



**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**



TÜRKİYE’DE YETİŞEN BAZI *BIDENS* L. TAKSONLARI ÜZERİNDE FARMAKOGNOZİK ARAŞTIRMALAR

Ülkü Gökçen İÇÖZ

**FARMAKOGNOZİ ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ**

DANIŞMAN

Prof. Dr. M. Levent ALTUN

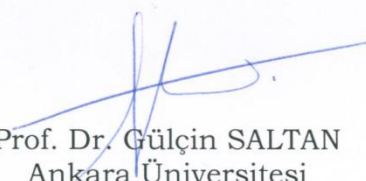
**Bu tez, TÜBİTAK Araştırma Destek Programları Başkanlığı tarafından 1002
Hızlı Destek Programı kapsamında 112S015 proje numarası ile desteklenmiştir.**

2013-ANKARA

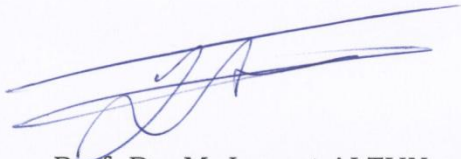
Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Farmakognozi Doktora **Programı**
çerçevesinde yürütülmüş bu çalışma aşağıdaki jüri tarafından
Doktora **Tezi** olarak kabul edilmiştir.

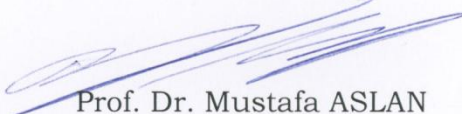
Tez Savunma Tarihi: 13/09/2013



Prof. Dr. Gülçin SALTAN
Ankara Üniversitesi
Jüri Başkanı



Prof. Dr. M. Levent ALTUN
Ankara Üniversitesi
Raportör



Prof. Dr. Mustafa ASLAN
Gazi Üniversitesi



Prof. Dr. İlkay ERDOĞAN ORHAN
Gazi Üniversitesi



Doç. Dr. Betül SEVER YILMAZ
Ankara Üniversitesi

İÇİNDEKİLER

Kabul ve Onay	ii
İçindekiler	iii
Önsöz	viii
Simgeler ve Kısaltmalar	xi
Şekiller	xv
Çizelgeler	xviii
1. GİRİŞ	1
1.1. Şeker Hastalığı-Diabetes Mellitus	4
1.1.1. Diyabetin Epidemiyolojisi	6
1.1.2. Diyabet Teşhisi ve Risk Faktörleri	6
1.1.3. Diyabetin Tedavisi	7
1.1.4. Diyabetin Neden Olduğu Kronik Komplikasyonlar	11
1.2. Antidiyabetik Aktivite Araştırma Yöntemleri	11
1.3. Serbest Radikal ve Antioksidan	14
1.3.1. Antioksidan Kapasite Tayin Yöntemleri	15
1.3.1.1. Hidrojen Transferine Dayanan Reaksiyonlar	15
1.3.1.1.1. Oksijen Radikal Absorbsiyon Kapasitesi Yöntemi (ORAC)	15
1.3.1.1.2. Toplam Radikal Tuzaklayıcı Antioksidan Parametre Yöntemi (TRAP)	16
1.3.1.1.3. Karotenoid (Krosin) Ağartma Yöntemi	16
1.3.1.2. Elektron Transferine Dayanan Reaksiyonlar (ET)	17
1.3.1.2.1. Folin-Ciocalteu Yöntemi (FC)	17
1.3.1.2.2. Troloks Eşdeğeri Antioksidan Kapasite Yöntemi (TEAC)	18
1.3.1.2.3. Demir (III) İyonu İndirgeyici Antioksidan Güç Yöntemi (FRAP)	18

1.3.1.2.4. 2,2-Difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) Radikal Süpürme Kapasitesi Yöntemi	19
1.3.1.2.5. Cu (II)'nin Oksidan Olarak Kullanıldığı Toplam Antioksidan Potansiyel Yöntemi (CUPRAC)	19
1.4. Botanik Bilgiler	21
1.4.1. Asteraceae Familyasının Özellikleri	22
1.4.2. <i>Bidens</i> L. Cins Özellikleri	23
1.4.2.1. <i>Bidens</i> L. Cinsinin Tayin Anahtarı	24
1.4.2.2. <i>Bidens</i> Türlerinin Türkiye'deki Yayılışı	24
1.4.2.3. <i>Bidens</i> Türlerinin Etnofarmakognozik Özellikleri ve Tedavide Kullanılışı	26
1.5. <i>Bidens</i> Türlerinden İzole Edilen Kimyasal Bileşikler	29
1.5.1. Flavonoidler ve Poliasetlenik Bileşikler	29
1.5.2. Terpen Glukozitleri, Jasmolon Glukozitleri, Depsidonlar	48
1.5.3. Terpenik ve Uçucu Bileşikler	50
1.5.4. Sükroz esteri ve Lignan Yapısında Bileşikler	54
1.5.5. Makro-Mikro Element İçeriği ve Besleyiciliği	56
1.6. <i>Bidens</i> Türlerinin Biyolojik Aktiviteleri	57
1.6.1. Antidiyabetik Aktivite	57
1.6.2. Antioksidan Aktivite	60
1.6.3. Antiinflamatuvar ve Antialerjik Aktivite	65
1.6.4. Yara İyileştirici Aktivite	67
1.6.5. Mide-Bağırsak Üzerine Etkileri	68
1.6.6. Antibakteriyel, Antifungal ve Antiviral Aktivite	70
1.6.7. Antihipertansif Aktivite	75
1.6.8. Antipiretik Aktivite	77
1.6.9. İmmünomodülatör Aktivite	77
1.6.10. Antikanser ve Antitümör Aktivite	78
1.6.11. Antimalaryal Aktivite	81
1.6.12. Karaciğer Üzerine Etkileri	83
1.6.13. Diüretik Aktivite	84

1.6.14. Diğer Etkiler	84
1.7. Toksisite Çalışmaları	88
1.8. Kontrendikasyonları	89
2. GEREÇ VE YÖNTEM	90
2.1. Gereç	90
2.1.1. Bitkisel Gereç	90
2.2. Yöntem	103
2.2.1. Ön Ekstraksiyon	103
2.2.2. Ekstre İçeriklerinin İnce Tabaka Kromatografisi (İTK) ile Karşılaştırılması	104
2.2.3. Aktivite Tayinleri İçin Ekstre Hazırlanışı	104
2.2.3.1. Sulu Ekstrelerin Hazırlanışı	104
2.2.3.1.1. Sulu Ekstrelerin Yüzde Verimleri	104
2.2.3.2. Etanollü Ekstrelerin Hazırlanışı	105
2.2.3.2.1. Etanollü Ekstrelerin Yüzde Verimleri	105
2.2.4. <i>B. tripartita</i> Etanol Ekstresinin Fraksiyonlanması	106
2.2.4.1. Ekstre ve Fraksiyonların Hazırlanmasında Kullanılan Çözücüler	108
2.3. Biyolojik Aktivite Çalışmaları	108
2.3.1. Antidiyabetik Aktivite Tayini	108
2.3.1.1. Normoglisemik Hayvanlar Üzerinde Çalışma	109
2.3.1.2. Glikoz-Hiperglisemik Hayvanlar Üzerinde Çalışma (Oral Glikoz Tolerans Testi-OGTT)	110
2.3.1.3. Diyabetik Hayvanlar Üzerinde Çalışmalar	110
2.3.1.4. Etanollü Ekstreler Üzerinde Antidiyabetik Aktivite Çalışmaları	111
2.3.1.5. <i>B. tripartita</i> 'nın Fraksiyonları Üzerinde Antidiyabetik Aktivite Çalışmaları	113
2.3.1.5.1. Fraksiyonlar İçin Doz Hesabı	114
2.3.1.6. Antidiyabetik Aktivitenin İstatistiksel Olarak Değerlendirilmesi	117

2.4. Antioksidan Aktivite Tayini	121
2.4.1. DPPH Serbest Radikal Süpürücü Aktivite	121
2.4.2. Metal (Demir) İyonu Şelasyon Etkisi	122
2.5. Asetilkolinesteraz Enzim İnhibitör Aktivite Tayini	122
2.6. HPLC, Sıvı Kromatografisi-Kütle Spektrofotometresi	123
Analizleri (HPLC-LC/MS ve UV Analizleri)	
2.6.1. HPLC Analiz Koşulları	124
2.6.2. LC-MS Analiz Koşulları	124
2.6.3. Kullanılan Çözücüler	125
2.6.4. Analiz ve Standart Numunelerinin Hazırlanması	125
2.6.4.1. Ekstre ve Fraksiyonlarda HPLC ve Sıvı Kromatografisi- Kütle Spektrometresi ile Taranan Bileşikler ve Molekül Ağırlıkları	125
2.7. Miktar Tayini İçin Kalibrasyon Eğrilerinin Oluşturulması	126
2.7.1. Analitik Yöntem Validasyonu	126
2.7.1.1. Doğrusallık	126
2.7.1.2. Kesinlik	127
2.7.1.2.1. Tayin Edilebilir En Düşük Limit (Teşhis Sınırı-TS) (Limit of Detection-LOD)	127
2.7.1.2.2. Hesaplanabilir En Düşük Limit (Tayin Alt Sınırı- TAS) (Limit of Quantitation-LOQ)	127
3. BULGULAR	129
3.1. Aktivite Bulguları	129
3.1.1. Antidiyabetik Aktivite Bulguları	129
3.2. Asetilkolinesteraz Enzim İnhibitör Aktivite Bulguları	147
3.3. Antioksidan Aktivite Bulguları	148
3.4. Teşhis ve Miktar Tayini Bulguları	151
3.5. Yöntem Validasyon Bulguları	170

4. TARTIŞMA	173
5. SONUÇ VE ÖNERİLER	182
ÖZET	186
SUMMARY	188
KAYNAKLAR	190
EKLER	202
ÖZGEÇMİŞ	203

ÖNSÖZ

Tarihten günümüze bütün çağlar düşünüldüğünde, bitkilerin insanların yaşamında geniş bir yer kapladığı görülmektedir. İnsanlığın başlangıcından beri bitkiler başta besin olmak üzere korunma, ısınma ve savunma aracı olarak kullanılmıştır. Daha sonraları bitkilerin hastalıklara da iyi geldiği keşfedilmiştir ve hastalıklardan korunmada ve tedavide de kullanılmaya başlanmıştır.

Tez konusu olarak seçtiğimiz *Bidens* türlerinin ülkemizde halk arasında kullanımına rastlanılmamış olmasına rağmen dünyada geniş bir kullanıma sahip olduğu belirlenmiştir. Yapılan literatür çalışmaları sonucu *Bidens* türlerinin geleneksel kullanımının biyolojik aktivite testleriyle desteklendiğinin görülmüş olması ülkemizde de yetişen bu cinsle çalışmanın gerekliliğini ortaya çıkarmıştır. Türkiye’de yetişen *Bidens cernua* var. *radiata*, *B. tripartita* ve *B. frondosa* taksonları üzerinde ülkemizde yapılmış herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu çalışma ile *B. cernua* var. *radiata*, *B. tripartita* ve *B. frondosa* ekstreleri üzerinde antidiyabetik etki başta olmak üzere antioksidan ve asetilkolinesteraz inhibitör aktivitelerin belirlenmesi, ekstrelerin enstrümental analizlerinin yapılarak söz konusu bitkilerin toprak üstü kısmında bulunan bazı kimyasal bileşiklerin kalitatif ve kantitatif olarak tespit edilmesiyle bilim dünyasına yeni veriler kazandırılması amaçlanmıştır. Bu araştırma Türkiye’de yetişen bazı *Bidens* L. türleri üzerinde yapılmış ilk kapsamlı çalışmadır.

Tez konumun seçilmesinde, çalışmalarımın her aşamasında bilgi ve tecrübelerinden faydalandığım, tez çalışması haricinde de hayatla

ilgili her konuda manevi desteğini benden hiç bir zaman esirgemeyen çok sevgili ve saygıdeğer hocam Prof.Dr. M. Levent Altun'a öncelikle sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmalarım boyunca ilgi ve yardımlarıyla bana destek olan, laboratuvarımızın tüm olanaklarından faydalanmamı sağlayan başta Anabilim Dalı Başkanımız Prof.Dr. Gülçin Saltan olmak üzere Farmakognozi Anabilim Dalı öğretim üyelerine ve araştırma görevlisi arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Antidiyabetik aktivite çalışmalarını birlikte yürüttüğümüz, tezimin her aşamasında ilgi ve emeğini esirgemeyen, beni dinleyen, her zaman yeni fikirler veren değerli hocam Prof.Dr. Mustafa Aslan ve birlikte çalıştığımız çiçeği burnunda doçent, sevgili arkadaşım Doç.Dr. Nilüfer Orhan'a teşekkürü bir borç bilirim.

Antioksidan ve asetilkolinesteraz inhibitör aktivite çalışmalarını birlikte yürüttüğümüz, her zaman desteğini hissettiğim sevgili hocam Prof.Dr. İlkey Erdoğan Orhan ve araştırma görevlisi sevgili arkadaşım Uzm.Ecz. F. Sezer Şenol'a teşekkür ederim.

Kromatografi analizlerim sırasında LC-MS cihazıyla ilgili yardımlarından dolayı sevgili hocam Prof.Dr. Murat Kartal ve sevgili arkadaşım Yard.Doç. Dr. Sinem Aslan Erdem'e teşekkür ederim.

Tez bitkilerimin teşhisinde büyük emeği olmasının yanı sıra arkadaşlığını ve sohbetlerini de benden esirgemeyen her daim genç,

çok sevgili hocam Doç.Dr. Ayşe Mine Gençler Özkan'a teşekkürlerimi sunarım.

Miktar tayini çalışmalarım sırasında gece gündüz yardımına koşan, çalışmalarımın her aşamasında destekleyen, hayatın getirdiği bütün iyi ve kötü şeyleri birlikte karşıladığım, canım arkadaşım Uzm.Ecz. Burçin Ergene'ye ve ortak duyguları paylaştığım, ilgisini, bilgisini ve sevgisini karşılıksız sunan çok sevgili arkadaşım Yard.Doç.Dr. Özlem Bahadır Acıkara'ya teşekkürü bir borç bilirim.

Bugünlere gelmemi sağlayan, beni her zaman destekleyen, yanımda olan canım aileme, hayatıma sevgi ve mutluluk katan bütün arkadaşlarıma ve doktora çalışmalarımı başından beri yakından takip eden, tez bitkilerimi bulmak ve toplamak için bataklıklarla boğuşan, gece yarılara kadar benimle laboratuvarında çalışan, tezimi yazdığım süre boyunca benimle uykusuz kalan, akademik çalışmalarımın büyük destekçisi, hayat arkadaşım, biricik eşim Kutluhan İçöz'e sonsuz şükranlarımı sunarım.

SİMGELER VE KISALTMALAR

α	Alfa
β	Beta
μl	Mikrolitre
AAPH	2'-Azobis(2-amidinopropan)hidroklorit
ABTS	2,2-Azino-bis-3-etilbenzotiyazolin-6-sülfonik asit
ACh	Asetilkolin
AChE	Asetilkolinesteraz
ADP	Adenozin difosfat
AEF	Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Herbaryumu
ALT	Alanin aminotransferaz
AST	Aspartat aminotransferaz
ATC	Asetiltiyokolin iyodür
ATP	Adenozin trifosfat
AUC	Area Under the Curve
BAYF	Biyoaktivite Yönlendirmeli Fraksiyonlama
BHT	Butilhidroksi tolüen
BSS	Bağıl Standart Sapma
BuOH	Butanol
CK-MB	Kardiyak kreatin kinaz
COSY	Correlation Spectroscopy
CUPRAC	Cupric Ion Reducing Antioxidant Capacity
DAD	Diode Array Dedector
DNA	Deoksiribonükleik asit
DNP	2,4-Dinitrophenylated Ascaris Extract
DOSY	Difussion-Ordered Spectroscopy
DPPH	2,2-difenil-1,2-pikrilhidrazil
DPP-IV	Dipeptidil peptidaz IV
DTNB	5,5-Ditiyobis (2-nitrobenzoik asit)

ED ₅₀	% 50 Effective Dose
EDTA	Etilendiamin tetraasetik asit
EI-MS	Electron Ionization-Mass Spectrometry
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
EPR	Elektron Paramanyetik Rezonans Spektroskopisi
EtOAc	Etil asetat
EtOH	Etanol
FAB-MS	Fast Atom Bombardment-Mass Spectrometry
FC	Folin-Ciocalteu
FCR	Folin-Ciocalteu Reaktif
GC	Gas Chromatography
GC-MS	Gas Chromatography-Mass Spectrometry
GGT	Gama glutamiltransferaz
GLP-1	Glucagon-Like Peptide 1
Glu	Glukoz
GAE	Gallik Acid Equivalents
GSH	Glutasyon
GSHPx	Glutasyon peroksidaz
GÜDAM	Gazi Üniversitesi Deney Hayvanları Araştırma Merkezi
HbA1c	Hemoglobulin A1c-Glikozillenmiş hemoglobin
HDL	High-density lipoprotein
HORAC	Hydroxyl Radical Antioxidant Capacity
HSV	Herpes Simplex Virus
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
HUVEC	Human Umbilical Vein Endothelium Cells
IC ₅₀	%50 İnhibisyon Sağlayan Konsantrasyon
IgE	İmmunoglobulin E
IOC	Inhibited Oxygen Uptake
IR	Infrared
İTK	İnce Tabaka Kromatografisi
LC-MS	Liquid Chromatography-Mass Spectrometry

LD	Letal Doz
LOD	Limit of Detection
LOQ	Limit of Quantitation
LPIC	Lipit Peroksidasyonunun İnhibisyon Kapasitesi
MeOH	Metanol
mg	Miligram
MIK	Minimum İnhibitör Konsantrasyon
MS	Mass Spectrometry
NBT	Nitroblue tetrazolium
NMR	Nükleer Manyetik Rezonans
NO	Nitrik oksit
NPH	Notral Protamin Hagedorn
NRU	Neutral Red Uptake
°C	Santigrat derece
OGTT	Oral Glukoz Tolerans Testi
ORAC	Oxygen Radical Absorbing Capacity
PE	Petrol Eteri
PHA	Phytohemagglutinin
PHT	1-fenilhepta-1,3,5-trin
PPAR	Peroksizom Proliferatör Aktivite Reseptörleri
R _f	Retention factor
RP	Reversed Phase
R _t	Retention time
SIM	Selected Ion Mode
SOD	Süperoksit dismutaz
STZ	Streptozotosin
TAS	Tayin Alt Sınırı
TS	Teşhis Sınırı
TEAC	Troloks Equivalent Antioxidant Capacity
TFA	Trifloro asetikasit
TBARS	Thiobarbituric acid reactive substances

TPTZ	2,4,6-Tripiridil s-triazin
TRAP	Total Radical Trapping Antioxidant Parameter
UV	Ultraviole

ŞEKİLLER

Şekil 2.1.	<i>B. cernua</i> var. <i>radiata</i> genel görünüş	92
Şekil 2.2.	<i>B. cernua</i> var. <i>radiata</i> çiçek ve yaprakları	93
Şekil 2.3.	<i>B. cernua</i> var. <i>radiata</i> herbaryum örneği (genel)	94
Şekil 2.4.	<i>B. cernua</i> var. <i>radiata</i> herbaryum örneği (çiçek ve yaprak)	95
Şekil 2.5.	<i>B. tripartita</i> genel görünüş	96
Şekil 2.6.	<i>B. tripartita</i> çiçek ve yapraklar	97
Şekil 2.7.	<i>B. tripartita</i> herbaryum örneği (Afyon)	98
Şekil 2.8.	<i>B. tripartita</i> herbaryum örneği (Düzce)	99
Şekil 2.9.	<i>B. frondosa</i> genel görünüş	100
Şekil 2.10.	<i>B. frondosa</i> çiçek ve yapraklar	101
Şekil 2.11.	<i>B. frondosa</i> herbaryum örneği (genel)	102
Şekil 2.12.	<i>B. frondosa</i> herbaryum örneği (çiçek ve yaprak)	103
Şekil 2.13.	<i>B. tripartita</i> toprak üstü kısımlarının etanollü ekstresinin çözücü-çözücü ekstraksiyonu ile fraksiyonlanması	107
Şekil 2.14.	Antidiyabetik aktivite deneylerinde kullanılan hayvanlar	119
Şekil 2.15.	Deney hayvanlarına STZ uygulanması	120
Şekil 3.1.	Klorojenik asit HPLC kromatogramı	152
Şekil 3.2.	Luteolin-7-O-glukozit (Sinarozit) HPLC kromatogramı	152
Şekil 3.3.	Luteolin HPLC kromatogramı	152
Şekil 3.4.	<i>B. tripartita</i> etanol ekstresi HPLC kromatogramı	153
Şekil 3.5.	<i>B. cernua</i> var. <i>radiata</i> etanol ekstresi HPLC kromatogramı	153
Şekil 3.6.	<i>B. frondosa</i> etanol ekstresi HPLC kromatogramı	153
Şekil 3.7.	<i>B. tripartita</i> sulu ekstresi HPLC kromatogramı	154

Şekil 3.8.	<i>B. cernua</i> var. <i>radiata</i> sulu ekstresi HPLC kromatogramı	154
Şekil 3.9.	<i>B. frondosa</i> sulu ekstresi HPLC kromatogramı	154
Şekil 3.10.	EtOAc fraksiyonu HPLC kromatogramı	155
Şekil 3.11.	<i>n</i> -BuOH fraksiyonu HPLC kromatogramı	155
Şekil 3.12.	<i>B. tripartita</i> etanol ekstresi LC-MS SIM tarama	156
Şekil 3.13.	EtOAc fraksiyonu LC-MS SIM tarama	156
Şekil 3.14.	<i>n</i> -BuOH fraksiyonu LC-MS SIM tarama	156
Şekil 3.15.	<i>B. tripartita</i> etanol ekstresi Klorojenik asit kütle parçalanması M^{+1} (Pozitif MOD)	157
Şekil 3.16.	<i>B. tripartita</i> etanol ekstresi Luteolin-7-O-glukozit (Sinarozit) kütle parçalanması M^{+1} (Pozitif MOD)	157
Şekil 3.17.	<i>B. tripartita</i> etanol ekstresi Luteolin kütle parçalanması M^{+1} (Pozitif MOD)	158
Şekil 3.18.	<i>n</i> -BuOH fraksiyonu Klorojenik asit kütle parçalanması M^{+1} (Pozitif MOD)	158
Şekil 3.19.	<i>n</i> -BuOH fraksiyonu Luteolin-7-O-glukozit (Sinarozit) kütle parçalanması M^{+1} (Pozitif MOD)	159
Şekil 3.20.	EtOAc fraksiyonu Klorojenik asit kütle parçalanması M^{+1} (Pozitif MOD)	159
Şekil 3.21.	EtOAc fraksiyonu Luteolin-7-O-glukozit (Sinarozit) kütle parçalanması M^{+1} (Pozitif MOD)	160
Şekil 3.22.	EtOAc fraksiyonu Luteolin kütle parçalanması M^{+1} (Pozitif MOD)	160
Şekil 3.23.	Klorojenik asit UV spektrumu	161
Şekil 3.24.	Luteolin-7-O-glukozit (Sinarozit) UV spektrumu	161
Şekil 3.25.	Luteolin UV spektrumu	162
Şekil 3.26.	<i>B. tripartita</i> etanol ekstresinde Rt: 6,765'teki pikin ve Klorojenik asitin UV'lerinin karşılaştırılması	162

Şekil 3.27.	<i>B. tripartita</i> etanol ekstresinde Rt: 16,766'daki pikin ve Sinarozit UV'lerinin karşılaştırılması	163
Şekil 3.28.	<i>B. tripartita</i> etanol ekstresinde Rt: 28,686'daki pikin ve Luteolin UV'lerinin karşılaştırılması	163
Şekil 3.29.	EtOAc fraksiyonundaki Rt: 6,747'deki pikin ve Klorojenik asit UV'lerinin karşılaştırılması	164
Şekil 3.30.	EtOAc fraksiyonundaki Rt: 16,752'deki pikin ve Sinarozit UV'lerinin karşılaştırılması	164
Şekil 3.31.	EtOAc fraksiyonundaki Rt: 28,661'deki pikin ve Luteolin UV'lerinin karşılaştırılması	165
Şekil 3.32.	<i>n</i> -BuOH fraksiyonundaki Rt: 6,755'deki pikin ve Klorojenik asit UV'lerinin karşılaştırılması	165
Şekil 3.33.	<i>n</i> -BuOH fraksiyonundaki Rt: 16,780'deki pikin ve Sinarozit UV'lerinin karşılaştırılması	166
Şekil 3.34.	<i>B. cernua</i> var. <i>radiata</i> etanol ekstresinde Rt: 6,760'da ki pikin ve Klorojenik asitin UV'lerinin karşılaştırılması	166
Şekil 3.35.	<i>B. cernua</i> var. <i>radiata</i> etanol ekstresinde Rt: 16,757'de ki pikin ve Sinarozit UV'lerinin karşılaştırılması	167
Şekil 3.36.	<i>B. frondosa</i> etanol ekstresinde Rt: 6,770'de ki pikin ve Klorojenik asitin UV'lerinin karşılaştırılması	167
Şekil 3.37.	<i>B. frondosa</i> etanol ekstresinde Rt: 16,780'de ki pikin ve Sinarozit UV'lerinin karşılaştırılması	168
Şekil 3.38.	Referans maddeler için kalibrasyon denklemleri ve grafikleri	171

