i>Veteriner Hekimler Derneği Dergisi</i> 2: 21-28. Karaçal, F., Toprak, Ş., <b>İnce, S.</b> (2006). Şanlıurfa ilinde insan ve hayvanlarda tüketime sunulan kuyu sularında nitrat ve nitrit düzeylerinin belirlenmesi. <i>Doğu Anadolu Bölgesi Araştırmaları</i> 4(3): 85-88.
-----------	---

## VI. Bilimsel Etkinlikler

### Seminerler

1. Bağlı kalıntılar
2. Genetiği değiştirilmiş organizmalar

### Projeler

Baydan, E., Üstüner, E., **İnce, S.**: Tavşan ve koyun trakeası üzerine levamizolün etkisinin tek başına ve organik fosforlu (OF) bileşiklerle birlikte araştırılması. 2002-K-120-120130-8 kod nolu Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projesi. Rapor tarihi: 27.07.2005.

Meriç, A., Yarsan, E., Altıntaş, L., **İnce, S.**, Babür, C., Güven, K., Yıldız, K., Karahan, S., Altıokka, G., Özbey, S.: Endoparaziter ve antiprotozoer olarak potansiyel antiparaziter etkili kimyasal bileşiklerin sentez yoluyla hazırlanması ve veteriner hekimlikte kullanımlarının araştırılması. Anadolu Üniversitesi Araştırma Fonu (A.Ü.A.F.) 20.10.2006 Proje no: 060333. (Devam Eden Proje)

### Kongre, Bilimsel toplantılar

Birinci Ulusal Veteriner Farmakoloji ve Toksikoloji Kongresi (Uluslararası Katılımlı). 22–24 Eylül 2005. Ankara. (Düzenleme Kurulu Üyesi).

Karaçal, F., Toprak, Ş., **İnce, S.** (2006). Şanlıurfa bölgesi kuyu sularında nitrat ve nitrit düzeylerinin belirlenmesi. 18.Ulusal Biyoloji Kongresi. Kuşadası/Aydın (poster sunumu).

## VII. Diğer Bilgiler

### Üyelik

Veteriner Farmakoloji ve Toksikoloji Derneği