ÇİZELGELER

Çizelge 1.1.	Tip 1 ve Tip 2 diyabetin karşılaştırılması	5
Çizelge 2.1.	HPLC çözücü akış grafiği	124
Çizelge 3.1.	<i>Bidens</i> türlerinin diyabetik sıçanların kan glukoz konsantrasyonları üzerine akut etkisi	130
Çizelge 3.2.	<i>Bidens</i> türlerinin diyabetik sıçanların kan glukoz konsantrasyonları üzerine subakut etkisi	132
Çizelge 3.3.	Subakut uygulamada diyabetik hayvanların vücut ağırlığı değişimleri tablosu	134
Çizelge 3.4.	<i>Bidens</i> türlerine ait etanollü ekstrelerin normoglisemik sıçanlar üzerindeki etkisi	136
Çizelge 3.5.	<i>Bidens</i> taksonlarına ait etanollü ekstrelerin glukoz hiperglisemik (OGTT) sıçanlar üzerindeki etkisi	138
Çizelge 3.6.	<i>B. tripartita</i> alt fraksiyonlarının sıçanlar üzerindeki etkisi	140
Çizelge 3.7.	<i>B. tripartita</i> alt fraksiyonlarının glukoz hiperglisemik (OGTT) sıçanlar üzerindeki etkisi	142
Çizelge 3.8.	<i>B. tripartita</i> alt fraksiyonlarının diyabetik sıçanlar üzerindeki akut etkisi	144
Çizelge 3.9.	<i>B. tripartita</i> alt fraksiyonlarının diyabetik sıçanlar üzerindeki subakut etkisi	145
Çizelge 3.10.	<i>B. tripartita</i> alt fraksiyonlarının diyabetik sıçanların vücut ağırlığı üzerindeki subakut etkisi	146

Çizelge 3.11.	<i>Bidens</i> türlerine ait etanollü ve sulu ekstrelerin asetilkolinesteraz enzim inhibitör aktivite sonuçları	147
Çizelge 3.12.	<i>Bidens</i> türlerine ait etanollü ve sulu ekstrelerin DPPH radikal süpürücü aktivite sonuçları	148
Çizelge 3.13.	<i>Bidens</i> taksonlarına ait etanollü ve sulu ekstrelerin metal şelasyon kapasiteleri	149
Çizelge 3.14.	<i>B. tripartita</i> alt fraksiyonlarının DPPH radikal süpürücü aktivite ve metal şelasyon kapasiteleri	150
Çizelge 3.15.	Etanollü ekstreler ve fraksiyonlarda klorojenik asit, sinarozit ve luteolin miktarları	169
Çizelge 3.16.	<i>Bidens</i> taksonlarının içerdikleri % klorojenik asit, sinarozit ve luteolin miktarları (% a/a)	169
Çizelge 3.17.	Doğrusallık Sonuçları	170
Çizelge 3.18.	Yöntem validasyonu için kesinlik değerleri ve % bağıl standart sapmaları (% BSS)	172
Çizelge 3.19.	Tayin edilebilir en düşük limit (Teşhis sınırı-TS) (LOD)	172
Çizelge 3.20.	Hesaplanabilir en düşük limit (Tayin alt sınırı-TAS) (LOQ)	172

1.GİRİŞ

Diyabet dünyada her geçen gün daha fazla sayıda insanı olumsuz etkileyen bir hastalıktır. Hiperglisemi pankreas beta hücrelerinden insülin salınımının yapılamaması, düşük düzeyde olması ya da insülin etkisinin azalması veya insülin reseptörlerinin cevapsızlığı sonucu meydana gelir. Kan glukoz seviyesini düzenleyen etkenler arasındaki dengesizliğin sonucunda karbonhidrat, lipit ve protein metabolizmasının yanı sıra sıvı ve elektrolit düzeyinde de bozukluklar belirir. Bunların sonucunda hiperglisemik durumdan ketoasidoit komaya kadar varan acil, hayatı tehdit eden durumlar yanında diyabetik nöropati, retinopati, glomerulopati, enfeksiyonlara ve ateroskleroza eğilim gibi mortalite ve morbiditeyi arttıran kronik tablolara yol açabilir (Şendoğdu, 2004).

Diyabette oksidatif stres de birçok mekanizmaya bağlı olarak artar. Yapılan çalışmalar artan reaktif oksijen ve azot türevlerinin oluşumunun ve zayıflayan antioksidan savunmanın bu karmaşık mekanizmaların temeli olduğunu göstermektedir. Diyabette oksidatif stresin artışına neden olan mekanizmalar tam olarak aydınlatılamamıştır. Ancak diyabetik hastalardaki yüksek glukoz düzeyinin oksidatif hasara neden olan süperoksit gibi serbest radikallerin oluşumunu artırmada en etkili neden olduğu bilinmektedir (Şendoğdu, 2004).

Alzheimer hastalığı yaşa bağlı olarak kognitif fonksiyonlarda ilerleyici bozulma, günlük yaşamın temel aktivitelerini gerçekleştirmede artan yetersizlik ve kişilik özelliklerinde dalgalanmalar ile seyreden geri dönüşsüz nörodejeneratif bir hastalıktır. Alzheimer hastalığının

fizyopatolojisi karmaşıktır. Son on yılda Alzheimer hastalığı konusunda yapılan çalışmaların çoğu hastalığın patogeneğinde oksidatif stres mekanizmaları ve bu mekanizmaların önemi üzerine odaklanmıştır. Alzheimer hastalığının etiolojisi ve patogeneğinde oksidatif stres ve serbest radikallerin rol oynadığına dair kanıtlar artmaktadır (Perry ve ark., 2002; Carreiras ve Marco, 2004; Chauhan ve Chauhan, 2006).

Bilim insanları, beyindeki nörotransmitter düzeylerinin Alzheimer hastalığı ile ilişkili olduğunu bilmektedirler. Sinir uyarısının nöron boyunca ilerlemesi sonucunda, aksondan asetilkolin (ACh) salınır. Asetilkolin dinlenme halindeki hücrede sinir iletimini yeniden oluşturmak için sinaptik boşluğu geçerek takip eden nörona bağlanır. Asetilkolini sinaptik aralıktan uzaklaştırmak için asetilkolinesteraz (AChE) enzimi nörotransmitteri hidroliz eder. Alzheimer hastalığının başlaması ile birlikte gerçekleşen nöron ve akson kaybı daha düşük düzeylerde ACh salınımına neden olur. Düşük konsantrasyondaki nörotransmitter düzeylerinde sinir iletilerinin devamlılığını sağlamak daha güç bir hal alır. ACh düzeylerini arttırmak için uygulanacak bir yöntem ise ACh'i yıkan AChE enziminin baskılanmasıdır. Çalışmalar, AChE inhibisyonuna bağlı ACh düzey artışlarının, Alzheimer hastalığının erken evrelerindeki kognitif yetmezliği iyileştirebileceğini göstermiştir. Zira, günümüzde Alzheimer hastalarının tedavisinde en çok reçete edilen ilaç grubu AChE inhibitörleridir (Talesa, 2001; Şahin, 2002).

Diyabetin kognitif becerilerin azalmasında da önemli bir etken olduğu düşünülmektedir. Diyabetik hastalarda diyabeti olmayanlara göre Alzheimer hastalığına yakalanma riskinin %65 daha fazla olduğu bulunmuştur (Arvanitakis ve ark, 2004). Son 15 yılda yapılan çalışmalarda özellikle Tip 2 diyabet'in zihinsel bozukluk ve demans

riskini artırdığı bulunmuştur. Nedeni kesin olarak bilinmemekle birlikte 25 araştırmanın sistematik incelenmesinde bu durum belirlenmiştir. Diyabetin damar sisteminde yaptığı harabiyetin demansa yol açtığı ileri sürülmektedir. Diyabetlilerde demans gelişme riski, diyabeti olmayanlara göre 1,6 kere daha fazladır. Ayrıca diyabet varlığı demanslıların ömrünü kısaltmaktadır. Diyabet eşliğinde yüksek tansiyon da varsa bu süre daha da kısalmaktadır (Selekler, 2009).

Bidens türleri geleneksel tıpta enflamasyon, romatizma, diyabet, enterit, faranjit gibi pek çok hastalığa karşı kullanılmaktadır (Alarcon-Aguilara ve ark., 1998; Chang ve ark., 2001; Wang ve ark., 2003). *Bidens* türlerinin diyabette kullanımı ile ilgili detaylı bilgiler biyolojik aktiviteleri ile ilgili literatür çalışmalarının özetlendiği kısımda verilmiştir. Bazı *Bidens* türleri üzerinde kimyasal içerik ve biyolojik aktivite çalışmaları yapılmış olmasına rağmen, Türkiye’de yetişen *Bidens cernua* var. *radiata*, *B. tripartita* ve *B. frondosa* taksonları üzerinde bu konularla ilgili ülkemizde yapılmış herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır.

Bu bilgilerin ışığında ülkemizde yetişen *Bidens* taksonlarından *B. cernua* var. *radiata*, *B. tripartita* ve *B. frondosa* ekstreleri üzerinde antidiyabetik etki başta olmak üzere antioksidan ve asetilkolinesteraz inhibitör aktivitelerin belirlenmesi, ekstrelerin analizlerinin yapılarak HPLC profillerinin oluşturulması ve standart maddeler ile İTK ve HPLC analizleri yapılarak söz konusu bitkilerin toprak üstü kısmında bulunan bazı kimyasal bileşiklerin kalitatif ve kantitatif olarak tespit edilmesiyle bilim dünyasına yeni veriler kazandırılması amaçlanmıştır.

1.1. Şeker Hastalığı-Diabetes Mellitus

“Diabetes” kelimesi Yunanca kökenlidir. Akıp gitme, sızma, boşalma anlamına gelmektedir. “Mellitus” ise mellit kelimesinden türemiş, şeker, karamel anlamındadır. “*Diabetes mellitus*” şeker sızdıran demektir. Eski zamanlarda hastalığın teşhisi idrarda şeker aranmasıyla yapıldığından bu şekilde adlandırılmıştır (Yenigün, 1995).

Pankreas hem peptit yapıda hormonlar olan insülin, glukagon ve somatostatini salgılayan bir endokrin bez, hem de sindirim enzimlerini salgılayan bir ekzokrin bezdir. Peptit hormonlar Langerhans adacıklarındaki hücrelerden salgılanır. β - veya B hücreleri insülini, α_2 veya A hücreleri glukagonu, α_1 veya D hücreleri somatostatini salgılar. Bu hormonlar metabolik aktiviteyi düzenler ve kan glukoz konsantrasyonunun sabit tutulmasını sağlar (Mycek ve ark., 1997).

Diyabet hiperglisemi ile seyreden yaygın bir metabolik bozukluktur. Tip 1 (insülin bağımlı) ve Tip 2 (insülin bağımlı olmayan) olmak üzere iki şekilde sınıflandırılmaktadır. Tip 1 diyabette insülin yetersizliği veya yokluğu söz konusudur. Tip 2 diyabet ise insülin direncinin değişimi, insülin salınımının azalması ya da artmış glukoz üretimi ile süregelen daha karmaşık bir bozukluktur (Powers, 2012).

Tip 2 diyabet nüfusun artışına, toplumların yaşlanmasına, obezitenin ve hareketsiz hayat tarzının artmasına paralel olarak görülme sıklığı hızla artan, uygun şekilde tedavi edilmediğinde ise morbidite ve mortalite artışına neden olan bir hastalıktır. Erken tanı ve yeterli tedavi ile hastaların hayat kalitesi yükseltilebilir, var olan

komplikasyonların gelişmesi yavaşlatılabilir, hatta bazı hastalarda önlenmesi mümkün olabilir (Ayvaz ve Kan, 2010).

Tip 1 ve Tip 2 dışında, gebelik diyabeti ve diğer spesifik tipler olarak adlandırılan; pankreastaki β hücrelerinde mutasyonlarla genetik hasar oluşması, insülin etkinliğinde meydana gelen bozukluklar, pankreasın ekzokrin bez görevini pankreatit, kistik fibrozis, hemokromatozis gibi hastalıklar nedeniyle yerine getirememesi, akromegali, Cushing sendromu, hipertiroidizm gibi endokrin hastalıklar, glukokortikoidler, rodentisitler, nikotinik asit, β -adrenerjik agonistler, hidantoin, α -interferon gibi kimyasal maddeler ve ilaçlara maruz kalma, konjenital rubella, *Cytomegalovirus* gibi enfeksiyon etkenleri, Wolfram sendromu, Down sendromu, Turner sendromu gibi genetik bozukluklar da diyabete neden olmaktadır. (Expert Committee, 1997; Powers, 2012).

Çizelge 1.1. Tip 1 ve Tip 2 diyabetin karşılaştırılması (Mycek ve ark., 1997)

	İnsüline Bağımlı Diyabet (Tip 1)	İnsüline Bağımlı Olmayan Diyabet (Tip 2)
Başlangıç Yaşı	Genellikle çocukluk veya pubertede	Genellikle 35 yaşın üstünde
Hastalığın başlangıcında beslenme durumu	Genellikle idealin altında vücut ağırlığı	Genellikle obezite eşlik eder
Görülme sıklığı	Tüm diyabetiklerin % 10-20'si	Tüm diyabetiklerin % 80-90'ı
Genetik yatkınlık	Orta	Güçlü
Yetersiz salgı veya hiç salgı olmaması	β hücreleri hasarı olduğundan insülin üretimi yoktur	β hücreleri yeterli insülin salgılayamazlar insülin direnci; diğer bilinmeyen defektler

1.1.1. Diyabetin Epidemiyolojisi

Diyabet dünya genelinde yıllar içinde dramatik bir artış göstermiştir. 1985 yılında 30 milyon civarında olduğu tahmin edilen diyabetli sayısı 2010 yılına gelindiğinde 285 milyona ulaşmıştır. Bu sayının 2030 yılına kadar 438 milyona ulaşabileceği düşünülmektedir. Dünya çapında her iki tip diyabette de artış görülmekle birlikte, çağımızda obezitenin artışı nedeniyle Tip 2 diyabet bulgusunda daha hızlı bir artış meydana gelmektedir. Diyabet ölüme sebebiyet veren majör hastalıklardan biridir fakat diyabet nedenli ölümlerin yeterince kayıt altına alınmadığı düşünülmektedir. 2007 yılında Amerika Birleşik Devletlerinde diyabet ölüm nedeni olarak 7. sırada iken, 2010 yılı itibariyle dünyada 5. sırada olduğu ve 4 milyon kişinin ölümünden sorumlu olduğu belirtilmektedir (Powers, 2012).

1.1.2. Diyabet Teşhisi ve Risk Faktörleri

Diyabet poliüri, polidipsi ve kilo kaybı gibi klasik belirtilerin yanında, kan glukozundaki değişimlerle tespit edilir.

1. Diyabet semptomlarına ek olarak randomize kan glukoz konsantrasyonunun 200 mg/dl (11,1 mmol/l) in üzerinde olması,
2. Açlık kan glukoz konsantrasyonunun 126 mg/dl (7 mmol/l) nin üzerinde olması,
3. Hemogloblin A1C seviyesinin % 6,5 üzerinde olması,
4. Oral Glukoz Tolerans Testi (OGTT) sırasında 2. saatteki kan glukoz konsantrasyonunun 200 mg/dl (11,1 mmol/l) in üzerinde olması diyabet teşhisini doğrulamaktadır.

Ailede diyabet öyküsünün bulunması, obezite (beden kütle indeksi-BKİ $\geq 25 \text{ kg/m}^2$), hareketsiz yaşam, etnik köken (Afrika kökenli, Asya

kökenli, Latin ve yerli Amerikalılar, Pasifikliler), gebelik diyabeti hikayesi veya 4 kilogramın üzerinde bebek sahibi olmak, hipertansiyon (kan basıncı $\geq 90/140$ mmHg), HDL kolesterolün 35 mg/dl seviyesinin altında, trigliseritin 250 mg/dl seviyesinin üzerinde olması, polikistik over sendromu ve ailede kardiyovasküler hastalık öyküsünün bulunması tip 2 diyabete yakalanma olasılığını artıran faktörlerdir (Powers, 2012).

1.1.3. Diyabetin Tedavisi

Diyabet tedavisinin temelini eğitim, plazma glukozunun normale çekilmesi, mikro ve makrovasküler komplikasyonların ve kardiyovasküler risk faktörlerinin kontrol altına alınması oluşturmaktadır. Diyabetin tipi ya da ön planda etkili olan mekanizma her ne olursa olsun, hastanın eğitimi, diyet ve egzersiz tedavinin değişmez öğeleridir. Bu tedavilere her hastada tanı anından itibaren başlanmalıdır. Medikal tedaviler ise önerilen tedavi hedeflerine ulaşmak üzere hastaların hiperglisemi dereceleri, ek hastalıkları, alışkanlıkları göz önünde bulundurularak düzenlenir (Ayvaz ve Kan, 2010).

Diyabet tedavisinde kullanılan başlıca preparat insülinidir. Tip 1 diyabette kullanımının yanı sıra bazen Tip 2 diyabette de kullanılabilir.

- A. Kısa Etkili İnsülin Preparatları: Regüler insülin kısa etkili, çözünür, kristal yapıda çinko insülinidir. Genellikle subkutan, acil durumlarda intra-venöz yolla uygulanır ve kan şekerini dakikalar içinde düşürür. Intra-venöz yolla uygulanabilen tek insülinidir. Tamponlanmış formu insülin pompalarında

kullanılır. Rekombinant insan insülini preparatları bulunmaktadır.

B. Orta Etkili İnsülin Preparatları:

1. Semilente İnsülin Süspansiyonları: İnsülinin çinko iyonu ile asetat tamponu içinde amorfik olarak çöktürülmesiyle elde edilir ve intravenöz uygulamaya uygun değildir.
2. İzofan İnsülin Süspansiyonu: Nötral protamin Hagedorn (NPH) olarak adlandırılır. Kristalize çinko insülinin nötr pH'da pozitif yüklü polipeptit protamin ile birleşmesinden oluşan süspansiyondur. Sadece subkutan uygulanır. Diyabetik ketoasidoz ve hiperglisemiye bağlı acillerde kullanılmaz
3. Lente İnsülin: %30 semilente insülin ile %70 ultralente insülin karışımından oluşur. Emilim hızlı etki süresi biraz daha uzundur. Orta etkili insülinler içinde en çok kullanılandır. Sadece subkutan yolla verilir.
4. İnsülin Kombinasyonları: %70 izofan+%30 regüler insülin veya her iki insülinin %50 oranında karışımından oluşur.

C. Uzun Etkili İnsülin Preparatları: Kristalize çinko insülinin asetat tamponu içerisinde yavaş çözünen süspansiyonudur. Etkisi yavaş ortaya çıkar ve hipoglisemik etkisi uzun sürelidir.

Tip 2 diyabetin tedavisinde oral hipoglisemik ilaçlar kullanılır.

A. Sülfonilüre Grubu (İnsülin Salgılatıcı İlaçlar): Etki mekanizmaları şunlardır. 1) Pankreasın β hücrelerinden insülin salınımının stimüle edilmesi, 2) serum glukagon seviyesinin azaltılması, 3) insülinin hedef doku ve reseptörlere

bağlanması artırılması. Primer ilaçlar tolbutamit, gliburit ve glipizittir. Asetohekzamit, klorpropamit, tolazamit, glimeprit ve gliklazit de örnek olarak verilebilir. Oral yolla uygulandıklarında serum proteinlerine bağlanırlar, karaciğerde metabolize edilirler, karaciğer veya böbreklerden atılırlar. Hepatik ve renal yetmezliği olanlarda hipoglisemiye neden olabileceklerinden kontrendikedirler. Plasentadan geçerek fetüs pankreasının tüm insülinini tüketebilirler. Hamileler için sakıncalıdır.

B. Biguanitler (İnsülin Duyarlılaştırıcı İlaçlar): Sülfonilüre grubundan farkı, insülin sekresyonunu uyarmamalarıdır. Hipoglisemi riski sülfonilüre grubundan daha düşüktür. Metformin tek başına veya sülfonilüre grubu ile birlikte kullanılabilir. Glukoneogenezi engelleyerek karaciğerden kana verilen glukoz miktarını azaltır. Hiperlipidemiye önler. Hastalar genellikle kilo kaybederler. Bazı uzmanlar yeni tanı konan Tip 2 diyabetiklerin tedavisinde ilk ilaç olarak tercih etmektedirler. Oral yolla alındıktan sonra Emilimi çok iyidir, serum proteinlerine bağlanmaz ve metabolize edilmez, böbreklerden atılır. Gastrointestinal sistemde yan etki gösterirler. Nadiren ölümle sonuçlanan laktik asidoz geliştirebildiğinden fenformin kullanımdan kaldırılmıştır. Uzun süreli kullanılması B₁₂ vitamininin emilimini bozabilir, renal ve hepatik yetmezliği olanlarda kontrendikedir.

C. Enzim İnhibitörleri: Akarboz, miglitol ve vogliboz α -glukozidaz enzimini inhibe ederek, nişasta ve disakkaritlerin emilimini azaltırlar. Türkiye’de sadece akarboz bulunmaktadır. Pankreastan insülin salınımını ya da insülinin periferik dokulardaki etkilerini artırmadığından hipoglisemiye yol açmazlar. Postprandial (yemek sonrası) glisemiye düzenlerler.

Oral hipoglisemiklerle ve insülinle birlikte kullanılabilirler. Şişkinlik, diyare ve abdominal kramplara neden olabilirler.

İnkretin mimetik ilaçlar, inkretin hormonları taklit ederek ya da inkretinlerin degradasyonunu inhibe ederek etki gösterirler. Bu yeni grup ajanlar içinde Glukagon-benzeri peptit 1 (GLP-1) analogları ve dipeptidil peptidaz IV (DPP-IV) inhibitörleri yer almaktadır. Saksagliptin, sitagliptin, vildagliptin DPP-IV enzimini inhibe ederler. Hipoglisemiye neden olmazlar. GLP-1'in parçalanmasını engelleyerek inkretin etkiyi artırılar.

D. Tiazolidindionlar (İnsülin Duyarlılaştırıcı İlaçlar): Rosiglitazon ve pioglitazon bu gruptaki ilaçlardır. İnsülin direncini düşürürler. Periferik ödem, kilo alımı, kardiyovasküler riskler gibi yan etkileri bulunmaktadır. Hepatik yetmezliği olanlarda kontrendikedirler.

E. Non-Sülfonilüreler (Meglitinitler-İnsülin Salgılatıcı İlaçlar): Repaglinit ve nateglinit bu grup ilaçlardır. İnsülin salınımını artırır. Kısa sürede etki ederler ve postprandial glisemiye düzenlerler. Renal veya hepatik yetmezliği olanlarda kontrendikedirler.

Açıklananlar dışında, parenteral olarak kullanılan GLP-1 reseptör agonistleri ve amilin agonistleri de diyabet tedavisinde kullanılmaktadırlar. Eksenatit ve liraglutit GLP-1 reseptör agonistleridir. İnsülini artırıp glukagonu düşürerek ve mide boşalmasını geciktirerek etki ederler. Hipoglisemiye ve kilo alımına neden olmazlar. Pramlintit ise amilin agonistidir. Glukagonu azaltıp mide boşalmasını geciktirerek etki eder. Postprandial glisemiye düzenler, kilo kaybı sağlarlar.

İlaç kullanımı dışında diyabet tedavisi sırasında düşük kalorili ve yağdan fakir beslenme, fiziksel aktivitede bulunma da insülin salınımını artırıcı ve insülin direncini düşürücü etki sağlamaktadır (Mycek ve ark., 1997; Ayvaz ve Kan, 2010; Powers, 2012).

1.1.4. Diyabetin Neden Olduğu Kronik Komplikasyonlar

Mikrovasküler Bozukluklar: Göz hastalıkları (retinopati), makular ödem, nöropati, nefropati

Makrovasküler Bozukluklar: Koroner kalp hastalıkları, periferik arter hastalıkları, serebrovasküler hastalıklar

Diğerleri: Mide-bağırsak hastalıkları (gastroparezi, diyare), genitoüriner hastalıklar (üropati, seksüel disfonksiyon), deri hastalıkları, enfeksiyonlar, katarakt, glokom, dişeti rahatsızlıkları, duyma kaybı

(Powers, 2012)

1.2. Antidiyabetik Aktivite Araştırma Yöntemleri

Diyabet çeşitli hayvan türlerinde;

- Cerrahi,
- Farmakolojik,
- Genetik yöntemlerle oluşturulabilmektedir.

İlk deneysel klasik diyabet modeli köpeklerde pankreasın çıkartılması (pankreatektomi) ile oluşturulmuştur. Cerrahi yolla diyabet oluşturulurken pankreasın %90'ına yakın kısmı çıkarılmaktadır.

Farmakolojik yöntemler arasında streptozotosin ve alloxan en çok kullanılan diyabetojenik ajanlardır ve hastalığın birçok görünümünü

çalışmak üzere iyi birer modeldir. İki ilaç da parenteral, intravenöz, intraperitoneal veya subkutan olarak kullanılırlar. Birlikte verildikleri tampon çözelti ve pH'sı kritik önem taşır. Verildikleri doza göre deney hayvanlarında Tip 1 ve Tip 2'ye benzer sendromlar veya glukoz intoleransı görülür (Gür, 2010).

Yetişkin sıçanlarda tek doz (40-60 mg/kg) damar içi yolla STZ uygulaması insüline bağımlı diyabete, ergin olmayan sıçanlara tek doz periton içi veya damar içi yolla 100 mg/kg STZ uygulaması ise insülin bağımsız diyabete neden olmaktadır (Öntürk ve Özbek, 2007). Alloksanın toksik etkisi özellikle pankreas β hücrelerine özgüdür. Glukozla uyarılan insülin salınımını inhibe eder; yüksek dozları ise β hücre nekrozu yapar (İrer ve Alper, 2004).

Genetik modeller, alloksan veya streptozotosin gibi kimyasal ilaçların meydana getirdiği istenmeyen yan etkiler olmaksızın ilacın etkisinin değerlendirilmesine olanak sağlar. İnsülin direnci; obezite, dislipidemi ve hipertansiyonla birlikte geliştiğinden tip 2 diyabetin fizyopatolojik mekanizmalarını çalışmak için genetik modeller ideal gibi görünmektedirler. Ob/Ob fareler ve spontan diyabetik Gato-Kakizaki sıçanlar Tip 2 modeli çalışmak için uygundur. NOD fareler 12-13. haftalarda hiperglisemi gösterdiklerinden Tip 1 model için kullanılırlar (Gür, 2010).

Kimyasal ve doğal kaynaklı ilaç maddeleri için inkretinler, PPAR- γ (peroksizom proliferatör aktivite reseptörler- γ) gibi transkripsiyon faktörleri önemli *in vivo* modellerdir.

Antidiyabetik aktivite araştırmalarında *in vivo* modelleri tamamlayıcı olarak insülin sekresyonu ve glukoz alımı ile ilgili *in vitro* çalışmalar da yapılmaktadır. Pankreatik adacık hücreleri kullanılarak yapılan deneylerde insülin salgılanmasının farklı adımları çalışılır.

Pankreasın β hücrelerinde sitoplazmik ATP/ADP oranındaki artma sonucu voltaja bağımlı Ca^{+2} kanalları aktive edilerek plazma membranının depolarizasyonu ile ATP-duyarlı K^{+} kanalları kapatılmaktadır. Intraselüler Ca^{+2} konsantrasyonunun artması insülin salgılanmasının başlamasına neden olur. Bu yollar hem kontrol hem de diyabetik sıçanlar veya farelerde izole pankreatik β hücreleri ile çalışılmaktadır. İnsülin salgılayan hücre kültürlerinde de antidiyabetik aktivite deneyleri yapılmaktadır. Çok kullanılan hücre kültürleri RIN, HIT, β -TC, MIN6 ve INS-1'dir (Fröde ve Medeiros, 2008; Gür, 2010).

Glukoz alım (*up-take*) inhibisyonunu değerlendirmek için karaciğer perfüzyonu gibi *in vivo* çalışmalar, gastrointestinal absorpsiyon metotları ve antioksidan enzim sistemleriyle karaciğer glikojen düzeyi tahmin edilmektedir.

Glukoz alımı için yapılan *in vitro* çalışmalarda adipoz dokunun, obezite ile Tip 2 diyabet arasında anahtar olduğu düşünülmektedir. İntraselüler lipit konsantrasyonu ve insülin direncinin artması hücre hasarına neden olur ve lipotoksisite gelişir, obezite ve Tip 2 diyabet ilerler. İnsülin direnci ile ilişkili yollar çeşitli adiposit hücre kültürleri kullanılarak araştırılır.

Antidiyabetik aktivite akut veya kronik olarak tedaviden sonra deney hayvanlarında, beden ağırlığı, günlük içilen su, yenilen yem miktarı, oral glukoz tolerans testi, açlık kan glukozu, serum lipit düzeyleri, karaciğer glikojeni, serum insülin düzeyi, glukozillenmiş hemoglobin düzeyi (HbA_{1c}), karbonhidratları metabolize eden enzim düzeyleri gibi parametrelerle incelenir. İlacın yara iyileşmesine etkileri ve antioksidan özellikleri diyabetik ve diyabetik olmayan hayvanlarda araştırılan diğer parametrelerdir (Gür, 2010).

1.3. Serbest Radikal ve Antioksidan

Oksijen insan yaşamı için çok elzem olmasına karşın, normal metabolizma sırasında üretilen bazı reaktif oksijen türleri vücuda yoğun bir zarar verme potansiyeline sahiptir. Çoğunu serbest radikallerin oluşturduğu reaktif oksijen türleri normal oksijen molekülüyle karşılaştırıldığında, kimyasal reaktivitesi daha yüksek olan oksijen formlarıdır. Serbest radikaller, dış atomik orbitallerinde bir veya daha fazla çift oluşturmamış elektron içeren yüksek enerjili, stabil olmayan bileşiklerdir. Bu çiftlenmemiş elektron serbest radikallere büyük bir reaktivite kazandırarak protein, lipid, DNA ve nükleotit koenzimler gibi birçok biyolojik materyale zarar vermelerine neden olmaktadır. Bu zararın yaşanmayı teşvik ettiği ve ayrıca kalp-damar hastalıkları, çeşitli kanser türleri, katarakt, bağışıklık sisteminde zayıflama, sinir sistemi dejeneratif hastalıkları gibi birçok hastalığa sebep olduğuna dair bilgiler bulunmaktadır.

Serbest radikallerin neden olduğu oksidasyonları önleyen, serbest radikalleri yakalama ve stabilize etme yeteneğine sahip maddelere “antioksidan” adı verilir. Antioksidanlar mekanizmalarına göre, birincil ve ikincil antioksidanlar olmak üzere ikiye ayrılmaktadır. Birincil antioksidanlar; mevcut radikallerle reaksiyona girerek bunların daha zararlı formlara dönüşmelerini ve yeni serbest radikal oluşumunu önleyen bileşiklerdir. Birincil antioksidan kategorisinde yer alan süperoksit dismutaz (SOD), glutatyon peroksidaz (GSHPx) ve katalaz gibi enzim sistemleri serbest radikalleri yok etme yeteneğindedir. Bu enzimler genel olarak serbest radikallerin DNA, proteinler ve lipitler gibi hücrel bileşenlere zarar vermesini sınırlandırmak suretiyle bir hücrel bölgeden diğerine geçişini de önleyebilmektedirler. İkincil antioksidanlar ise; oksijen radikalini

yakalayan ve radikal zincir reaksiyonlarını kıran C vitamini, E vitamini, ürik asit, bilirubin ve polifenoller gibi bileşiklerdir (Koca ve Karadeniz, 2003).

1.3.1. Antioksidan Kapasite Tayin Yöntemleri

Reaksiyon mekanizmalarına göre antioksidan kapasite tayinleri başlıca iki gruba ayrılabilir:

1. Hidrojen transferine dayanan reaksiyonlar (HAT)
2. Elektron transferine dayanan reaksiyonlar (ET)

Üçüncü bir grup hem HAT hem de ET reaksiyon mekanizmalarını içerir.

1.3.1.1. Hidrojen Transferine Dayanan Reaksiyonlar

1.3.1.1.1. Oksijen Radikal Absorbsiyon Kapasitesi Yöntemi (ORAC)

ORAC yöntemi başlangıçta Ghiselli ve arkadaşları (1995) ve Glazer (1990) tarafından çalışılmıştır. Daha sonra Cao ve arkadaşları (1993) tarafından geliştirilmiştir. ORAC peroksil radikalinin antioksidan inhibisyonunu ölçer. Bu yöntemde peroksil radikali floresans özellik gösteren bir molekülle (prob) floresans olmayan bir ürün oluşturmak üzere reaksiyona girer.

Antioksidanın koruyucu etkisinin hesaplanması, floresans bozunma eğrisinin altındaki integre edilmiş net alandan yapılır (AUC).

[Alan antioksidan- Alan kör (antioksidan olmayan)]

Böylece peroksil radikalleri ile oksitlenen bir hedef molekülün bir antioksidan tarafından ne kadar korunduğu, hedef molekülün bozunması floresans takibi ile izlenerek bulunur (Büyüktuncel, 2013).

1.3.1.1.2. Toplam Radikal Tuzaklayıcı Antioksidan Parametre Yöntemi (TRAP)

Orijinal TRAP yöntemi Wayner ve arkadaşları (1985) tarafından geliştirilmiştir ve insan plazmasının antioksidan kapasitesinin değerlendirilmesi için kullanılmıştır. Bu yöntem, bir azo bileşiğinin [AAPH= 2'-azobis(2-amidinopropan)hidroklorit] termal bozunmasıyla indüklenen kontrollü bir lipid peroksidasyon reaksiyonu esnasında oksijen tüketiminin ölçülmesi temeline dayanır. Wayner metodunda, çözünmüş oksijen tüketimi, lipid peroksidasyon hızının bir göstergesidir ve bundan dolayı plazmanın bu reaksiyonu engelleme kabiliyetinin dolaylı olarak ölçülmesidir (Badarinath ve ark., 2010; Büyüktuncel, 2013).

1.3.1.1.3. Karotenoit (Krosin) Ağartma Yöntemi

Karotenoitlerin otooksidasyon yoluyla renkleri açılır. Oksidasyon ışık veya ısı yoluyla veya peroksil radikalleri ile başlatılır. Bu renk açılması radikallere hidrojen atomu veren klasik antioksidanlar tarafından önlenabilir veya azaltılabilir. Hedef olarak β -karoten sıklıkla kullanılmasına rağmen, β -karotenin 470 nm'de rengini kaybetmesi, birkaç yolla olabilir. Bu yüzden sonuçların yorumlanması zordur. Buna karşılık, ilk olarak Bors ve arkadaşları

(1984) tarafından önerilen krosinin yalnızca radikal oksidasyonu yoluyla rengi açılır. Bu nedenle β -karoten yerine tercih edilir (Huang ve ark., 2005; Büyüktuncel, 2013).

1.3.1.2. Elektron Transferine Dayanan Reaksiyonlar (ET)

Spektrofotometrik ET-dayanan metotlar; bir reaksiyon karışımında iki bileşen içerir: Antioksidan ve oksidan. Oksidan antioksidandan bir elektron alır ve bu oksidanda renk değişimine neden olur. Renk değişiminin derecesi, antioksidan derişimiyle orantılıdır.

1.3.1.2.1. Folin-Ciocalteu Yöntemi (FC)

Folin-Ciocalteu reaktifi (FCR) molibdofosfotungstik heteropoliasittir. FCR, fenolik olmayan pek çok bileşik tarafından (Örneğin vitamin C, aromatik aminler, Cu(I) gibi) indirgenebileceği için, fenolik bileşiklere spesifik değildir. FC metodu gerçekte bir örneğin indirgeme kapasitesini ölçer (Prior ve ark., 2005). Fenolik bileşikler FCR ile yalnız bazik koşullar altında reaksiyona girerler (Sodyum karbonat çözeltisiyle pH 10'a ayarlanır). Fenolik bir protonun ayrılması, FCR'yi indirgeme yeteneğine sahip bir fenolat anyonun oluşmasına neden olur. Fenolat ve FCR arasında oluşan mavi bileşikler, fenolik bileşiklerin yapısından bağımsızdır. Bu yüzden metal merkez ve fenolik bileşikler arasında koordinasyon bileşiği oluşma olasılığı göz ardı edilir (Huang ve ark., 2005). Mavi renkli kompleks oluşumu 765 nm'de spektrofotometrik olarak ölçülür. Standart olarak genellikle gallik asit kullanılır ve sonuçlar gallik asit eşdeğeri olarak (mg/L) ifade edilir (Büyüktuncel, 2013).

1.3.1.2.2. Troloks Eşdeğeri Antioksidan Kapasite Yöntemi (TEAC)

TEAC yöntemi ilk olarak Miller ve Rice-Evans tarafından 1993 yılında rapor edilmiştir. Re ve arkadaşları (1999) bu metodu geliştirmişlerdir. Geliştirilmiş yöntemde, 2,2'-azinobis(3-etilbenzotiyazolin-6-sülfonik asit) (ABTS)'in persülfatla oksidasyonu ile, ABTS^{•+} radikali oluşturulur. Bu radikal, toplam radikal süpürme kapasitesini ölçmek için kullanılır. Bu metot antioksidan bileşikler tarafından ABTS'nin rengini kaybetmesi temeline dayanır. Moleküllerin kararlı serbest radikali süpürme kabiliyeti, vitamin E'nin suda çözünebilen bir analogu olan Troloks (6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karboksilik asit) ile karşılaştırılması yapılır (Büyüktuncel, 2013).

1.3.1.2.3. Demir (III) İyonu İndirgeyici Antioksidan Güç Yöntemi (FRAP)

FRAP yönteminin avantajı elektron-transfer reaksiyonu olmasıdır. Burada Fe(III) tuzu, Ferriktripiridiltriazin, [Fe(III)(TPTZ)₂Cl₃] (TPTZ=2,4,6- tripiridil s-triazin)], oksidan olarak kullanılır (Benzie ve Strain, 1996). Fe(III) tuzu redoks potansiyeli (~70 V) ABTS'nin redoks potansiyeli (0,68 V) ile benzerdir. Bu yüzden, TEAC ve FRAP yöntemleri arasında pek fark yoktur. TEAC yöntemi, nötral pH'da, FRAP yöntemi ise demirin çözünürlüğünü sağlamak için asidik koşullarda (pH 3,6) gerçekleştirilir. Düşük pH değerinde, Fe(III)- TPTZ kompleksi, Fe(II) formuna indirgenir. Bu kompleks koyu mavi renklidir ve absorpsiyon maksimumu 593 nm'dir. FRAP sonuçları, analiz zamanına bağlı olarak büyük ölçüde değişebilir. Hızlı reaksiyon veren polifenoller, 4 dakika gibi kısa analiz zamanlarında tayin edilirler. Bununla birlikte, bazı polifenoller daha yavaş reaksiyon verirler ve tayin için daha uzun analiz süreleri gerektirirler (30

dakikadan birkaç saate kadar). Pulido ve arkadaşları, kafeik asit, tannik asit, ferulik asit, askorbik asit ve kersetin gibi polifenoller için absorbandsın 593 nm’de yavaş yavaş arttığını saptamışlardır (Pulido ve ark., 2000).

1.3.1.2.4. 2,2-Difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) Radikal Süpürme Kapasitesi Yöntemi

DPPH• radikali, birkaç kararlı organik azot radikalinden bir tanesidir. Koyu menekşe renktedir. Bu metot DPPH radikalının antioksidanlar tarafından bir redoks reaksiyonuna bağlı olarak süpürülmesi temeline dayanır. Metanolik DPPH çözeltisinin koyu menekşe rengi açılır ve absorbanstaki azalma UV spektrofotometresiyle ölçülür (Büyüktuncel, 2013).

1.3.1.2.5. Cu(II)’nin Oksidan Olarak Kullanıldığı Toplam Antioksidan Potansiyel Yöntemi (CUPRAC)

Bu yöntem, bir numunedeki antioksidanlar tarafından Cu(II)’nin Cu(I)’e indirgenmesi temeline dayanır. Apak ve arkadaşlarının (2004) geliştirdiği bu yöntemde, 2,9-dimetil-1,10- fenantrolin (Neokuproin veya Nc)’in Cu(II) ile oluşturduğu bakır(II)-neokuproin kompleksinin (Cu(II)-Nc), 450 nm’de maksimum absorbands veren bakır(I) neokuproin [Cu(I)-Nc] kelatına indirgenme yeteneğinden yararlanarak antioksidan kapasite hesaplanmaktadır (Büyüktuncel, 2013).

Yukarıda açıklanan yöntemler dışında, Hidroksil Radikali Süpürücü Etki (HORAC), Lipit Peroksidasyonunun İnhibisyon Kapasitesi (LPIC),

Oksijen Alınımının İnhibisyonu (IOC) gibi spektrometrik yöntemler de kullanılmaktadır (Badarinath ve ark., 2010; Pisoschi ve Negulescu, 2011).

Spektrometrik yöntemlerin yanı sıra kromatografik yöntemler (Gaz kromatografisi ve HPLC) ve elektrokimyasal yöntemler (Siklik voltametri, amperometrik yöntem, biamperometrik yöntem, biosensör yöntem) de antioksidan kapasitenin tayininde kullanılmaktadır (Pisoschi ve Negulescu, 2011).

1.4. Botanik Bilgiler

İlk kez 1753 yılında Linne'nin *Species Plantarum* isimli eserinde yer alan (Connelly, P., 2009) ve Asteraceae familyasında bulunan *Bidens* L. cinsinin dünyada yaklaşık olarak 280 türü yetişmektedir. (Korkmaz ve ark.,2011). Cinse ait türlerin çoğunluğu Amerika kıtasında yetişmekte olup, Avrupa'da 4-5 türü bulunmaktadır (Chalchat ve ark., 2009). Ülkemizde 4 tür, 5 takson ile temsil edilmektedir (Korkmaz ve ark., 2011).

Bidens cernua L.

B. cernua var. *radiata*

(Davis, 2000)

B. tripartita L.

(Davis, 1982)

B. frondosa L.

(Coşkunçelebi ve ark., 2007)

B. bipinnata L.

(Korkmaz ve ark., 2011)

Bidens L. cinsinin sistematikteki yeri şu şekildedir:

Alem	: Plantae (Bitkiler)
Alt Alem	: Tracheobionta (Damarlı Bitkiler)
Üst Bölüm	: Spermatophyta (Tohumlu Bitkiler)
Bölüm	: Magnoliophyta (Çiçekli Bitkiler)
Sınıf	: Magnoliopsida (Dikotiledonlar)
Alt Sınıf	: Asteridae
Takım	: Asterales
Familiya	: Asteraceae
Cins	: <i>Bidens</i> L.

(USDA Plants Database)

1.4.1. Asteraceae Familyasının Özellikleri

Asteraceae (diğer adıyla Compositae familyası) üyeleri, dünyada çok geniş bir alana yayılmıştır ve Antartika dışında hemen hemen her bölgede yetişmektedir. Yeryüzünde Asteraceae familyası 23.000'den fazla türle temsil edilmektedir. Bu sayı Angiosperm'lerin % 10'una denktir. Asteraceae familyasının coğrafik orijinin bazı araştırmacılar Güney Amerika'nın Kuzeyi, bazıları da And Dağlarının Kuzeyi olduğunu düşünmektedirler. Bremer tarafından yapılan çalışmalarda, Asteraceae familyasının orijininin Güney Amerika ve Pasifik olduğu ileri sürülmüştür (Bremer ve Humphries, 1993; Kürşat ve Civelek, 2011).

Yurdumuzda 133 cins ve 1156'dan fazla türü bulunmaktadır. Bitkilerin çoğu otsu olmakla beraber, az sayıda çalı ve ağaç formunda olanlar vardır. Yapraklar alternan veya opozit dizilişli ya da hepsi

tabandadır. Çiçek durumu kapitulumdur; tabanında braktelerden meydana gelmiş bir involukrum bulunur. Çiçekler erdişi veya tek eşeyli, aktinomorf veya zigomorftur. Kapitulum dils (ligulat) ve tüpsü (tubulat) çiçeklerden oluşmaktadır. Bazı türler yalnızca dils ya da tüpsü çiçekleri taşıyabilmektedir. Çiçeklerde kaliks, papus (şemsiye biçiminde kıllar), halka veya pul biçimindedir bazen de körelmiştir. Korolla 5 petalli, simpetal, tüp biçiminde veya dil şeklinde uzamıştır. Stamenler 5 adet, birleşik anterli, serbest filamentlidir (singenezik). Ovaryum alt durumlu, iki karpelden meydana gelmiş tek ovüllüdür. Meyva tipi akendir, tepesinde bazen bir papus veya kaliks artığı bulunabilir. Familyada bulunan bitkilerin çoğu Compositae tipi salgı tüyü ve örtü tüyü taşır (Baytop, 1996; Tanker ve ark., 1998; Wikipedia, 2013).

Asteraceae familyası iki alt familyaya ayrılarak incelenir; Asteroideae (Tubuliflorae) ve Cichorioideae (Liguliflorae). Asteroideae alt familyasında kapitulumdaki çiçeklerin hepsi veya en azından ortadakiler tüp şeklinde, çevredekiler dilsidir. Çoğunlukla süt (lateks) borusu taşımazlar. Eczacılıkta kullanılan ve drog veren bitkilerin çoğu bu taksondadır. Cichorioideae alt familyasında kapitulumu oluşturan çiçeklerin hepsi ligulattır. Bitkiler süt borusu taşır ve ender olarak uçucu yağ içerirler (Tanker ve ark., 1998).

1.4.2. *Bidens* L. Cins Özellikleri

Hemen hemen tüysüz, dik tek (bazen çok) yıllık otsu bitkilerdir. Yapraklar opozit, dentat, basit veya pinnatisektir. Kapitulumdaki bütün çiçekler aynı eşeydedir (homogamus), kapitula diskoit (bazen heterogamus ve radiattır), korimbus- panikulattır. Involukrum çan şeklinde (kampanulat) veya hemisferik, involukrum brakteleri 2 sıra halindedir, dış kısımda bulunan brakteler yaprağımsı ve az çok

belirgin, iç kısımdakiler çok daha kısa ve zarımsıdır. Reseptakulum düz, palealıdır. Korolla sarı renktedir. Akenler önden arkaya yassı ya da zayıfça köşeli ve oblong şeklindedir. Papus 2 veya 4 adet kalıcı sert, geriye dönük ve kılsı aristalıdır (Davis, 1975).

1.4.2.1. *Bidens* L. Cinsinin Tayin Anahtarı

1. Yapraklar, basit-serrat; akenler 4 aristalı.....*B. cernua* L.
 - a) Kapitula diskoid.....var. *cernua*
 - b) Kapitula radiat.....var. *radiata* DC.
- 1.Yapraklar, loblu veya pinnat; akenler 2 veya 4 aristalı..*B. cernua* L.
2. Alt yapraklar en az 3-5 loblu*B. tripartita* L.
2. Tüm yapraklar pinnat
3. Yapraklar 1 pinnat akenler yassı, 2 aristalı*B. frondosa* L.
3. Yapraklar 2-3 pinnat akenler 4 köşeli, 4 aristalı..*B. bipinnata* L.

(Korkmaz ve ark., 2011)

1.4.2.2. *Bidens* Türlerinin Türkiye'deki Yayılışı:

Bidens cernua; A3 Bolu, Bolu Dağı 900m, B5 Kayseri, B10 Ağrı, Doğubeyazıt-Iğdır 1060m, C4 Konya/Antalya Geyikdağı 610m (Davis 1982).

B. cernua* var. *radiata; Bitlis (Adilcevaz) 1900m (Davis 2000).

A3 – Düzce, Efteni Gölü, göl kenarı, taban suyu bulunan alan,
30.07.2005,

N40°45'375" E31°03'95" (Aksoy, 2006)

B. tripartita; A1 Balıkesir Kuş Cenneti, A2(E) İstanbul Zekeriyaköy, A3 Sakarya Karasu, A4 Ankara Kızılcahamam, A6 Samsun 8km batı, A7 Trabzon Hamsiköy 1km kuzey 1200m, A8 Rize-Karadere 300m, A9 Çoruh, B4 Ankara Beynam Ormanı 1200m, B5 Kayseri, B6 Maraş, B8 Bitlis, Kırıkkale Akkuyu 1100m (Davis 1982).

C6 Gaziantep: Sof Dağı (Özuslu ve Tel, 2008).

Kırıkkale, Karagüney dağı, 1100 m, bozkır alanlar (Dönmez, 2002).

A3 – Düzce, Çiçekli, Şehirli Yayla, açık çayırılık alan, doğu bakı, 1530 m.,

03.08.2004, N40°37'750" E031°11'404" (Aksoy, 2006).

Afyon, Kumalar Dağı, Sincanlı, Akören köyü 1050 m, çayırılık alanlar (Akçiçek, 2003).

Ankara, Kıbrıs köyü vadisi, Akçadere mevki, dere kenarı gölgeli yerler, 1000 m, Kaş yaylası, Anamur-Ermenek anayolu 28. Km, Çam ormanlarının içi 750 m, (Yıldızıtugay ve Küçüköyük, 2010)

B. frondosa; A8 Rize İyidere merkez kavşak, A8 Artvin şehir merkezi yol kenarı, A7 Trabzon Kanuni kampüsü 50-100m (Coşkunçelebi ve ark., 2007).

B. bipinnata; A6 Samsun Terme-Gölyazı yol kenarlarında doğal korunmuş alanlarda 5m; Samsun Terme-Sakarlı köyü, yol kenarları ve fındık yetişen alanlarda 5 m (Korkmaz ve ark., 2011)

1.4.2.3. *Bidens* Türlerinin Etnofarmakognozik Özellikleri ve Tedavide Kullanılışı

Meksika'da *B. pilosa* L. bitkisinin tümü kullanılarak hazırlanan dekoksiyon diyabet tedavisinde kullanılmaktadır (Alarcon-Aguilara ve ark., 1998).

B. pilosa L. Kamerun'un güney bölgelerinde halk arasında çeşitli kalp rahatsızlıklarının tedavisinde ve Güney Amerika'da yüksek kan basıncının düşürülmesinde ampirik olarak kullanılmaktadır (Dimo ve ark., 1998).

B. pilosa var. *radiata* Schult. Bip halk tıbbında peptik ülseri de içeren mide hastalıklarının tedavisinde kullanılmaktadır (Alvarez ve ark., 1999).

Etnobotanik çalışmalar *B. pilosa*'nın Kamerun'da yara tedavisinde, Brezilya ve Venezuela'da kronik duodenal ülserde geleneksel olarak kullanıldığını göstermiştir (Tan ve ark., 2000).

B. pilosa L. Afrika geleneksel tıbbında yaygın olarak kullanılmaktadır. Güney Afrika Zulu'da antienflamatuvar özelliği nedeniyle yapraklar çiğnenerek kullanılmaktadır. Bitkinin tüm kısımları tedavide kullanılmaktadır. Çalışmalarda yaprakların, sarılık, düşük riski, konjuktivit, diş ağrısı, öksürük, bağırsak parazitleri ve ateş tedavisinde kullanıldığı bildirilmektedir. Çiçekli yaprakları ağrı tedavisinde, tüm bitki kırık ve havaledede, çiçekler ise diyare, dizanteri, hazımsızlık ve besin zehirlenmesinde kullanılmaktadır. Amazonlarda (Peru) şap hastalığı, anjina, diyabet,

dizanteri, dismenore, ödem, hepatit ve dropside (su toplanması) kullanılmaktadır. Kamerun'da bitkinin yüksek tansiyona bağlı problemlerde kullanıldığı bildirilmiştir (Dimo ve ark., 2001).

B. pilosa L. geleneksel tıpta diyabet kontrolünde, influenza ve gastroenterit tedavisinde kullanılmaktadır. Biyolojik çalışmalar *B. pilosa*'nın antihiperglisemik, antiülserojenik, immunosupresif, antienflamatuvar, vazodilatör, hipotansif, antimalaryal, antibakteriyel ve hepatoprotektif etkilerinin yanında antimikrobiyal, antiviral, immunostimulan, diüretik, antikanser, sedatif ve antitussif etkilerinin de olduğunu göstermiştir (Chang ve ark., 2001).

B. parviflora bitkisi geleneksel Çin tıbbında, antipiretik, antienflamatuvar ve antiromatizmal olarak kullanılmaktadır (Wang ve ark., 2003).

B. pilosa L. yapraklarından izole edilen bileşiklerin, antienflamatuvar, immunosupresif, antibakteriyel, antimalaryal, antihiperglisemik, etkilerinin olduğu görülmüştür (Chang ve ark., 2004).

B. pilosa L. dünyanın farklı bölgelerinde diyabete karşı halk ilacı olarak kullanılmıştır (Hsu ve ark., 2009).

Malarya parazitlerinin sentetik ilaçlara karşı direnç geliştirdiği Brezilya'da *Bidens* türleri yaygın olarak bulunmaktadır. *In vitro* çalışmalarda *Bidens pilosa*'nın kökleri ve toprak üstü kısımlarının *Plasmodium falciparum*'a karşı en güçlü ve umut verici bitki olduğu anlaşılmıştır (Connolly, P., 2009).

Bidens cernua L. Asteraceae familyasına ait tek yıllık bir bitki olup, Avrupa ve Asya ülkelerinde akarsu, göl ve bataklık kıyılarında yetişmektedir. Bitkinin toprak üstü kısımları halk arasında metabolik hastalıklar, zayıflık, cilt hastalıkları, sebore, psöriasis, yara, tümör tedavisinde, ayrıca diüretik ve sudorifik (terletici) olarak kullanılmaktadır (Rybalchenko ve ark., 2010).

Dünya Sağlık Örgütü'nün 2010 yılında *B. tripartita* L. (*Herba Bidentis*) ile ilgili monografında bitkinin antimalaryal, koleretik, antiülser ve fotoprotektif etkilerinden söz edilmektedir. (WHO Monographs, 2010).

Polonya halk tıbbında *B. tripartita*'dan antienflamatuvar ve immün sistemi uyarıcı etkileri nedeni ile yararlanılmaktadır. Ayrıca, cilt hastalıkları ve hasarlı kan damarlarının tedavisinde kullanılmaktadır (Tomczykova ve ark., 2011).

Afrika geleneksel tıbbında *B. pilosa* L. enflamasyon, diyare, dizanteri, kulak iltihabı, göz iltihabı, baş ağrısı, kas ağrısı, malarya ve böcek ısırıklarında kullanılmaktadır (Chauhan ve ark., 2011).

Jamaika'da yetişen bir tür olan *Bidens reptans* sürgünlerinden hazırlanan dekoksiyon menstrual rahatsızlıklarda kullanılmaktadır. Adet olamama durumunda 9 sabah çay şeklinde içilmektedir (Medicinal Plants of Jamaica).

1.5. *Bidens* Türlerinden İzole Edilen Kimyasal Bileşikler

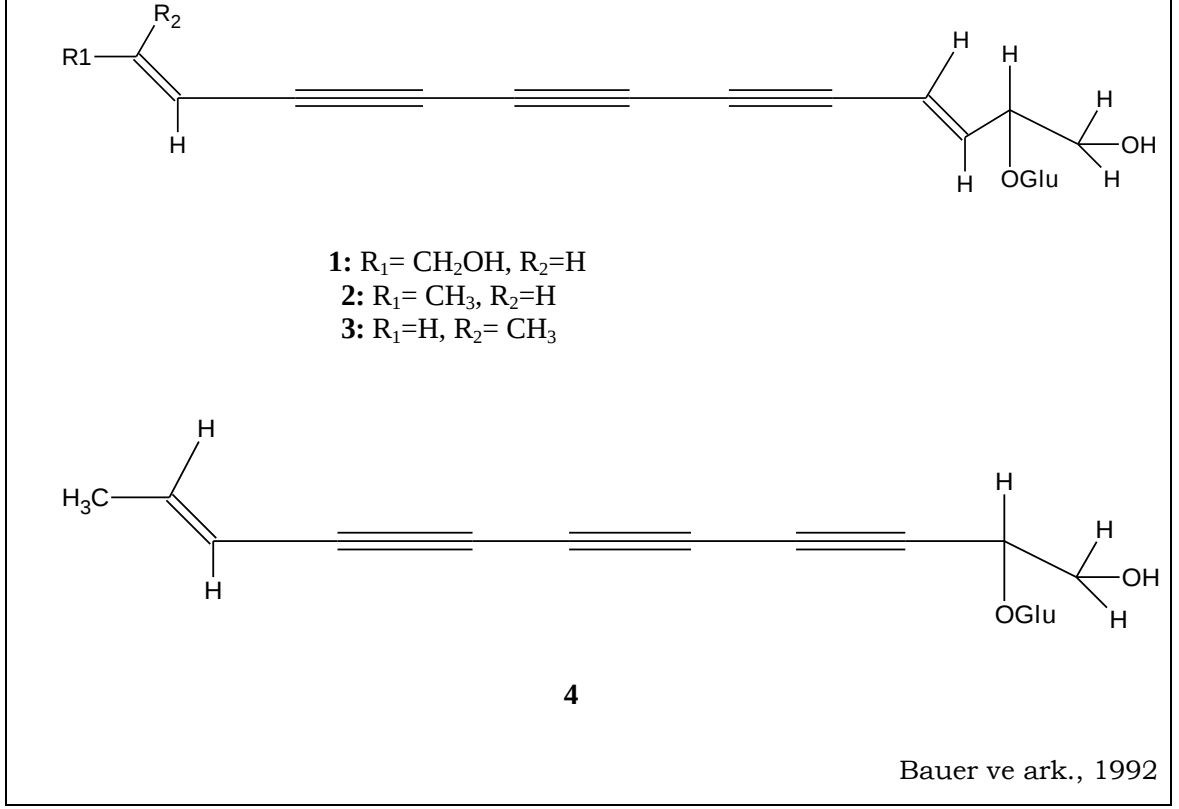
Bidens türlerinden flavonoit, sterol, terpenoit, fenilpropanoit, doymuş-doymamış-aromatik hidrokarbonlar ve poliasetilenik yapıda bileşikler izole edilmiştir. Bu bileşikler içinde flavonoit ve poliasetilenik bileşikler geniş yer kaplamakla birlikte kafein ve asetiltiyofen gibi azot ve kükürt içeren bileşikler, disakkaritler ve α -tokoferil kinon gibi çeşitli bileşikler izole edilmiştir. 2011 yılına kadar sadece *B. pilosa*'da yaklaşık 198 adet bileşik tespit edilmiştir (Silva ve ark., 2011).

1.5.1. Flavonoitler ve Poliasetilenik Bileşikler

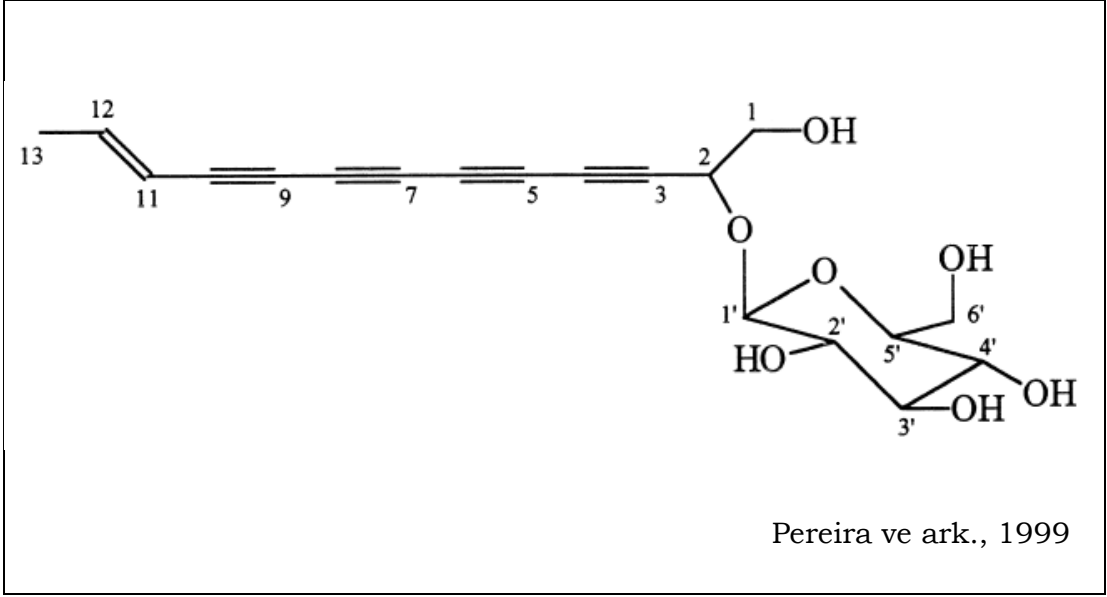
Pagani ve Romussi'nin 1971 yılında yayınladıkları bir çalışmada, *B. frondosa* L. çiçeklerinin sulu metanol ekstresinin poliamit kolonda etil asetat ve su ile fraksiyonlanması sonucu tridekatetrain-(4,6,8,10)-en-(2)-triol-(1,12,13) D-glukozit bileşiği izole edilmiştir. Bileşiğin yapısı IR, UV ve NMR ile tayin edilmiştir (Pagani ve Romussi, 1971).

1992 yılında yayınlanan bir çalışmada, *B. campylothea*'nın toprak üstü kısımları sırasıyla *n*-hekzan, kloroform ve metanol ile ekstre edilmiştir. Metanol ekstresi sefadeks LH-20 kolonda fraksiyonlanmış ve poliasetilen glukozit içeren fraksiyon toplanmıştır. Ters faz semi-preparatif HPLC ile 4 adet poliasetilenik glukozit, 2-*O*- β -D-glukoziltrideka-3*E*,11*E*-dien-5,7,9-trin-1,2,13-triol (1), 2-*O*- β -D-glukoziltrideka-3*E*,11*E*-dien-5,7,9-trin-1,2-diol (2), 2-*O*- β -D-glukoziltrideka-3*E*,11*Z*-dien-5,7,9-trin-1,2-diol (3) ve 2-*O*- β -D-glukoziltrideka-11*E*-en-3,5,7,9-tetrain-1,2-diol (4) izole edilmiştir.

Bileşiklerin yapıları UV, MS, ^1H -NMR, ^{13}C -NMR ve COSY-NMR ile tayin edilmiştir (Bauer ve ark., 1992).

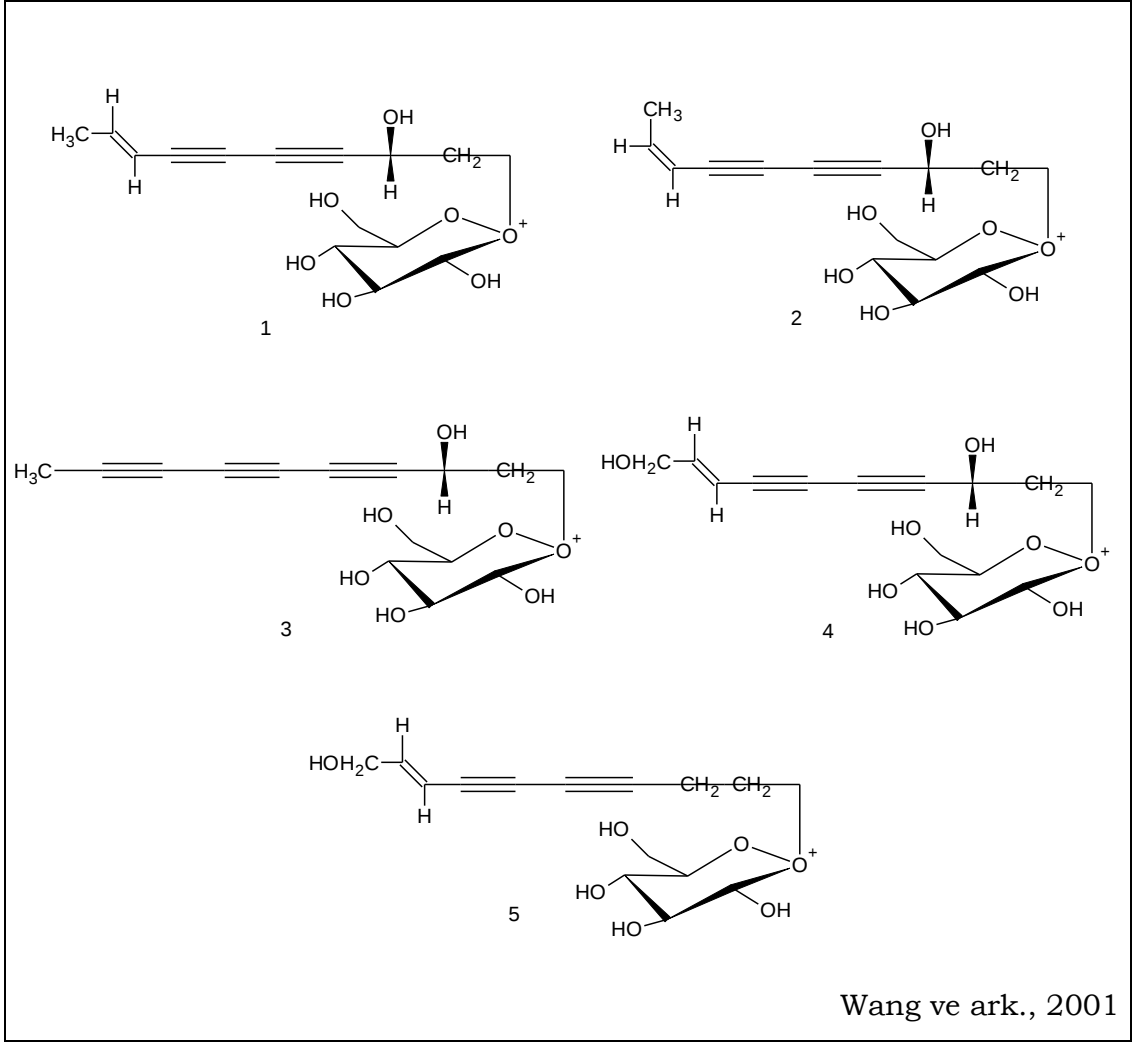


Pereira ve arkadaşlarının 1999 yılında yayınladığı bir çalışmada, *B. pilosa* L. bitkisinin yapraklarından hazırlanan metanol ekstresinden hareketle silika jel H kullanılan vakum sıvı kromatografisi ile *n*-hekzan, etil asetat ve metanol fraksiyonları elde edilmiştir. RP18 kolon kromatografisi, izokratik preparatif HPLC gibi yöntemlerle poliasetilenik yapıda 2- O - β -D-glukoziltrideka-11 *E*-en-3,5,7,9-tetrain-1,2-diol bileşiği izole edilmiştir (Pereira ve ark., 1999).



Ortega ve arkadaşlarının bir çalışmasında *B. subalternans*'ın metanollü ekstresinden maslinik asit, oleanolik asit, stigmasterol, stigmasterol-3-O- β -D-glukozit ve *B. aurea*'nın metanollü ekstresinden 2'-hidroksi-4,4'-dimetoksikalkon elde edilmiştir (Ortega ve ark., 2000).

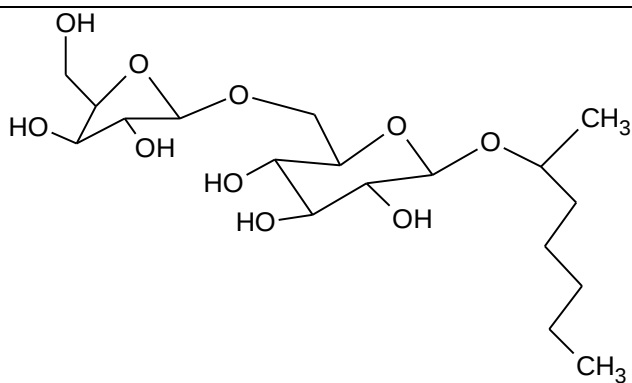
Bir diğer çalışmada, *B. parviflora*'nın tüm kısımlarının %60'lık etanollü ekstresi hekzan, etil asetat, *n*-butanol ve su fraksiyonlarına ayrılmış, *n*-butanol fraksiyonundan hareketle Sefadeks LH-20 kolon kromatografisi, silika jel kolon kromatografisi ve preparatif HPLC gibi yöntemlerle poliasetilenik glukozit yapıda bileşikler olan bidensineozit A₁, A₂, B, C (1-4) ve 3-deksibidensineozit B (5) bileşikleri izole edilmiş ve kimyasal yapıları 3(*R*), 8(*E*)-8-deken-4,6-din-1,3-diol 1-O- β -D-glukopiranozit (1), deka-3(*R*), 8(*Z*)-8-deken-4,6-din-1,3-diol 1-O- β -D-glukopiranozit (2), 3(*R*)-deka-4,6,8-trin-1,3-diol 1-O- β -D-glukopiranozit (3), 3(*R*), 8(*E*)-8-deken-4,6-din-1,3,10-triol 1-O- β -D-glukopiranozit (4), 8(*E*)-8-deken-4,6-din-1,10-diol 1-O- β -D-glukopiranozit (5) olarak ¹H-NMR, ¹³C-NMR, UV, EI-MS gibi spektrofotometrik yöntemlerle tayin edilmiştir (Wang ve ark., 2001).



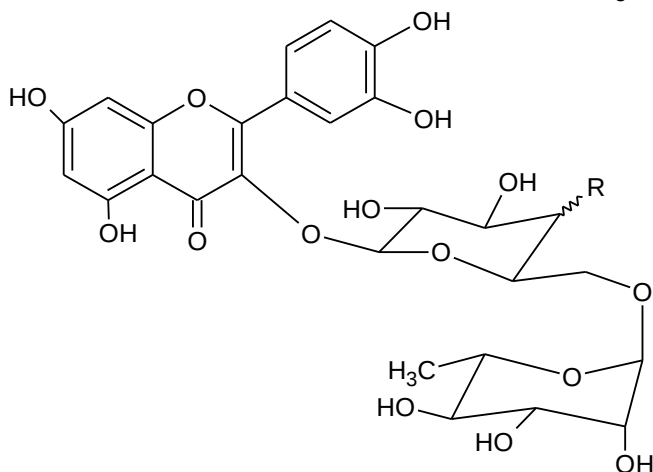
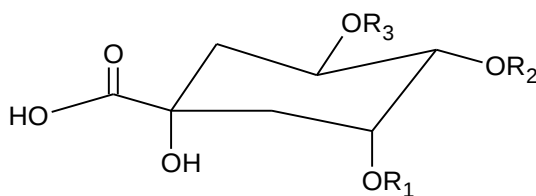
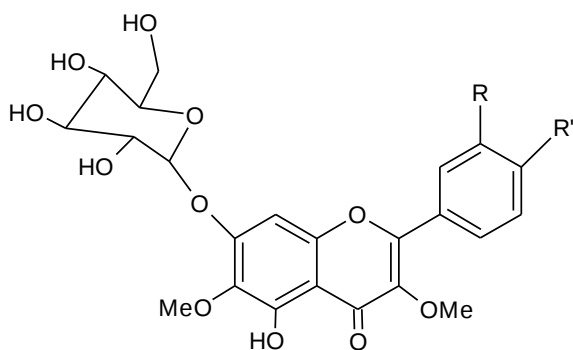
Chang ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada *B. pilosa* var. *radiata* türüne ait bitkinin tamamı kaynar su ile 2 saat ekstre edildikten sonra *n*-butanol ile partitasyon yapılmıştır. İki poliasetilenik bileşik, 2-β-D-glukopiranoziloksi-1-hidroksi-5(*E*) –trideken-7,9,11-trin (1) ve 3-β-D-glukopiranoziloksi-1-hidroksi-6(*E*)- tetradeken-8,10,12-tirin (2) izole edilmiştir. Ayrıca butanol fraksiyonunun majör bileşikler 4,5-di-*O*-kafeoilkinik asit (3), 3,5-di-*O*-kafeoilkinik asit (4) ve 3,4-di-*O*-kafeoilkinik asitin (5) yapıları NMR ve MS yardımıyla aydınlatılmıştır. ¹H-NMR ve HPLC ile 1 ve 2 numaralı bileşiklerin safsızlıklarının sırasıyla % 95 ve >% 80 olduğu tespit edilmiştir (Chang ve ark.,2004).

2004 yılında yayınlanan bir çalışmada Tayvan'dan toplanmış *B. pilosa* var. *radiata* taze tüm bitki % 70'lik etanol ile 7 gün boyunca oda sıcaklığında ekstre edilmiştir. Elde edilen kuru ekstre su ile süspande edildikten sonra etil asetat, *n*-butanol ve su ile fraksiyonlarına ayrılmıştır. Etil asetat fraksiyonundan hareketle silika jel kolon kromatografisi ve semi-preparatif HPLC gibi yöntemlerle poliasetilen yapıda 1,2-dihidroksitrideka-5,7,9,11-tetrain ve 1,3-dihidroksi-6 (*E*)-tetradeken-8,10,12-trin bileşikleri izole edilmiştir. Bileşiklerin yapıları ^1H -NMR, ^{13}C -NMR, EIMS ve IR gibi spektroskopik yöntemler ile aydınlatılmıştır (Wu ve ark., 2004).

Tayvan'dan toplanan *B. pilosa* bitkisinin taze tüm kısımları kullanılarak % 70'lik etanol ekstresi ve ekstreden hareketle *n*-butanol, etil asetat ve su fraksiyonları hazırlanmıştır. NMR, HPLC, LC-MS gibi spektroskopik ve kromatografik yöntemlerle yeni bir bileşik olan, heptanil 2-*O*- β -ksilofuranozil- (1 $\rightarrow$ 6)- β -glukopiranozit (1) ve fenolik yapıda 8 bileşik; 3-*O*-rabinobiozit (2), kersetin 3-*O*-rutinozit (3), klorojenik asit (4), 3,4-di-*O*-kafeoilkinik asit (5), 3,5-di-*O*-kafeoilkinik asit (6), 4,5-di-*O*-kafeoilkinik asit (7), jasein (8), sentaurein (9) izole edilmiştir (Chiang ve ark., 2004).



1

2: R= β -OH, 3: R= α -OH4: R₁=R₂=H, R₃=kafeoil5: R₁=R₂=kafeoil, R₃=H6: R₁=R₃=kafeoil, R₂=H7: R₁=H, R₂=R₃=kafeoil

8: R=OMe, R'=OH

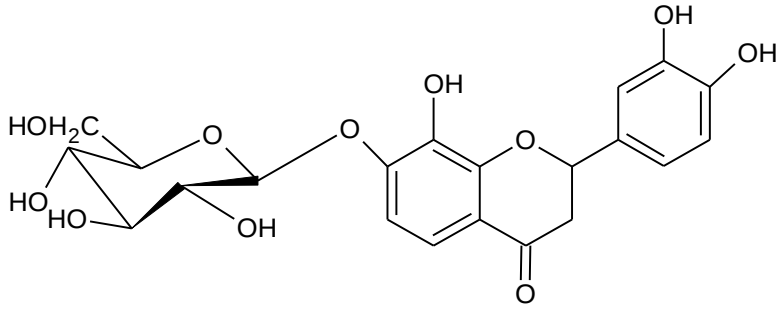
9: R=OH, R'=OMe

2007 yılında yayınlanan bir çalışmada Tayvan'da toplanan taze *B. pilosa* bitkisinin tamamının kaynar su ekstresinden hareketle elde edilen butanol alt fraksiyonu RP-18 silikajel kolona uygulanmıştır. Kolondan değişen miktarlarda MeOH/Su geçirilerek flavonoit yapısındaki sentaurein ve onun aglikonu olan sentaureidin izole edilmiştir (Chang ve ark., 2007).

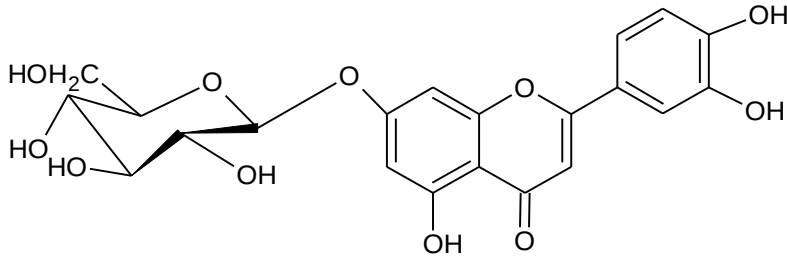
Wang ve arkadaşlarının 2007 yılında yayınladığı bir çalışmada, *B. parviflora*'nın tamamı % 60'lık etanol ile geri çeviren soğutucu altında ekstre edilmiştir. Hekzan, etilasetat ve *n*-butanol ile fraksiyonlarına ayrılmıştır. Hekzan ve *n*-butanol fazlarından silika jel kolon kromatografisi, sefadeks LH-20 kolon kromatografisi ve HPLC gibi yöntemlerle 5 kalkon, 2 flavanon ve 2 auron yapısında bileşik izole edilmiştir. İzole edilen bileşikler 2'-hidroksi-3,4,4'-trimetoksi kalkon (1), 4,2',4',6'-tetrametoksi dihidrokalkon (2), 3,4,2',4',6'-pentametoksi dihidrokalkon (3), 7,3',4'-trihidroksi flavanon (4), 3',4'-dihidroksi flavanon 7-*O*- β -*D*-glukozit (5), 3,4,2'-trihidroksi kalkon 4'-*O*- β -*D*-glukozit (6), 3-metoksi-4,2',3-trihidroksi kalkon 4'-*O*- β -*D*-glukozit (7), sulfuretin 6-*O*- β -*D*-glukozit (8) ve maritimetin 7-*O*- β -*D*-glukozit (9) dir. 1-7 numaralı bileşikler *B. parviflora*'dan ilk kez izole edilmiştir. 3 numaralı bileşik yeni bir dihidrokalkondur. 1 ve 2 numaralı bileşikler ise doğal kaynaklardan ilk kez izole edilmiştir (Wang ve ark., 2007).

Wolniak ve arkadaşlarının bir çalışmasında, *B. tripartita* L.'nin bazı flavonoit bileşiklerinin bitkideki konsantrasyonu, herba ve çiçeklerden hazırlanan ekstreten hareketle UV ve HPLC analizleri ile belirlenmiştir. Buna göre çiçeklerde, % 0,229 oranında izookanin-7-*O*-glukozit (flavanomarein), % 0,116 luteolin 7-*O*-glukozit (sinarozit) ve % 0,047 luteolin, herbada ise % 0,157 flavanomarein, % 0,179 sinarozit, % 0,031 luteolin bulunduğu tespit edilmiştir. Çiçeklerde

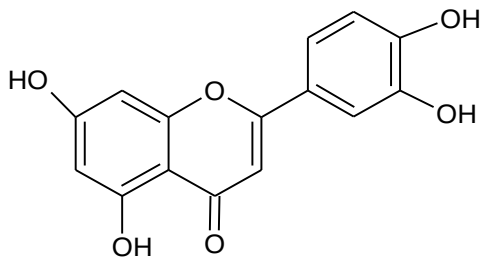
bulunan flavonoit miktarının herbada bulunan miktarın yarısı olduğu, flavanomorein miktarının çiçeklerde, sinarozit miktarının ise bitkinin yeşil kısımlarında fazla olduğu anlaşılmıştır (Wolniak ve ark., 2007).



Flavanomarein (izookanin-7-o-glukozit)



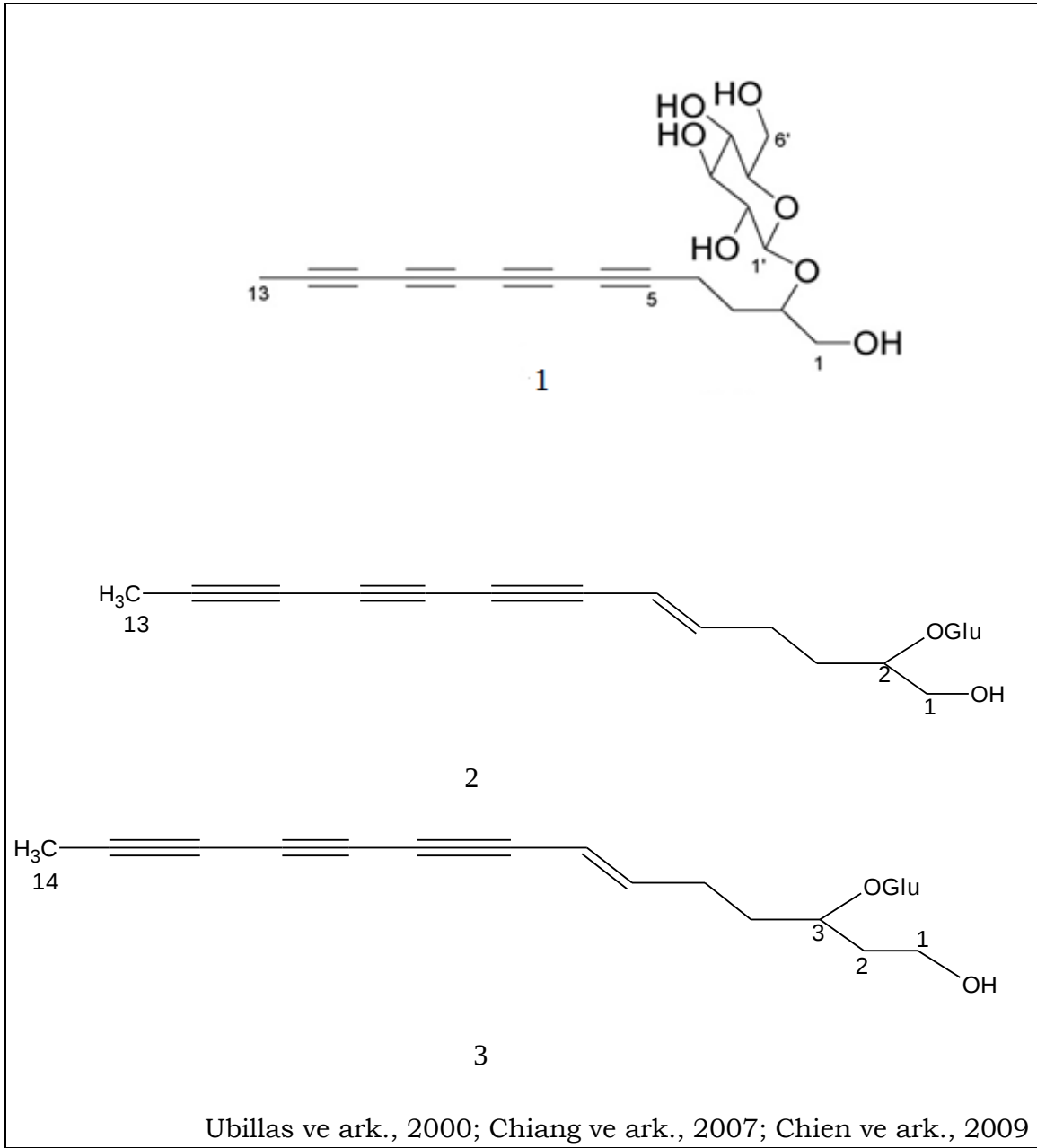
Sinarozit (luteolin-7-o-glukozit)



Luteolin

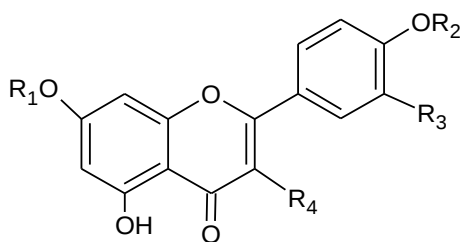
Wolniak ve ark., 2007

Tayvan'da toplanan *B. pilosa* var. *radiata* bitkisinin yapraklarından 3 adet poliasetlenik glukozit yapısında bileşik elde edilmiştir. Bitki toz haline getirildikten sonra metanol ile oda sıcaklığında 48 saat süreyle iki kez ekstre edilerek vakum altında yoğunlaştırılmıştır. Daha sonra Chiang ve arkadaşlarının (2007) çalışmalarındaki gibi ekstre su ile süspande edilerek etil asetat ile partitasyonu yapılmıştır. Elde edilen etil asetat fazı silika jel kolona uygulanmış ve kolondan diklorometan:metanol karışımı artan polaritede geçirilmiştir. Elde edilen 8 fraksiyondan 6 numaralı fraksiyon (% 10 MeOH:CH₂Cl₂) preparatif HPLC kullanılarak sitopiloin olarak adlandırılan 2-β-D-glukopiranoziloksioksi-1-hidroksi-trideka-5,7,9,11-tetrain (1) izole edilmiştir. Yine aynı ekstreden Ubillas ve arkadaşlarının (2000) verdikleri yöntemle dayanarak diğer iki bileşik; 2-β-D-glukopiranoziloksioksi-1-hidroksi-5(*E*)-trideken-7,9,11-trin (2) ve 3-β-D-glukopiranoziloksioksi-1-hidroksi-6(*E*)-tetradeken-8,10,12-trin (3) izole edilmiştir. (Ubillas ve ark., 2000; Chiang ve ark., 2007; Chien ve ark., 2009).

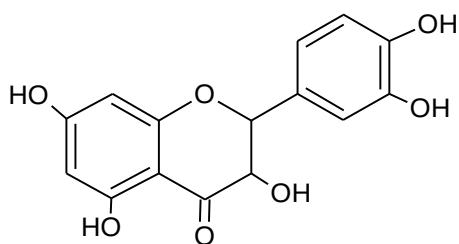


B. parviflora'nın kimyasal içeriğinin araştırıldığı bir çalışmada kurutulmuş toz edilmiş tüm bitki % 60'lık etanol ile geri çeviren soğutucu altında ekstre edilmiştir. Elde edilen ekstre suda çözülerek D101 reçine kolonda su, % 30, % 50 ve % 95 EtOH ile elüe edilmiştir. Elde edilen fraksiyonlardan hareketle silika jel kolon kromatografisi, preparatif HPLC ve Sefadeks LH 20 kolon kromatografisi gibi çeşitli kromatografik teknikler kullanılarak flavonoit yapısında 15 bileşik;

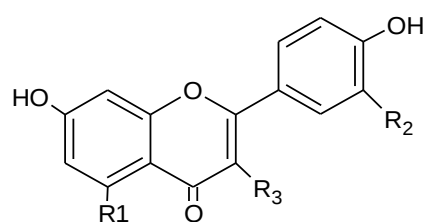
akasetin 7-O-(α -D-apio-furanosil) (*1—6*)- β -D-glukozit (1), luteolin 7-O- β -D-neohesperozit (2), kersetin 3-O- β -D-rutinozit (3), luteolin 7-O- β -D-glukozit (4), akasetin 7-O- β -D-glukozit (5), kersitrin (6), 4-Metoksi-3,2',3'-trihidroksikalkon 4'-O- β -D-glukozit (7), kersetin 3-O- β -D-glukozit (9), Taksifolin (10), 2'-Hidroksi-3,4,4',6'-tetrametoksikalkon (11), kemferol (12), luteolin (13), kersetin (14), sulfuretin (15), 3,4,2',4'-tetrahidroksikalkon (16) ve poliasetilen yapısında bir adet yeni bileşik; 8-(*E*)-deken-4,6-din-1,3,10-triol (8) izole edilmiştir (Li ve ark., 2008).



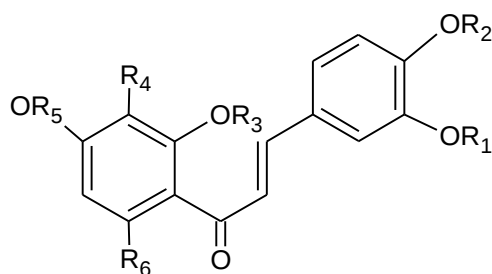
- 1: $R_1 = \alpha\text{-D-apiofuranosil}(1\text{---}6)\text{-}\beta\text{-D-glukoz}$
 $R_2 = \text{CH}_3$, $R_3 = R_4 = \text{H}$
 2: $R_1 = \beta\text{-D-neohesperidoz}$, $R_2 = R_4 = \text{H}$, $R_3 = \text{OH}$
 3: $R_1 = R_2 = \text{H}$, $R_3 = \text{OH}$, $R_4 = \text{O-}\beta\text{-D-rutinoz}$
 4: $R_1 = \beta\text{-D-glukoz}$, $R_2 = R_4 = \text{H}$, $R_3 = \text{OH}$
 5: $R_1 = \beta\text{-D-glukoz}$, $R_2 = \text{CH}_3$, $R_3 = R_4 = \text{H}$
 6: $R_1 = R_2 = \text{H}$, $R_3 = \text{OH}$, $R_4 = \text{O-}\alpha\text{-L-ramnoz}$
 9: $R_1 = R_2 = \text{H}$, $R_3 = \text{OH}$, $R_4 = \text{O-}\beta\text{-D-glukoz}$



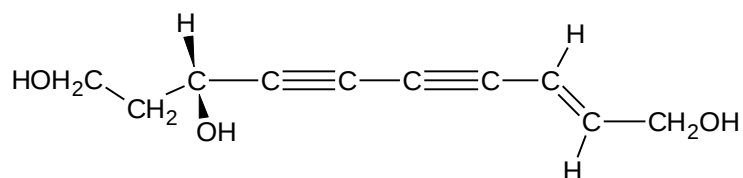
10



- 12: $R_1 = R_3 = \text{OH}$, $R_2 = \text{H}$
 14: $R_1 = R_2 = R_3 = \text{OH}$

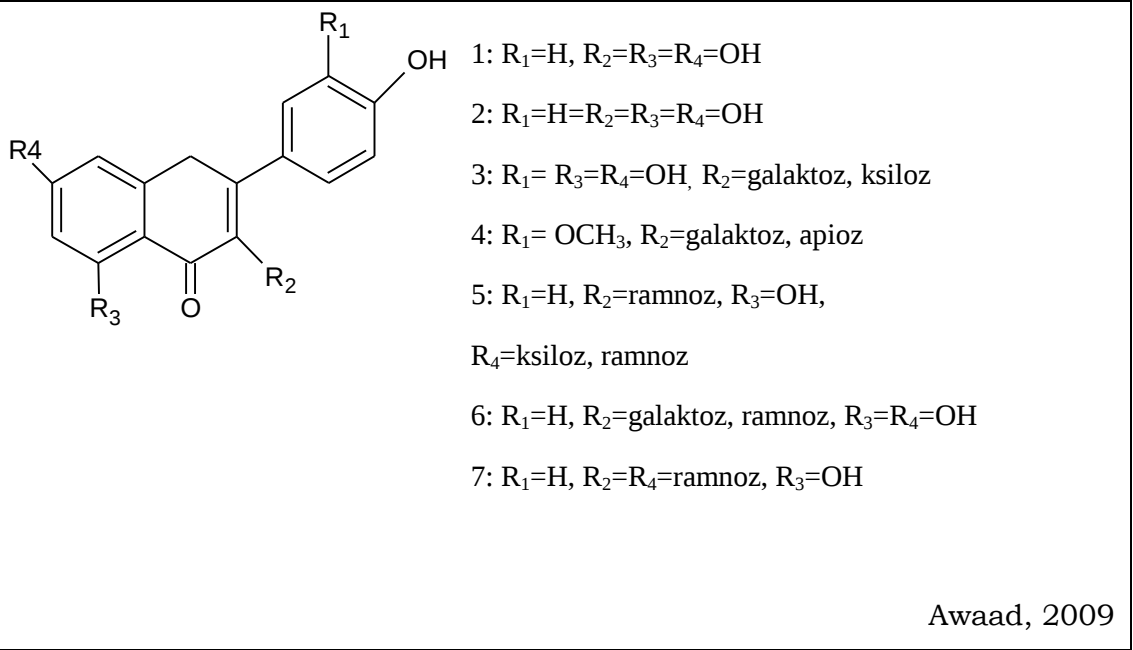


- 7: $R_1 = R_3 = R_6 = \text{H}$, $R_2 = \text{CH}_3$, $R_4 = \text{OH}$, $R_5 = \beta\text{-D-glukoz}$
 11: $R_1 = R_2 = R_5 = \text{CH}_3$, $R_3 = R_4 = \text{H}$, $R_6 = \text{OCH}_3$
 16: $R_1 = R_2 = R_3 = R_4 = R_5 = R_6 = \text{H}$



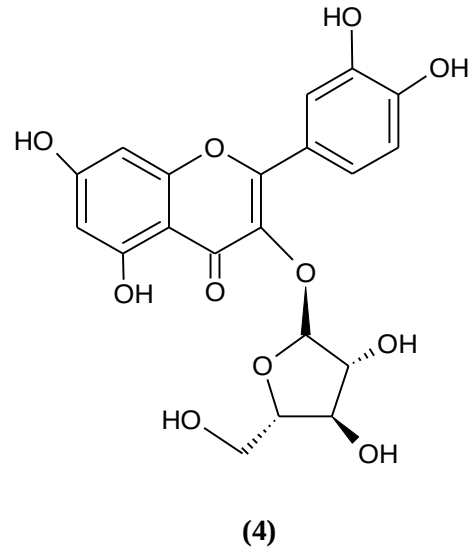
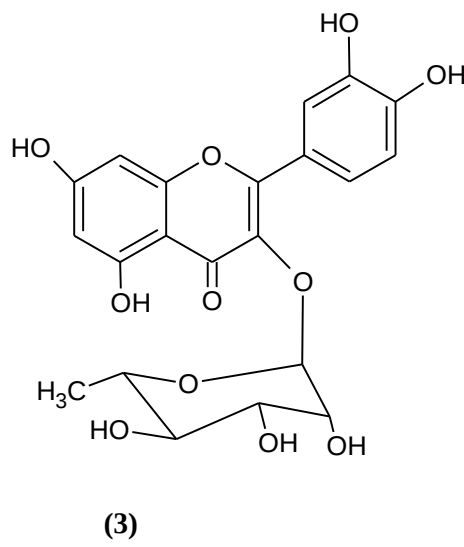
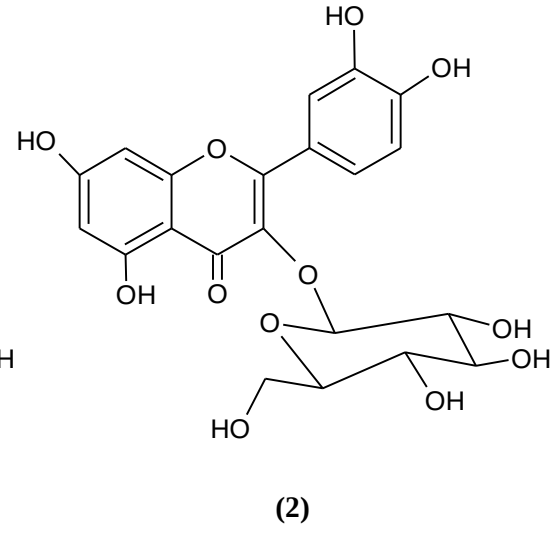
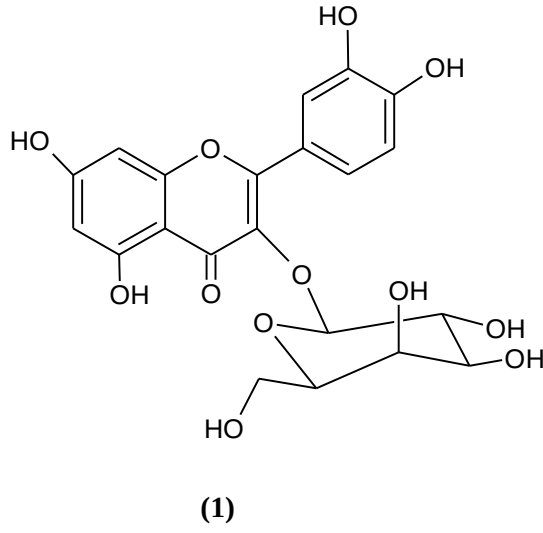
8

Awaad'ın 2009 yılında yayınladığı bir çalışmada, *B. bipinnata* bitkisinin toprak üstü kısımlarından % 90'lık etanol ile hazırlanan ekstresinden hareketle 7 adet flavonoit yapısında bileşik izole edilmiştir. Bu bileşikler; kemferol (1), kersetin (2), kersetin 3-O- β -D-galaktopiranozito-(6-1)-O- β -D-ksilopiranozit (3), izoramnetin 3-O- β -D-apio-D-furanozil (1-2)- β -D-galaktopiranozit (4), kemferol-3-O- α -L-ramnozit-7-O- β -D-ksilozit (1-2)-O- α -L-ramnozit (5), kemferol-3-galaktoramnozit (6) ve kemferol 3,7-O-diramnozit (7) dir (Awaad, 2009).



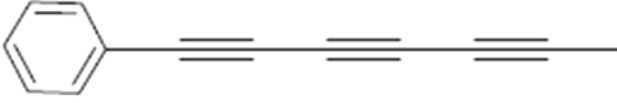
2009 yılında yapılan bir çalışmada, Brezilya, Mato Grosso do Sul'den toplanan *B. sulphurea* bitkisinin kurutulup toz edilmiş toprak üstü kısımları oda sıcaklığında etanol ile ekstre edilmiştir. Ekstreden daha sonra sıvı-sıvı partitasyonla hekzan, diklorometan, etil asetat ve metanol fraksiyonları hazırlanmıştır. Etil asetat fraksiyonunda DOSY NMR (Diffusion-ordered spectroscopy) ile HPLC, kütle spektrometresi, ve diğer NMR teknikleri kullanılarak flavonoit glukozitleri: kersetin-3-O- β -D-galaktopiranozit (1), kersetin-3-O- β -D-glukopiranozit (2),

kersetin-3-O- α -D-ranopiranozit (3) ve kersetin-3-O- α -L-arabinofurasit (4) bileşiklerinin varlığı tespit edilmiştir (Rodrigues ve ark., 2009).



Rodrigues ve ark., 2009

2009 yılında yapılan bir çalışmada Hindistan'da yetişen *B. pilosa* bitkisinin yapraklarının hekzan, kloroform, etil asetat ve metanol ekstreleri Soxhlet cihazında hazırlanmıştır. Hekzan ekstresi silika jel kolona uygulanmış, hekzan ve hekzan-kloroform karışımı ile elüe edilmiştir. Hekzan-kloroform oranı 50:50 olan 4-6 numaralı fraksiyondan renksiz bir bileşik olan 1,1-fenil-1,3,5-heptatrin izole edilmiştir (Kumari ve ark., 2009).

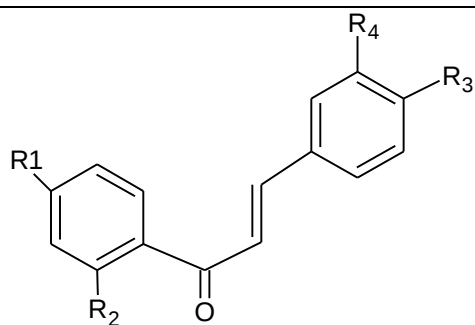


1,1- Fenil-1,3,5-heptatrin (PHT)

B. cernua L. üzerindeki fitokimyasal çalışmalar bitkinin aromatik hidrokarbon yapısındaki 1-fenilhepta-1,3,5-trin (PHT), seskiterpenler (humulen-1,2-epoksit, α -selinen, sernuol), flavonoidler (kersetin, izokersetin, butein, sulfuretin, maritimetin), butin, izookanin, luteolin, butein glukopiranozitleri ve bunların türevlerini içerdiğini göstermiştir (Rybalchenko ve ark., 2010).

2010 yılında yapılan bir çalışmada Rusya ve Finlandiya'dan toplanan *B. tripartita* bitkilerinde flavonoid, kumarin, tanen, polisakkarit, aminoasit ve toplam fenol miktar tayini yapılmıştır. Ayrıca HPLC ile bitkilerde bulunan kateşin, klorojenik asit, askorbik asit, kafeik asit, luteolin-7-O-glukozit, kikorik asit, rosmarinik asit ve luteolinin miktarları karşılaştırılmıştır. Finlandiya'dan toplanan bitki örneklerinin flavonoid, tanen, polisakkaritler ve askorbik asit yönünden zengin olduğu; Rusya'dan toplanan örneklerin ise kumarin ve aminoasitler yönünden daha zengin olduğu görülmüştür (Pozharitskaya ve ark., 2010).

B. pilosa'nın kimyasal içeriğinin araştırıldığı bir çalışmada kurutulmuş ve toz edilmiş tüm bitkiden hazırlanan % 95'lik etanol ekstresi suda çözülerek sıvı-sıvı ekstraksiyonu ile petrol eteri, etil asetat ve *n*-butanol fraksiyonları elde edilmiştir. Etil asetat fraksiyonundan hareketle, silika jel kolon kromatografisi, semi-preparatif HPLC ve sefadeks LH-20 kolon kromatografisi kullanılarak 13 adet flavonoit yapısında bileşik izole edilmiştir. İzole edilen bileşikler, 2'-hidroksi-4,4'-dimetoksi-kalkon (1), izolikiritgenin (2), 3,2',4'-trihidroksi-4-metoksi-kalkon (3), likokalkon A (4), 4'-O- β -D-glukopiranozil-2',3-dihidroksi-4-metoksi-kalkon (5), butein (6), apigenin (7), luteolin (8), diosmetin (9), krisoeriol (10), 3,5,6,7,3',4',5'-heptametoksi flavon (11), 7-O- β -D-glukopiranozil-5,3'-dihidroksi-3,6,4'-trimetoksiflavon (12) ve sulfuretin (13) dir. Bu bileşiklerden 1-5, 9 ve 11 numaralı bileşikler *Bidens* cinsinden ilk defa elde edilmiştir (Tian ve ark., 2011).

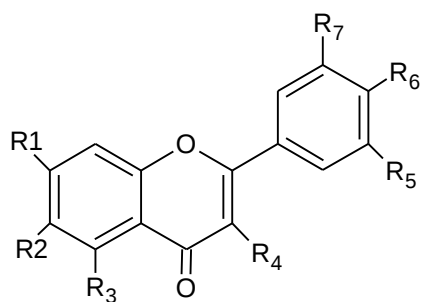


1: $R_1=R_3=\text{OCH}_3$, $R_2=\text{OH}$, $R_4=\text{H}$

2: $R_1=R_2=R_3=\text{OH}$, $R_4=\text{H}$

3: $R_1=R_2=R_4=\text{OH}$, $R_3=\text{OCH}_3$

5: $R_1=\text{O-Glukoz}$, $R_2=R_4=\text{OH}$, $R_3=\text{OCH}_3$



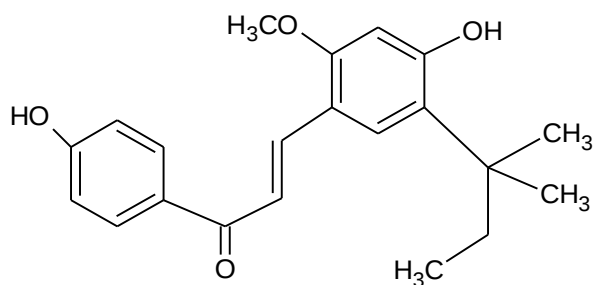
7: $R_1=R_3=R_6=\text{OH}$, $R_2=R_5=R_7=\text{H}$

8: $R_1=R_6=\text{OH}$, $R_2=R_3=R_4=R_5=R_7=\text{OH}$

10: $R_1=R_3=R_6=\text{OH}$, $R_2=R_4=R_7=\text{H}$, $R_5=\text{OCH}_3$

11: $R_1=R_2=R_3=R_4=R_5=R_6=R_7=\text{OCH}_3$

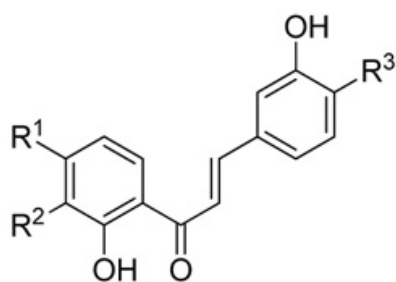
12: $R_1=\text{O-Glukoz}$, $R_2=R_4=R_6=\text{OCH}_3$, $R_3=R_5=\text{OH}$, $R_7=\text{H}$



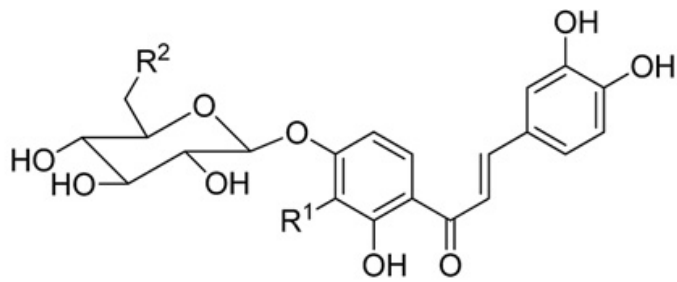
(4)

Tian ve ark., 2011

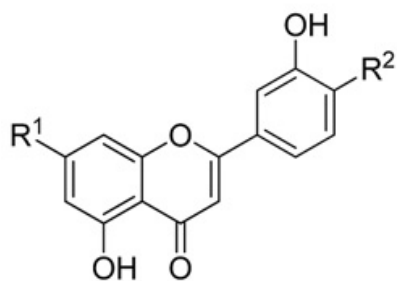
Lv ve Zhang'ın 2013 yılında yayınladığı bir çalışmada *B. tripartita*'nın % 90'lık etanol ekstresi su ile süspande edilerek partitasyonla petrol eteri (PE), etil asetat (EtOAc) ve *n*-butanol (*n*-BuOH) alt ekstreleri elde edilmiştir. EtOAc ekstresi silika jel kolona uygulanarak PE-EtOAc çözücülerini ile gradient elüsyonla 8 adet (A-H) fraksiyon elde edilmiştir. Elde edilen fraksiyonlardan 4 tanesi (C, D, E ve F) silika jel ve sefadeks LH-20 kolonlarıyla saflaştırılarak, 14 adet (1-14) flavonoid yapısında ve 2 adet (15-16) poliasetilenik yapıda olmak üzere 16 adet bileşik izole edilmiştir. Bileşiklerin yapıları IR, MS ve NMR gibi spektroskopik yöntemlerle aydınlatılmıştır. İzole edilen bileşikler bütein (1), 3,2',4'-trihidroksi-4-metoksikalkon (2), 4'-O- β -D-glukopiranozil-2',3-dihidroksi-4-metoksikalkon (3), okanin (4), okanin 4'-O- β -D-glukopiranozit (5), okanin 4'-O-(6''-O-asetil- β -D-glukopiranozit (6), bidenozit (7), luteolin (8), diosmetin (9), luteozit (10), aksillarin (11), kersetagetin 3,6,3'-trimetil eter (12), sulfuretin (13), 6,7,3',4'-tetrahidroksiauron (14), 4'-O- β -D-glukopiraziloksi-1-hidroksitrideka-3,5,9,11-pentain(15) ve (*R*),8(*E*)-8-deken-4,6-din-3,10-dihidroksi-1-O- β -D-glukopiranozit (16) dir Bileşiklerden aksillarin (11) *Bidens* cinsinden ilk defa izole edilmiştir (Lv ve Zhang, 2013).



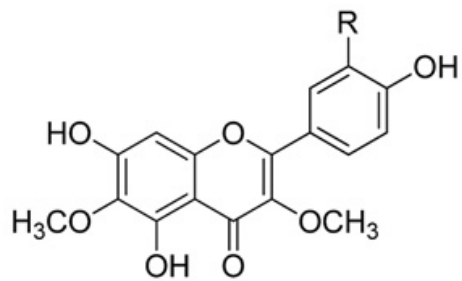
- 1** $R^1 = R^3 = \text{OH}, R^2 = \text{H}$
2 $R^1 = \text{OH}, R^2 = \text{H}, R^3 = \text{OCH}_3$
3 $R^1 = \text{Oglu}, R^2 = \text{H}, R^3 = \text{OCH}_3$
4 $R^1 = R^2 = R^3 = \text{OH}$



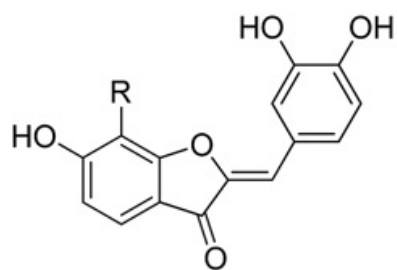
- 5** $R^1 = R^2 = \text{OH}$
6 $R^1 = \text{OH}, R^2 = \text{OAc}$
7 $R^1 = \text{H}, R^2 = \text{OAc}$



- 8** $R^1 = R^2 = \text{OH}$
9 $R^1 = \text{OH}, R^2 = \text{OCH}_3$
10 $R^1 = \text{Oglu}, R^2 = \text{OH}$



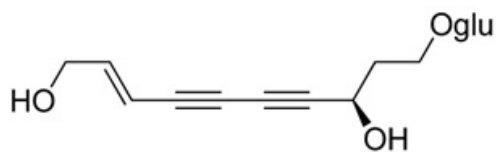
- 11** $R = \text{OH}$
12 $R = \text{OCH}_3$



- 13** $R = \text{H}$
14 $R = \text{OH}$



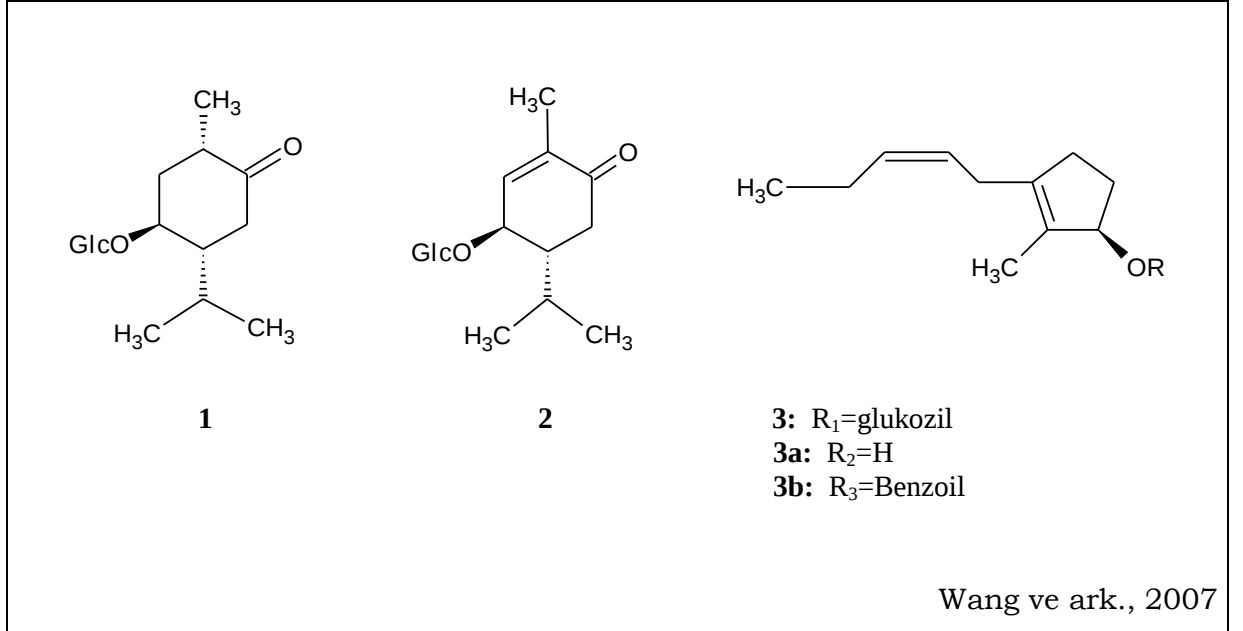
15



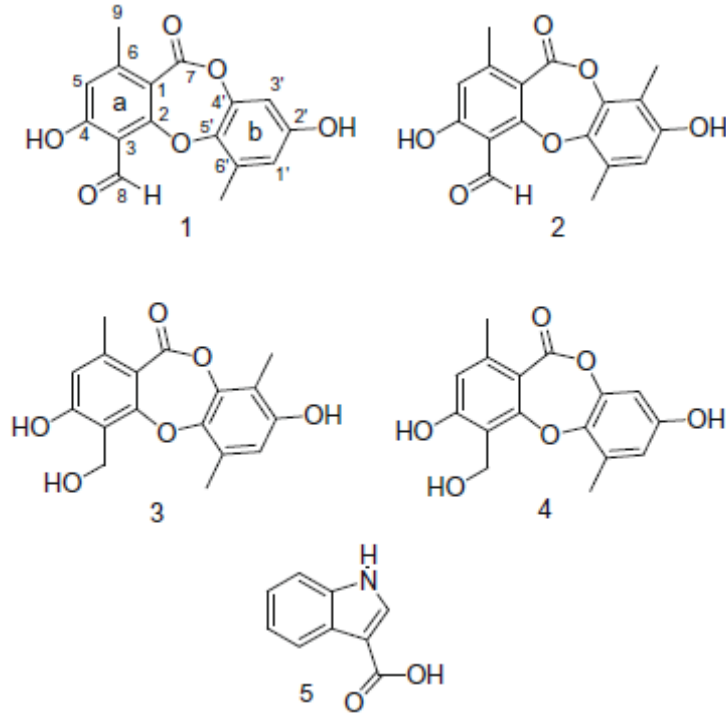
16

1.5.2. Terpen Glukozitleri, Jasmolon Glukozitleri, Depsidonlar

Wang ve arkadaşlarının 2007 yılında yayınladığı bir çalışmada, *B. parvilora* Willd. Temmuz ayında toplanarak tüm bitki % 60'lık etanol ile geri çeviren soğutucu altında ekstre edilmiş ve daha sonra hekzan, etil asetat ve *n*-butanol fraksiyonları hazırlanmıştır. *n*-Butanol fazı silika jel ve sefadeks LH-20 kolona uygulandıktan sonra HPLC ile temizlenmiştir. Sonuçta bidensmentozit A [(1*S*,3*S*,4*R*)-3-hidroksi-*p*-ment-6-on 3-*O*-β-*D*-glukopiranozit] (1), bidensmentozit B [(3*R*, 4*R*)-3-hidroksi-*p*-ment-1(2)-en-6-on 3-*O*-β-*D*-glukopiranozit] (2) ve (+) - jasmolon glukoziti yapısında olan yeni bir bileşik olan (4*R*)-hidroksi-3-metil-2-(2 *Z*-pentenil)-siklopent-2-enon 4-*O*-β-*D*-glukopiranozit (3) elde edilmiştir (Wang ve ark., 2007).



2010 yılında Kahire'den toplanan *B. pilosa* bitkisinin toprak üstü kısımlarında izole edilen *Botryorhodies rhodina* endofitik mantarının etil asetat ekstresi lipofilik bileşiklerden kurtarılarak sefadeks LH-20, ters faz preparatif HPLC gibi yöntemler kullanılarak depsidon yapısındaki botriorhodin A (1), B (2), C (3), D (4) bileşikleri ve indol- β -karboksilik asit (5) izole edilmiştir (Abdou ve ark., 2010).

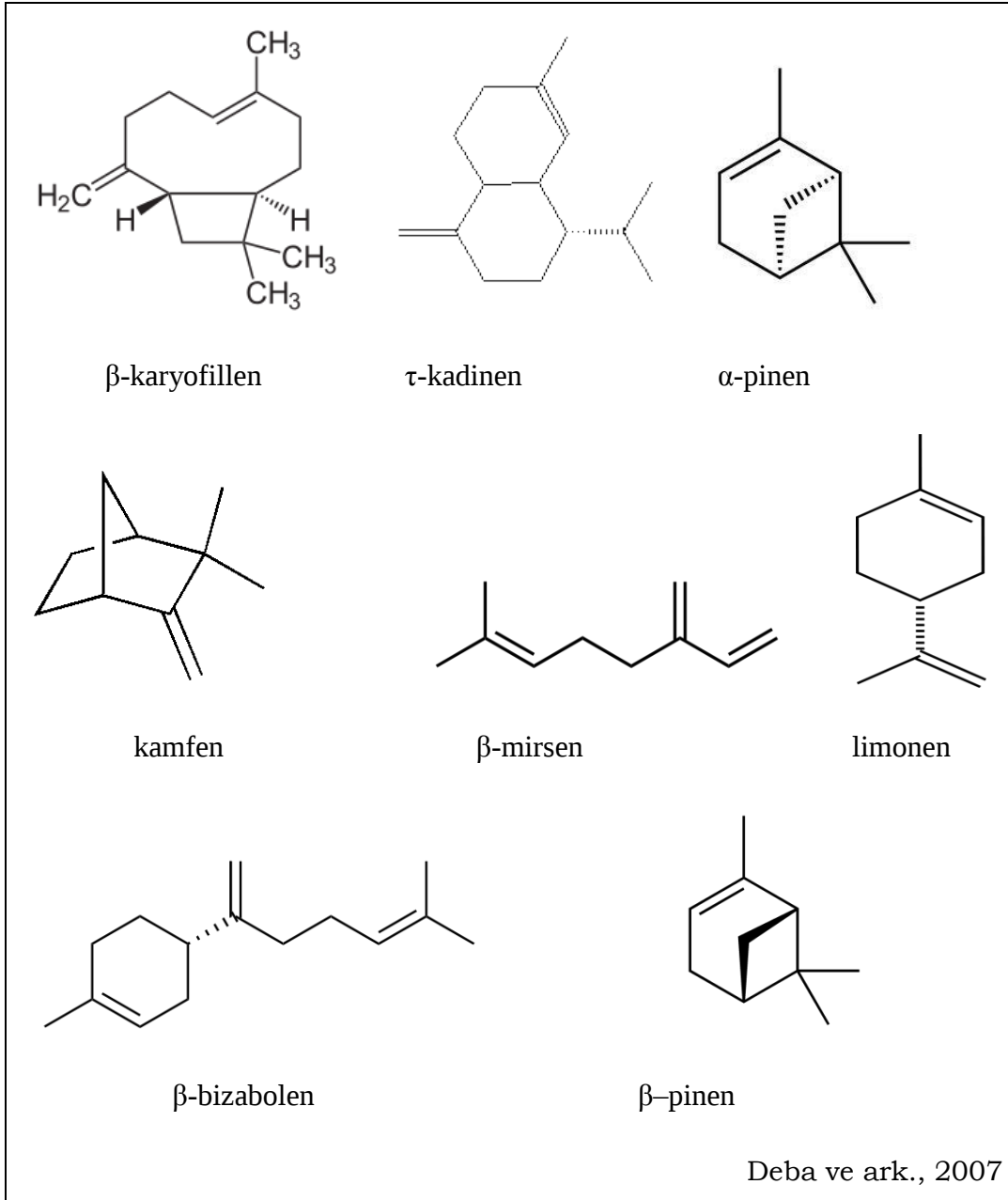


Abdou ve ark., 2010

1.5.3. Terpenik ve Uçucu Bileşikler

2007 yılında yayınlanan bir çalışmada *B. pilosa* var. *radiata*'nın, Okinawa'dan (Japonya) Temmuz ayında toplanan bitkinin taze yaprak, gövde ve kökleri ayrıştırılarak sulu ekstraktlarından hareketle hazırlanan asidik etil asetat fraksiyonları kullanılmıştır. Bitkinin parçalarından bütün hazırlanan ekstraktlarda Folin-Ciocalteu ve HPLC ile fenolik madde miktar tayini yapılmış, GC-MS ile pirokateşin, salisilik asit, *p*-vinilgayakol, dimetoksifenol, öjenol, 4-etil-1,2-benzendiol, izo-vanilin, 2-hidroksi-6metilbenzaldehit, vanilin, vanilik asit, *p*-hidroksibenzoik asit, protokateşik asit, *p*-kumarik asit, ferulik asit ve kafeik asit bileşikler tespit edilmiştir. Vanilin ve izo-vanilin hariç tüm bileşiklerin kök ekstresinde bulunduğu, dimetoksifenol, öjenol, izo-vanilin ve vanilik asitin gövde ekstresinde bulunmadığı, yaprak ekstresinde ise salisilik asit, dimetoksifenol ve vanilik asitin bulunmadığı belirlenmiştir. Fenolik bileşiklerden dokuzunun; pirokateşin, *p*-vinilgayakol, 4-etil-1,2-benzendiol, 2-hidroksi-6 metilbenzaldehit, *p*-hidroksibenzoik asit, protokateşik asit, ferulik asit ve kafeik asitin *B. pilosa* bitkisinin tüm kısımlarında bulunduğu anlaşılmıştır. Tespit edilen bu bileşiklerden yalnızca altı tanesinin (pirokateşin, vanilin, *p*-hidroksibenzoik asit, *p*-kumarik asit, ferulik asit ve kafeik asit) miktar tayini yapılmıştır. Yaprak, gövde ve kökler karşılaştırıldığında, köklerin pirokateşin ve *p*-kumarik asit miktarı hariç en yüksek fenolik bileşik içeriğine sahip olduğu görülmüştür. Bitkinin tüm kısımlarında fenolik maddeler içinde en yüksek oranda kafeik asitin bulunduğu anlaşılmıştır. Köklerde ferulik asitin pirokateşinden fazla olmasına karşın yaprak ve gövdede pirokateşinden çok daha düşük olduğu, köklerin en yüksek fenolik bileşik miktarına sahip olduğu görülmüştür (Deba ve ark., 2007).

Deba ve arkadaşlarının 2008 yılında yaptıkları bir çalışmada, *B. pilosa*'nın taze yaprak ve çiçeklerinden buhar distilasyonu ile elde edilen uçucu yağın GC-MS analizi sonucu majör bileşikler ve yüzdeleri sırasıyla β -karyofillen (% 10,9 ve % 5,1), τ -kadinen (% 7,82 ve % 6,13) olmak üzere α -pinen, kamfen, β -mirsen, β -pinen, limonen, β -bizabolen gibi 44 bileşik tespit edilmiştir (Deba ve ark., 2008).



B. pilosa var. *minor* ve *B. alba* bitkilerinin uçucu yağları üzerine yapılan bir çalışmada, örnekler Temmuz ayında Arjantin, San Isidro'dan toplanmış, taze çiçek, yaprak, gövde ve kökleri ayrıştırılarak, Clevenger cihazı yardımıyla uçucu yağları elde edilmiştir. Çiçek ve yapraklardan 1 ml/kg, gövde ve köklerden 0,2-0,3 ml/kg uçucu yağ elde edilmiştir. Uçucu yağlar GC-MS ve HPLC ile analiz edilerek 43 bileşik tespit edilmiştir. Kalitatif olarak her iki türden elde edilen yağın da benzer olduğu, bilinen terpenlerin (α -pinen, β -karyofillen, germakren D) yanı sıra her iki türün toprak üstü kısımlarından elde edilen yağlarda poliasetilenik yapıda 3 bileşik; 1-fenil-1,3,5-trin (% 30-50), 1-fenilhept-5-ena-1,3-din ve 7-fenilhept-2-ena-4,6-dinil asetat tespit edilmiştir. 7-Fenilhept-2-ena-4,6-dinil asetat bileşiği, çiçek ve yaprak uçucu yağında bulunmadığı, kök uçucu yağında baskın olduğu görülmüştür. Ayrıca *B. alba* kök uçucu yağında toplam yağın % 20'si oranında 3 adet öjenol türevi bileşik belirlenmiştir. Bu üç bileşikten ikisinin öjenol izobutirat ve 1-izobutiriloksi-öjenol izobutirat olduğu anlaşılmıştır (Priestap ve ark., 2008).

Bir diğer çalışmada, Güney Sırbistan'dan toplanan *B. cernua* bitkisinin çiçekli toprak üstü kısımlarından Clevenger cihazı kullanılarak su distilasyonu ile % 0,5 (h/a) verimle altın sarısı renkli ve sudan hafif bir uçucu yağ elde edilmiştir. Uçucu yağ GC ve GC-MS ile analiz edilmiş, 16 bileşik tespit edilmiştir. Major bileşiğin % 57,1 oranındaki 1-fenilhepta-1,3,5-trin olduğu görülmüştür. Tespit edilen diğer bileşikler, α -tuyon (% 0,2), α -pinen (% 0,9), sabinen (sadece tespit edilmiş), mirsen (% 0,1), *p*-simen (% 0,6), karvon (% 0,2), 7-epi-seskituyen (% 0,1), α -humulen (% 0,2), selina-1,4-dien (% 0,2), α -selinen (% 1,1), karyofillen oksit (% 3), salvial-4(14)-en-1-on (% 0,7), humulen-1,2-epoksit (% 3,1), (E,E)-1,3,11-trideka-trin-5,7,9-trin (% 1,8), metilbenzotiyofen (% 0,8) dir. Uçucu yağdaki poliasetilenik

bileşik oranının % 58,9, monoterpen oranının % 2'nin altında, seskiterpen oranının % 8,4 ve oksijen taşıyan bileşik oranının % 7 olduğu görülmüştür (Chalchat ve ark., 2009).

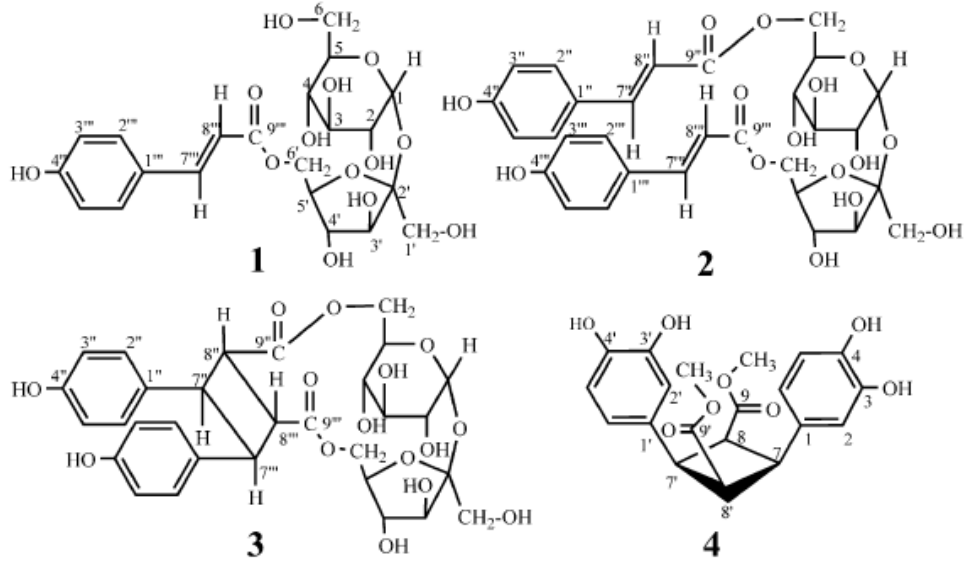
2011 yılında Polonya'da yapılan bir çalışmada, *B. tripartita* L.'nin köklerinden su distilasyonu ile elde edilen uçucu yağ GC-MS ile incelenmiş ve toplam 106 bileşik aydınlatılmıştır. Majör bileşikler α -pinen (% 15), β -bizabolol (% 9,3), *p*-simen (% 6), hekzanal (% 5,7), linalool (% 4,6), *p*-simen-9-ol (% 3,4), β -elemen (% 2,6), 2-pentilfuran (% 2,2) ve silfiperfol-6-en (% 2,1) bulunmuştur. Bu bileşiklerin yanı sıra pentanol, furfural, hekzanol, heptan-2-on, 2-butilfuran, α -tuyon, benzaldehit, kamfen, verbenen, 6-metilhept-5-en-2-on, okt-1-en-3-ol, sabinen, β -pinen, mirsen, 2-(pent-2-enil) furan, α -fellandren, 2-propionilfuran, α -terpinen, limonen, (*Z*)- β -osimen, (*E*)-okt-2-enal, (*E*)- β -osimen, γ -terpinen, *trans*-linalool oksit (furanoit), *cis*-linalool oksit, *p*-simenen, terpinolen, nonanal, α -kamfolenal, *trans*-*p*-menta-2,8-dien-1-ol, nopinon, (4*E*, 6*Z*)-allo-osimen, *trans*-pinokarveol, *cis*-verbenol, *trans*-verbenol, pinokarvon, borneol, terpinen-4-ol, dilleter, α -terpineol, mirtenol, verbenon, α -kamfolenol, *trans*-karveol, nerol, karvon, geraniol, geranial, bornil asetat, karvakrol, (*E,E*)-deka-2,4-dienal, öjenol, 7 *α* -silfiperfol-5-en, 7 *β* -silfiperfol-5-en, oktil butanoat, silfiperfol-6-en, β -damassenon, metilöjenol, α -kopaen, *cis*- β -elemen, β -karyofillen, geraniaseton, *trans*- α -bergamoten, (*E*)- β -farnesen, α -humulen, α -iyonon, *ar*-kurkumen, selina-4,11-dien, *trans*- β -bergamoten, (*Z,E*)- α -farnesen, β -selinen, miristisin, (*E,E*)- α -farnesen, α -selinen, elemisin, 1 *β* -*H*-presilfiperfolan-9 *α* -ol, italisin eter, (*Z*)-nerolidol, (*E*)-nerolidol, karolan-1-ol, β -karyofillen epoksit, humulen epoksit II, humula-1,6-dien-3-ol, silfiperfol-6-en-5-on, alismol, öjenil butirat, ödezim-11-en-4 *α* -ol, α -bizabolol, pentadekenal, ödezma-4,11-dien-2-ol, öjenil valerat, siperenal, siklokolorenon, metildibenzotiyofen, 6,10,14-trimetipentadekan-2-on ve

heksadekanoik asit bileşiklerinin varlığı tespit edilmiştir (Tomczykowa ve ark., 2011).

Hindistan'dan toplanan *B. pilosa* bitkisinin yapraklarından hekzan, etil asetat ve metanol çözücülerile değişik yöntemlerle hazırlanan ekstrelerde PHT bileşiği HPLC, UV ve kütle spektroskopisi ile tespit edilmiştir (Trivedi ve ark., 2010).

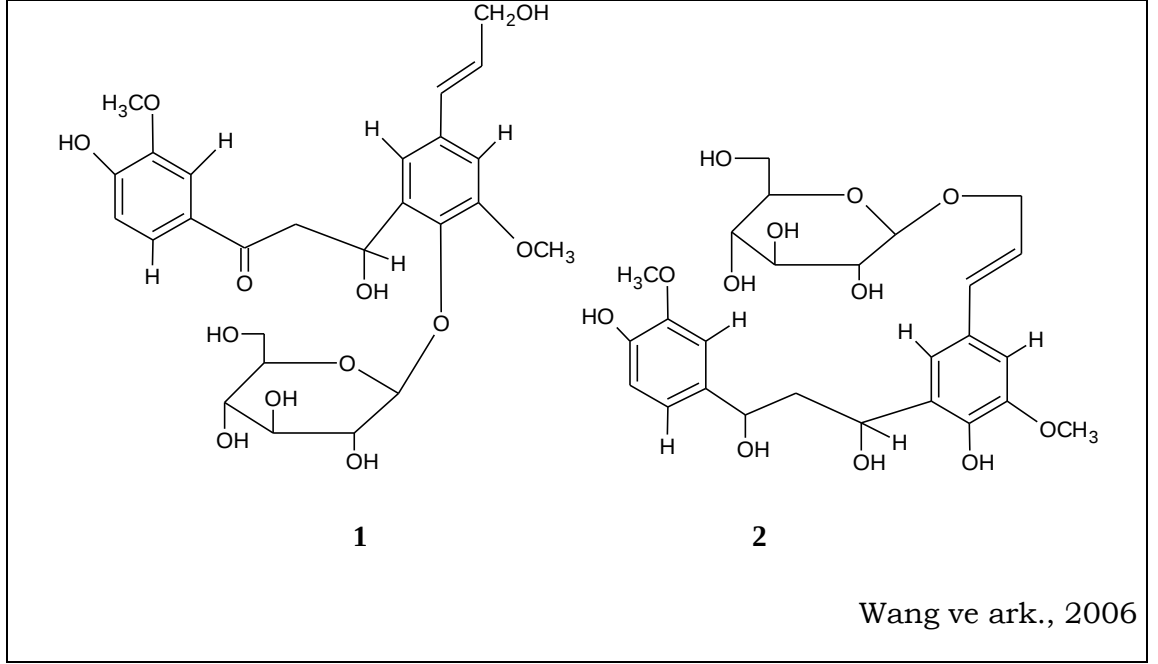
1.5.4. Sükroz Esteri ve Lignan Yapısında Bileşikler

2003 yılında yayınlanan bir çalışmada, *B. parviflora* Willd. bitkisi Temmuz ayında toplanmış ve tüm kısımları % 60'lık etanol ile ekstre edilmiştir. Elde edilen ekstre *n*-hekzan, etil asetat ve *n*-butanol ile fraksiyonlanmış, *n*-butanol fraksiyonundan hareketle silika jel, sefadeks LH-20 ve semi-preparatif HPLC gibi kromatografik yöntemlerle 3 adet sükroz esteri yapısında; (6-*O*-(*E*)-*p*-kumaroil)- β -D-fruktofuranozil-(2 $\rightarrow$ 1)- α -D-glukopiranozit (1), (6-*O*-(*E*)-*p*-kumaroil)- β -D-fruktofuranozil-(2 $\rightarrow$ 1)-(6-*O*-(*E*)-*p*-kumaroil)- α -D-glukopiranozit (2), (1 α , 2 α , 3 β , 4 β)-3,4-bis (4-hidroksi-fenil)-1,2-siklodikarboksilik asit 6,6'-sükroz ester (3) ve 1 adet lignan yapısında; (1 α , 2 α , 3 α , 4 α)-2,4-bis(3,4-dihidroksifenil)-1,3-siklobutandikarboksilikasit dimetil ester (4) yapısında bileşikler izole edilmiştir. Bileşiklerin yapıları $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$, FAB-MS, EI-MS gibi spektrometrik yöntemlerle tespit edilmiştir (Wang ve ark., 2003).



(Wang ve ark., 2003)

Wang ve arkadaşlarının 2003 yılındaki çalışmasının devamı niteliğinde olan 2006 yılındaki yayınında, *B. parviflora*'dan aynı yöntemle neolignan glukozit yapısında 3-hidroksi-1-(4-hidroksi-3-metoksifenil)-3-[5*E*-(3-hidroksipropenil)-3metoksi-2-*O*- β -D-glukozil]fenil]propan-1-on (1) ve 3-{3-[1,3-di-hidroksi-3-(4-hidroksi-3-metoksifenil)propil]-4-hidroksi-5-metoksifenil}-allil-*O*- β -D-glukozit (2) bileşikleri izole edilmiştir (Wang ve ark., 2006).



1.5.5. Makro-Mikro Element İçeriği ve Besleyiciliği

2011 yılında yapılan bir çalışmada, *B. pilosa* bitkisinin yapraklarında magnezyum, kalsiyum, potasyum, fosfor, sodyum, demir, çinko, bakır, mangan ve toplam Kjeldahl azot miktarları araştırılmıştır. Na/K oranının yüksek kan basıncını önleyecek düzeyde olduğu, demir oranının yüksek olduğu, çinko oranının ise yeşil yapraklı sebzelerle karşılaştırıldığında pozitif düzeyde olduğu görülmüştür. Aynı çalışmada, yaprakların protein, yağ, lif ve karbonhidrat miktarları da araştırılmış ve kalori bazında değerlendirilebilir olduğu görülmüştür (Adedapo ve ark., 2011).

1.6. *Bidens* Türlerinin Biyolojik Aktiviteleri

Bidens türleri üzerinde yapılmış biyolojik aktivite çalışmaları aşağıda detaylarıyla sınıflandırılarak açıklanmıştır.

1.6.1. Antidiyabetik Aktivite

B. pilosa'nın antihiperglisemik aktivitesinin araştırıldığı bir çalışmada, bitkinin etanol:su (4:1) ekstresi 1000 mg/kg dozda, su ile hazırlanmış dekoksiyonu 1000 mg/kg dozda ve bitkiden izole edilmiş olan (2- β -D-glukopiranoziloksioksi-1-hidroksi-5(*E*)-trideken-7,9,11-trin ve 3- β -D-glukopiranoziloksioksi-1-hidroksi-6(*E*)-tetradeken-8,10,12-trin) poliasetilenik yapıda iki bileşiğin (3:2) oranında karışımı 250 mg/kg ve 500 mg/kg dozlarda C57 BL/Ks-*db/db* (tip 2 diyabet modeli olarak kullanılan genetiği değiştirilmiş obez fareler) farelere oral olarak gavaj yardımıyla 0, 8 ve 24. saatlerde uygulanmıştır. Referans madde olarak metformin 250 mg/kg dozda kullanılmıştır. Kan glukoz seviyeleri 3. ve 27. saatlerde ölçülmüştür. Sulu dekoksiyon etkisiz bulunmuştur. Sulu etanol ekstresi ve poliasetilenik bileşiklerin karışımlarında ise aktivite saptanmıştır. Fakat bileşiklerin karışımlarının farelerde anoreksiye neden olduğu görülmüştür (Ubillas ve ark., 2000).

B. pilosa'nın da aralarında bulunduğu 4 Meksika bitkisinin normal ve alloksanla diyabet oluşturulmuş fareler üzerindeki hipoglisemik etkisinin araştırıldığı bir çalışmada, sulu-etanolü ekstrenin 240 dakikada kan şekerini % 32,6 oranında düşürdüğü gözlenmiştir (Alarcon-Aguilar ve ark, 2002).

Dimo ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada, *B. pilosa*'nın kurutulmuş yapraklarından hazırlanmış metanol-diklorometan (1:1)

ekstresinin yüksek fruktoz diyetindeki Wistar sıçanlarında oluşan hipertansiyonu düşürücü etkisi araştırılmıştır. Wistar sıçanlarına 3-6 hafta boyunca % 10 fruktoz çözeltisi içirilmesi sonucu plazma insülin ve kolesterol seviyesinin yanı sıra sistolik kan basıncının da arttığı gözlenmiştir. *B. pilosa* ekstresinin hipertansiyonun gelişmesini ve kan basıncının az da olsa yükselmesini engellediği görülmüştür. Ekstre aynı zamanda fruktoz diyeti yüzünden yükselmiş olan plazma insülin seviyesini de düşürmüştür (Dimo ve ark., 2002).

Chang ve arkadaşları tarafından *B. pilosa* var. *radiata*'nın tüm kısımlarından hazırlanan sulu ekstreden hareketle elde edilen butanol fraksiyonunun obez olmayan farelerde kan şekeri ve insülin seviyesini düzenleyici etkisinin araştırıldığı bir çalışmada, kan şekeri ve insülin seviyesinin doza bağlı olarak düzenlendiği ve Th2 sitokinleri tarafından ayarlanan IgE seviyesinin arttığı ispatlanmıştır. Butanol fraksiyonunun ve bu fraksiyondan izole edilen 2 poliasetilenik yapıda bileşiğin diyabet başlangıcını Th0 hücrelerinin farklılaşarak Th1 hücrelerini oluşturmalarını ve Th0 hücrelerinin Th2 hücrelerine dönüşümünü artırarak engellediği anlaşılmıştır (Chang ve ark., 2004).

Andrade-Cetto ve Heinrich'in 2005 yılında yayınladığı derlemede, Meksika'da yetişen *B. aurea* ve *B. odorata*'nın toprak üstü kısımlarından hazırlanan infüzyonların hipoglisemik olarak kullanıldığı, *B. leucantha* ve *B. pilosa*'nın toprak üstü kısımlarından hazırlanan infüzyonların ise alloksanla diyabet oluşturulmuş fareler üzerinde antidiyabetik etki gösterdiği bildirilmiştir (Andrade-Cetto ve Heinrich, 2005).

Toy CD4⁺ T (Th0) hücreleri iki şekilde farklılaşarak yardımcı T hücreleri olan tip I (Th1) ve tip II (Th2) hücrelerine dönüşmektedir. Th1 hücrelerinden salınan interferon gama (IFN- γ) Th1 aracılı otoimmün hastalıklardan olan obezitesiz diyabete, romatoid artrite ve Crohn hastalığına neden olmaktadır. Daha önceki çalışmalarda *B. pilosa* ekstresinin T hücrelerinin değişimini etkileyerek obez olmayan farelerde antidiyabetik etki gösterdiği anlaşıldığından 2007 yılında yapılan bir çalışmada, *B. pilosa* metanol ekstresinden hareketle izole edilen sitopiloin isimli poliasetilenik bileşiğin T hücreleri üzerindeki etkisi incelenmiştir. Sitopiloinin Th0 hücrelerinin Th1 hücrelerine dönüşümünü inhibe ettiği, IFN- γ üretimini baskıladığı, Th2 hücrelerine dönüşümünü ise artırdığı görülmüştür. Sonuç olarak; sitopiloinin *B. pilosa*'nın diyabeti engellemedeki geleneksel kullanımını desteklediği görülmüştür (Chiang ve ark., 2007).

B. pilosa'nın Tip 2 diyabet üzerine etkisinin araştırıldığı bir çalışmada, tüm bitkiden hazırlanan sulu ekstre ve glimeprit günde 1 kez 28 gün boyunca C57BL/KsJ-db/db farelerine oral olarak verilmiştir. Kandaki şeker seviyesi, serum insülin seviyesi, glukozile hemoglobulin A1C seviyesi, glukoz toleransı, pankreas adacık hücrelerindeki yapı ve antidiyabetik etki araştırılmıştır. Ayrıca *B. pilosa* sulu ekstresinin sıçan pankreatik adacık hücrelerinin ve streptozotosin ile diyabet oluşturulmuş farelerin insülin salgılama mekanizması test edilmiştir. 28 gün boyunca günde bir kez verilen ekstrenin kan şekerini düşürdüğü, serum insülin seviyesini artırdığı gözlenmiştir. Ayrıca glukoz toleransını artırdığı, hemoglobulin A1C seviyesini azalttığı ve adacık hücrelerini koruduğu belirlenmiştir. Sonuçlar *B. pilosa* sulu ekstresinin insülin salınımını ayarlayıp, adacık hücrelerini koruyarak tip 2 diyabeti iyileştirdiğini göstermiştir (Hsu ve ark., 2009).

B. pilosa var. *radiata* (BPR), *B. pilosa* var. *pilosa* (BPP), *B. pilosa* var. *minor* (BPM) Tayvan'da halk arasında diyabete karşı sıklıkla kullanılan varyetelerdir. 2009 yılında Ubillas ve arkadaşlarının (2000) çalışmasının devamı niteliğinde yapılan bir çalışmada, bitkilerin metanol ekstraktlarının ve *Bidens* türlerinin majör bileşiklerinden 3 poliasetilenik yapıda bileşiğin (sitopiloin, 2- β -D-glukopiranoziloksioksi-1-hidroksi-5(*E*)-trideken-7,9,11-trin ve 3- β -D-glukopiranoziloksioksi-1-hidroksi-6(*E*)-tetradeken-8,10,12-trin) antidiyabetik etkisi diyabetik db/db fareler üzerinde karşılaştırılmalı olarak araştırılmıştır. Tek doz ve uzun dönem deneylerde BPR ekstresi diğer iki varyeteden daha yüksek glukoz düşürücü etki ve insülin salınımını uyarıcı etki göstermiştir. Sitopiloin maddesinin ise diğer iki saf maddeden daha etkili olduğu anlaşılmıştır. Ayrıca BPR ekstresi ve sitopiloin glukozillenmiş hemoglobin yüzdesini önemli ölçüde düşürmüştür (Chien ve ark., 2009).

1.6.2. Antioksidan Aktivite

Abajo ve arkadaşlarının 2004 yılında yayınladıkları bir çalışmada Küba'dan toplanan *B. pilosa*'nın toprak üstü kısımlarından hazırlanan sulu ekstrenin antioksidan aktivitesi 2,2'-azobis(2-amidinopropan)dihidroklorit (AAPH) radikalinin hemolizi indükleyici etkisine karşı koruyuculuğunun araştırılması ile incelenmiş olup bitkinin sulu infüzyonunun küçük dozlarda bile güçlü antioksidan etki gösterdiği anlaşılmıştır (Abajo ve ark., 2004).

2004 yılında yapılan bir çalışmada, *B. pilosa*'nın taze tüm kısımlarından hazırlanan % 70'lik etanollü ekstresinden hareketle etil asetat ve butanol fraksiyonları hazırlanmıştır. Ekstrenin ve fraksiyonların α - tokoferol ve kersetin ile kıyaslandığında önemli

ölçüde DPPH radikal ve Nitroblue tetrazolium (NBT)/hipoksantin süperoksit süpürücü aktivite gösterdiği saptanmıştır (Chiang ve ark, 2004).

Bir başka çalışmada, Gabal Elba'da (Mısır) yabani olarak yetişen *B. bipinnata* ile kültüre alınmış *B. bipinnata* bitkilerinin antioksidan etkileri DPPH radikalini süpürücü etkisi incelenerek karşılaştırılmıştır. Çalışmada bitkilerin toprak üstü kısımlarından 90° etanol ile ayrı ayrı ekstre hazırlanmış, ayrıca yabani ve kültür bitkisinin ekstreleri karıştırılarak eter, kloroform, etil asetat ve *n*-butanol ile fraksiyonlanmıştır. Yabani ekstre % 88,80, kültür ekstresi % 95,54, eter fraksiyonu % 9,28, kloroform fraksiyonu % 12,40, etil asetat fraksiyonu % 101,59 ve butanol fraksiyonu % 110,04 antioksidan aktivite göstermiştir (Awaad ve ark, 2005).

Tayvan'dan toplanan *B. pilosa* var. *radiata* bitkisinin % 70'lik etanol ve etanol:etil asetat (1:1) ekstreleri hazırlanarak insan normal eritrositlerinde oksidatif hasara karşı koruma güçleri *in vitro* olarak araştırılmıştır. Ekstreler ile eritrositlerde sulu peroksil radikal [2,2'-azobis(2-amidinopropan) dihidroklorit (AAPH)] ile indüklenen oksidatif hemoliz ve lipit/protein peroksidasyonu baskılanmış, ayrıca süperoksit dismutaz (SOD) aktivitesinin düşüşü, eritrositlerdeki ATP ve sitozolik glutatyon (GSH) tüketilmesi engellenmiştir. Sonuçlar *B. pilosa*'nın antioksidan özelliğinin olduğunu göstermiştir (Yang ve ark., 2006).

Wolniak ve arkadaşlarının 2007 yılında yayınladıkları çalışmada *B. tripartita* L. bitki ekstrelerinin ve flavonoidlerinin 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH) radikalini süpürücü aktivitesi Elektron Paramanyetik Rezonans Spektroskopisi (EPR) yardımıyla ölçülmüştür. Bitkinin çiçek ve herbasının ayrı ayrı su, metanol-su ve

aseton-su ekstreleri hazırlanmış, ekstreler dietileter, etil asetat ve *n*-BuOH ile fraksiyonlara ayrılmış, bitkiden luteolin, sinarozit ve flavanomorein bileşikleri izole edilmiştir. Ekstrelerin, fraksiyonların ve saf maddelerin DPPH radikali süpürücü aktivitesi incelendiğinde, iki dakika sonunda çiçekler için sulu ekstre % 36, metanol-su % 68 (20 dakika sonunda % 95), aseton-su % 66, dietileter fraksiyonu % 97, etil asetat fraksiyonu % 98, *n*-BuOH fraksiyonu % 22 (20 dakika sonunda % 36), herba için sulu ekstre % 35, metanol-su % 34, aseton-su % 56 (20 dakika sonunda % 82), dietileter fraksiyonu % 92, etil asetat fraksiyonu % 89, *n*-BuOH fraksiyonu % 65 (20 dakika sonunda % 84), luteolin % 41, sinarozit % 25, flavanomorein % 32 oranında etkili olduğu bulunmuştur. Sonuçlar incelendiğinde; toplam fenolik bileşik miktarının toprak üstü kısımda çiçeklerden fazla olmasına rağmen çiçek ekstrelerinin daha etkin olduğu anlaşılmıştır. Bu durum sonucunda antioksidan aktivitenin sadece polifenol miktarından değil ekstrenin bileşiminden ve çözücü, antioksidatif sinerjizm gibi diğer faktörlerden de etkilendiği düşünülmüştür. Sonuç olarak, *B. tripartita* ekstreleri ilaçlar ve yiyeceklerde koruyucu olarak ümit vaat etmektedir. (Wolniak ve ark., 2007).

Deba ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada, *B. pilosa*'nın taze yaprak ve çiçeklerinden buhar distilasyonu ile elde edilen uçucu yağın bileşimi GC-MS analizi ile belirlenmiş, uçucu yağ ile yaprak ve çiçeklerin sulu ekstresinin antioksidan aktivitesi DPPH ve β -karoten ağartıcı yöntemleriyle araştırılmış olup ekstre ve uçucu yağın linoleik asitin oksidasyonunu inhibe ettiği belirlenmiştir. Ayrıca uçucu yağ 6 bakteri türü (*Bacillus subtilis*, *B. cereus*, *B. pumilus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas ovalis*, *Micrococcus flavus*) ve 3 mantar suşu (*Corticium rolfsii* f.sp., *Fusarium oxysporum*, *F. solani*) üzerinde kayda değer antibakteriyel ve antifungal etki göstermiştir (Deba ve ark., 2008).

Awaad'ın 2009 yılında yayınladığı bir çalışmada, *B. bipinnata* bitkisinin toprak üstü kısımlarının % 90'lık etanol ekstresi, bu ekstreden hareketle hazırlanan eter, kloroform, etil asetat ve *n*-butanol alt ekstreleri ile izole edilen 7 adet flavonoit yapısında bileşiğin antioksidan aktivitesi, DPPH radikalini süpürme güçleri incelenerek araştırılmıştır. Kültür bitkisinin etanollü ekstresinin butilhidroksi tolueen (BHT) ile karşılaştırıldığında, doğadan toplanan bitkinin etanollü ekstresine göre daha yüksek antioksidan aktivite gösterdiği belirlenmiştir. Ekstreler ve fraksiyonlar karşılaştırıldığında antioksidan aktivite en yüksekten en düşüğe doğru *n*-butanol alt ekstresi (110,04), etil asetat alt ekstresi (% 101,59), etanol ekstresi (% 88,8), kloroform (% 12,4) ve eter alt ekstresi (% 9,28) şeklinde bulunmuştur. Ekstreler ve saf maddeler arasında en güçlü antioksidan aktiviteyi propil gallat (% 100), BHT (% 113,12) ve α -tokoferol (% 55,1) ile karşılaştırıldığında kersetin 3-O- β -D-galaktopiranozito-(6-1)-O- β -D-ksilopiranozit (% 132,76) ve izoramnetin 3-O- β -D-apio-D-furanozil (1-2)- β -D-galaktopiranozit (% 116,60) göstermiştir (Awaad, 2009).

B. pilosa bitkisinin antioksidan ve hepatoprotektif etkisinin araştırıldığı bir çalışmada, bitkinin toprak üstü kısımlarından hazırlanan etanol-su (9:1) ekstresi çözücü uçurulduktan sonra silika jel 60 ile doldurulmuş kolona uygulanmış ve kloroform (CHCl₃), etil asetat (EtOAc) ve metanol (MeOH) fraksiyonları elde edilmiştir. Antioksidan aktivite fraksiyonların DPPH radikalini süpürme gücü, deoksiriboz oksidasyon inhibisyonu ve lipid peroksidasyon inhibisyonu etkilerinin referans madde silimarin ile karşılaştırılması ile incelenmiştir. En yüksek antioksidan aktiviteyi etil asetat fraksiyonu (IC₅₀ ~ 4,3-32,3 μ g/ml) ve etanol-su ekstresi (IC₅₀ ~ 14,2-98,0 μ g/ml) göstermiştir. Etil asetat fraksiyonunun (3,6 $\pm$ 0,2 GAE/mg) toplam çözünebilir polifenol miktarının etanol-su

ekstresinden ($2,1 \pm 0,2$ GAE/mg) daha yüksek olduğu bulunmuştur. İki ekstrenin de CCl_4 ile karaciğerinde hasar oluşturulmuş fareler üzerindeki hepatoprotektif etkisi araştırılmıştır. 10 günlük ön tedavi sonuçları karaciğerde lipid peroksidasyonunun, protein karbonilasyonunun ve DNA parçalanmasının % 60 oranında azaldığını göstermiştir. Tedavinin plazmadaki ferrik indirgenmeyi yani antioksidan güç kaybını engellediği, serum transaminaz ve laktat dehidrogenaz enzim aktivitelerini artırdığı anlaşılmıştır. Sonuçlar hepatoprotektif ile birlikte serbest radikal süpürücü aktiviteden sorumlu olan bileşiklerin etil asetat fraksiyonuna geçtiğini göstermiştir (Kwiecinski ve ark., 2011b).

Güney Afrika'dan Kasım 2006'da toplanan *B. pilosa* bitkisinin aseton, metanol ve su ekstraları, toz edilmiş yaprakların sırasıyla söz konusu çözücülerle oda sıcaklığında çalkalanmasıyla hazırlanarak antioksidan etkisi DPPH radikali süpürme gücü, ABTS radikali süpürme gücü ve toplam antioksidan aktivite FRAP metodu araştırılarak incelenmiştir. Toplam polifenol, flavonoit, proantosiyanidin ve toplam flavonol miktar tayinleri yapılmıştır. Toplam polifenol, flavonoit ve proantosiyanidin miktarlarının aseton ekstresinde en yüksek, su ekstresinde en düşük olduğu, toplam flavonol miktarının ise metanol ekstresinde en yüksek, su ekstresinde en düşük olduğu görülmüştür. Standart olarak kullanılan askorbik asitin DPPH radikali süpürücü etkisi % 99, BHT'in % 99,3 iken aseton ekstresinin %95,7, metanol ekstresinin % 94,2, su ekstresinin % 91,7 olduğu görülmüştür. ABTS radikali süpürücü etkisi aseton ekstresi için % 98,8, metanol ekstresi için % 99,1, su ekstresi için % 95,7, BHT için ise % 99,3 olarak bulunmuştur. FRAP incelendiğinde, aseton ekstresinin (2431,9) metanol ve su ekstresinden, BHT (63,5), askorbik asit (632) ve kateşinden (972) daha yüksek olduğu, kersetinden (3107,3) ise daha

düşük olduğu görülmüştür. Sonuçlar antioksidan aktiviteyle toplam fenol miktarı arasında pozitif ilişki olduğunu göstermiştir (Adedapo ve ark., 2011).

2012 yılında yapılan bir çalışmada, farklı lokalitelerden toplanan *B. pilosa* bitkisinin kök, gövde ve çiçekli yaprakları ayrılarak, toplam flavonoit miktarı ve toplam polifenol miktarı belirlenmiş ve antioksidan aktiviteleri *in vitro* olarak araştırılmıştır. Sulu etanollü çiçekli yaprak ekstresi en yüksek gövde ekstresi ise en düşük antioksidan aktiviteyi göstermiştir. Antioksidan aktiviteyle toplam flavonoit ve toplam fenolik bileşik miktarı arasında korelasyon olduğu ve hareketli maserasyonla hazırlanan ekstrelerin antioksidan aktivitesinin Soxhlet gibi diğer yöntemlerle hazırlanan ekstrelerden yüksek olduğu anlaşılmıştır (Cortes-Rojas ve ark., 2012).

1.6.3. Antienflamatuvar ve Antialerjik Aktivite

Jager ve arkadaşlarının 1996 yılında yayınladıkları bir çalışmada, aralarında *B. pilosa*'nın da bulunduğu Güney Afrika Zulu'da yetişen bazı bitkilerin prostoglandin-sentezini inhibe edici aktiviteleri araştırılmıştır. *B. pilosa* yapraklarından hazırlanan sulu ekstrenin siklooksijenazı % 22 oranında, etanollü ekstrenin ise % 90 oranında inhibe ettiği gözlenmiştir (Jager ve ark., 1996).

2006 yılında yayınlanan bir çalışmada, *B. pilosa* var. *radiata* bitkisinin antienflamatuvar ve antialerjik etkileri araştırılmıştır. Bitkinin toprak üstü kısımlarından *in vitro* deneyler için (100°C'de 24 saat) sulu ekstre, *in vivo* deneyler için % 0,025 karboksimetil selüloz sodyum ile süspansiyon hazırlanmıştır. *In vivo* deneylerde 100, 250 ve 500 mg/kg dozda oral uygulama yapılmıştır. DNP-askaris ile

immunizasyon oluşturulmuş farelerde IgE üretiminin ve sıçan periton mast hücrelerinde 48/80 bileşiği veya antijen-antibadi reaksiyonu ile oluşturulmuş histamin salınımı inhibe olduğu görülmüştür. Oral yolla uygulanan süspansiyon sıçan derisinde pasif kütanoz anafilaksis ve kimyasal mediatörler (histamin, P maddesi ve serotonin) nedenli eksudasyonu baskılamıştır. Sonuçlar *B. pilosa*'nın klinikte tip 1 alerjilerin önlenmesinde kullanılabileceğini göstermiştir (Horiuchi ve Seyema, 2006).

Miyako (Japonya) adasından toplanan *B. pilosa* var. *radiata* bitkisinin sellulozin enzimi ile muamele edilmiş toprak üstü kısımlarının antienflamatuvar ve antialerjik etkisi olduğu bulunmuştur (Horiuchi ve Seyama, 2008).

B. tripartita'nın antienflamatuvar aktivitesinin araştırıldığı bir çalışmada, Rusya ve Finlandiya'dan toplanan bitkilerin toprak üstü kısımlarının sulu infüzyonu 3 dozda (4 ml/kg, 10 ml/kg, 20 ml/kg) sıçanların ayaklarında karragen ile oluşturulmuş ödem üzerinde denenmiştir. Referans madde olarak indometazin (5 mg/kg) kullanılmıştır. 20 ml/kg dozda uygulanan ekstrelerin etkisi anlamlı bulunmuştur. Antienflamatuvar etkinin yanında sıçanlar üzerinde hot plate testi ve karragen ile indüklenmiş hipertermi testi ile ekstrelerin analjezik ve antipiretik etkileri tespit edilmiştir. Etkilerin doza bağımlı olarak arttığı görülmüştür. Üç aktivite bakımından da Rusya'dan toplanan bitkinin daha etkili olduğu bulunmuştur (Pozharitskaya ve ark., 2010).

2011 yılında yapılan bir çalışmada, *B. pilosa* bitkisinin toprak üstü kısımlarından hazırlanan dekoksiyonu partitasyonla *n*-butanol ve su fraksiyonlarına ayrılmış ve değişik yöntemler kullanılarak

antienflamatuvar etkisi araştırılmıştır. 100 mg/kg dozundaki su fraksiyonunun Wistar sıçanlarının pençesinde karragen ile oluşturulmuş ödemi baskıladığı, eksuda hacmini ve karragen ile oluşturulmuş akciğer zarı iltihabındaki toplam ve farklılaşmış hücre sayısını inhibe ettiği görülmüştür. (Chauhan ve ark., 2011).

Lermen ve arkadaşlarının 2012 yılında yaptıkları bir çalışmada, *B. pilosa* bitkisinin toprak üstü kısımlarından hazırlanan % 80'lik hidroalkolik ekstrenin *in vivo* ve *in vitro* olarak lökosit mobilizasyonu üzerine etkisi araştırılmıştır. Ekstrenin potansiyel antienflamatuvar olduğu görülmüş ve çalışma bitkinin halk arasındaki kullanımını desteklemiştir (Lermen ve ark., 2012).

1.6.4. Yara İyileştirici Aktivite

2011 yılında yapılan bir çalışmada, *B. pilosa* ve *Ocimum suave* bitkilerinin yapraklarından hazırlanan % 90'lık etanol ekstrelerinin Wistar albino sıçanlar üzerinde eksizyon yara modeli yöntemi kullanılarak yara iyileştirici etkisi araştırılmıştır. Her biri 9 sıçandan oluşan 4 grup hayvanda oluşturulan yaralara *O. suave* ve *B. pilosa* ekstreleri, neomisin sülfat ve distile su ile günde iki kez topikal olarak uygulanmıştır. Deney boyunca yaranın küçülme, epitelizasyon ve tamamen iyileşme süreçleri takip edilmiştir. *O. suave* ve *B. pilosa* ekstrelerinin yara tedavisinde neomisin sülfata alternatif olabileceği görülmüştür (Hassan ve ark., 2011).

1.6.5. Mide-Bağırsak Üzerine Etkileri

Alarcon de la Lastra ve arkadaşlarının 1994 yılında yayınladıkları bir çalışmada, İspanya'dan toplanan *B. aurea* bitkisinin çiçekli dal uçlarının metanollü ekstresinden hareketle eter, su ve etil asetat fraksiyonları hazırlanmıştır. Ekstre ve fraksiyonların antiülser aktivitesi Wistar sıçanlarının midesinde stresle oluşturulmuş ülser modeli üzerinde test edilmiştir. 250 ve 125 mg/kg dozda uygulanan flavonoit taşıyan eter fraksiyonu mide hücreleri üzerinde en yüksek koruyucu etkiyi göstermiştir (Alarcon de la Lastra ve ark., 1994).

B. pilosa var. *radiata* Schult. Bip'in halk tıbbında peptik ülseri de içeren mide hastalıklarının tedavisinde kullanılmasından yola çıkılarak, Alvarez ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada, bitkinin toprak üstü kısımlarından hazırlanan % 70'lik metanol ekstresinin (0,5-2 g/kg) sıçanlarda, mide öz suyunu, asit ve pepsin salınımını azalttığı görülmüştür. Ekstre indometazin-nedenli gastrik lezyonlara karşı antiülser aktivite göstermiştir. 2 g/kg dozda uygulanan ekstrenin etanol ile oluşturulmuş gastrik hemorajik lezyonlar üzerinde 400 mg/kg dozda uygulanan sükralfattan daha etkili olduğu, ranitidinin ise etkisiz kaldığı görülmüştür. Ekstrenin gastrik sekresyonu azlatmasının yanı sıra HPLC ile tespit edilen kersetin ve diğer flavonoitlerin varlığı nedeniyle hücre koruyucu etkisinin de olduğu anlaşılmıştır (Alvarez ve ark., 1999).

Ortega ve arkadaşlarının 2000 yılında yayınladıkları bir çalışmada, oral absolü etanol ile oluşturulmuş gastrik lezyonlardaki hasarı *B. aurea* metanol ekstresinin % 20, *B. aurea* kloroform ekstresinin % 41, *B. subalternans* metanol ekstresinin ise % 27 oranında azalttığı görülmüştür (Ortega ve ark., 2000).

Etnobotanik alışmalar *B. pilosa*'nın Kamerun'da yara tedavisinde, Brezilya ve Venezuela'da kronik duodenal ülserde geleneksel olarak kullanıldığını göstermiştir. *B. pilosa* yapraklarının metanol, sikloheksan ve metilen klorür ekstrelerinin antiülserojenik aktivitesi erkek Wistar albino sıçanlarda HCl/etanol, absolü etanol ile oluşturulmuş gastrik lezyonlar üzerinde araştırılmıştır. Metanol ve sikloheksan ekstreleri (% 41-% 46) ile karşılaştırıldığında HCl/etanol ile oluşturulmuş lezyonlarda metilen klorür ekstresi 750 mg/kg dozda en yüksek etkiyi (%100) göstermiştir. Absolü etanol ile oluşturulmuş lezyonlara karşı ekstre 750 mg/kg dozda (% 9,8) düşük bir koruyucu etki göstermiştir. *In vivo* ve *in vitro* olarak gastrik sekresyonu ve mide suyunu azaltıcı etkisinin olmadığını anlaşılmıştır (Tan ve ark., 2000).

B. odorata ve *Alternanthera repens* bitkilerinin gastrointestinal bozukluklarda kullanımını araştırmak üzere 2008 yılında bir çalışma yapılmıştır. Bitkilerin toprak üstü kısımlarından Soxhlet cihazında etanollü ve sulu ekstreler hazırlanarak farelerdeki letal dozları ve antidiyareik etkileri incelenmiştir. Çalışma sonucunda, ekstrelerin toksisitesinin düşük olduğu ve motiliteyi azalatarak antidiyareik etki gösterdiği anlaşılmıştır. Sonuçlar bu bitkilerin Meksika geleneksel tıbbındaki antidiyareik kullanımını doğrulamıştır (Astudillo-Vazquez ve ark., 2008).

2011 yılında yapılan bir çalışmada, *B. pilosa* L. var. *radiata* bitkisinin toprak üstü kısımlarının karboksimetil selüloz ile hazırlanan süspansiyonun HCl/EtOH, non-steroidal antiienflamatuvar ilaç ve stres ile oluşturulmuş gastrik lezyonlar üzerindeki etkisi araştırılmıştır. Oral olarak uygulanan süspansiyon gastrik lezyonların ilerlemesini engellemiştir. Antioksidan etkisi olan *B.*

pilosa'nın, rutin ve sukralfatın gastrik lezyonlardaki tiyobarbitürik asit reaktif madde (TBARS) seviyesinin yükselişini inhibe ettiği görülmüştür. Sonuç olarak *B. pilosa*'nın akut gastrik mukozal lezyon oluşumunu gastrik mukozadaki oksidatif stresi baskılayarak engellediği düşünülmüştür (Horiuchi ve ark., 2010).

1.6.6. Antibakteriyel, Antifungal ve Antiviral Aktivite

Khan ve arkadaşlarının 2001 yılında yayınladığı bir çalışmada, *B. pilosa* ile birlikte 3 farklı bitkinin daha antimikrobiyal aktivitesi disk difüzyon metodu ile araştırılmıştır. Çalışmada, *B. pilosa* bitkisinin kurtulmuş tüm kısımlarından Soxhlet ile hazırlanan etanol ekstresi ile petrol eteri, diklorometan ve etil asetat fraksiyonlarının, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* gibi çok sayıda gram pozitif ve gram negatif bakterilere, bir protozoon (tek hücreli canlı) olan *Trichomonas vaginalis* ve *Aspergillus niger*, *Candida albicans* gibi mantarlara karşı antimikrobiyal aktivitesi incelenmiştir. Hiçbir ekstre ve fraksiyon test edilen mantarlara karşı bir etki göstermezken, etanol ekstreleri ve tüm fraksiyonlar geniş spektrumda antibakteriyel etki göstermiştir (Khan ve ark., 2001).

2007 yılında yayınlanan *B. pilosa* var. *radiata*'nın fungisidal aktivitesinin araştırıldığı bir çalışmada, Okinawa'dan (Japonya) Temmuz ayında toplanan bitkinin taze yaprak, gövde ve kökleri ayrıştırılarak sulu ekstrelerinden hareketle hazırlanan asidik etil asetat fraksiyonları kullanılmıştır. Bitkinin parçalarından hazırlanan bütün ekstrelerin *Corticium rolfsi* f. sp., *Fusarium solani* ve *F. oxysporum* mantarlarına karşı fungisidal etki gösterdiği ve en yüksek etkinin *C. rolfsi*'ye karşı olduğu görülmüştür. Gövde ve köklerden

hazırlanan ekstrelerin yapraklara göre daha etkili olduğu *B. pilosa*'nın fitopatojenlerin çoğalmasını engellediği ortaya çıkmıştır (Deba ve ark., 2007).

Tomczykowa ve arkadaşlarının bir çalışmasında, Ağustos 2001'de Polonya'dan toplanan *B. tripartita* bitkisinin çiçekli toprak üstü kısımlarından çiçekler ve herba ayrılarak su distilasyonu ile uçucu yağ elde edilmiştir. Ayrıca herba ve çiçeklerden çeşitli ekstraksiyon yöntemleri ile ayrı ayrı su, metanol-su, aseton-su ve metanol ekstrelerinden hareketle dietileter, etil asetat, *n*-butanol alt ekstreleri hazırlanmıştır. Uçucu yağların ve ekstrelerin Gram-pozitif bakteriler olan *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Micrococcus luteus* ATCC 9391, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, Gram-negatif bakteriler olan *Escherichia coli* ATCC 25922, *E. coli* ATCC 35218 (β -laktamaz +), *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700633, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, mantar türlerinden *Candida albicans* ATCC 10231, *C. parapsilosis* ATCC 22019, *Aspergillus fumigatus* ve *A. terreus*'a karşı antibakteriyel ve antifungal aktiviteleri incelenmiştir. Butanollü ekstreler hariç, tüm ekstre ve alt ekstreler Gram-pozitif bakterilere karşı antibakteriyel etki göstermiştir. Dietileter herba ekstresi Gram-pozitif bakterilere karşı en güçlü etkiyi gösterirken, gram negatiflere karşı yeterli etki göstermemiştir. Dietileter çiçek ekstresi de Gram-pozitiflere karşı benzer etki gösterirken, Gram-negatiflerden *E. coli* (β -laktamaz +), ve *K. pneumoniae*'ye karşı zayıf bakteriyostatik etki göstermiştir. Bütün ekstrelere karşı *P. aeruginosa*'nın en dirençli suş olduğu görülmüştür. Çiçeklerden ve herbadan elde edilen uçucu yağların ikisinin de Gram-pozitif bakterilere karşı etkili olduğu, çiçek uçucu yağının, herba uçucu yağından 4 kat etkili olduğu ve *E. coli*'ye karşı hafif antibakteriyel etki gösterdiği belirlenmiştir. Her iki uçucu yağın da *K. pneumoniae* ve *P. aeruginosa*'ya karşı inaktif olduğu görülmüştür. Ekstre ve alt ekstrelerden hiçbirisi mantarlara karşı etki

göstermemiştir. Uçucu yağların ikisi de *C. albicans* ve *C. parapilosis*'e karşı en yüksek, *A. fumigatus*'a karşı en düşük fungustatik etkiyi göstermiştir. Araştırma *B. tripartita*'nın mikrobiyal enfeksiyonlara karşı kullanımını ve ilaç ve koruyucu ajan olarak kullanılabileceğini doğrulamıştır (Tomczykowa ve ark., 2008).

Puebla'dan (Meksika) toplanan *B. squarrosa* bitkisinin gövde, yaprak ve çiçekleri ayrılarak, oda sıcaklığında hekzan, etil asetat ve metanol ekstraktları hazırlanmıştır. Hekzan ekstraktlarında fototoksik bileşikler olan poliasetilenler ve tiyofenlerin varlığı, ince tabaka kromatografisi ve ultraviyole spektrometresi ile tespit edilmiştir. Ekstraktların antibakteriyel etkisi *Bacillus subtilis* ve *Escherichia coli*'ye karşı halojen lamba kullanılarak test edilmiştir. *E. coli*'ye karşı çiçeklerden hazırlanan hekzan ekstresi % 71,43 inhibisyonla en yüksek aktiviteyi göstermiştir. *B. subtilis*'e karşı etil asetat ve metanol ekstresi benzer seviyede etki gösterirken hekzan ekstresi en düşük etkiyi göstermiştir (Perez-Amador ve ark., 2008).

2009 yılında yapılan bir çalışmada, *B. pilosa* var. *radiata* bitkisinin köklerinin sulu, metanollü ve asetonlu ekstraktlarının Gram-pozitif bakteriler olan *Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis*, *Bacillus cereus*, *Micrococcus kristinae*, *Streptococcus faecalis*, ve Gram-negatif bakteriler olan *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Shigella flexneri*, *Klebsiella pneumoniae* ve *Serratia marcescens*'e karşı antibakteriyel etkileri araştırılmıştır. Metanol ekstresinin bütün gram-pozitif ve gram-negatif bakterilere karşı aktif olduğu, sulu ekstrenin bakterilerden hiçbirine karşı etki göstermediği, aseton ekstresinin ise *S. aureus*, *S. epidermidis*, *E. coli* ve *K. pneumoniae*'ye karşı antibakteriyel etki gösterdiği bulunmuştur. Bitkinin kökü üzerinde yapılan bu çalışma geleneksel tıpta tüm bitkinin mikrobiyal

enfeksiyonlara karşı kullanımını desteklemiştir (Ashafa ve Afolayan, 2009).

B. pilosa var. *radiata* bitkisinin köklerinden hazırlanan su, metanol ve aseton ekstraktlarının *Aspergillus niger*, *A. flavus*, *Penicillium notatum* ve *Candida albicans*'a karşı antifungal aktivitelerinin araştırıldığı bir çalışmada üç ekstrenin de *A. flavus*'a karşı çok zayıf *A. niger*'e karşı iyi derecede aktivite gösterdiği, *P. notatum*'un büyümesini ise en düşük konsantrasyonda (0,1 mg/ml) bile % 100 durdurduğu görülmüştür. *C. albicans*'a karşı ise metanol ekstresinin 10 mg/ml dozu hariç diğer ekstraktlar ve dozları antifungal etki göstermemiştir (Ashafa ve Afolayan, 2009).

2010 yılında *B. cernua* L. bitkisinin antifungal etkisinin araştırıldığı bir çalışmada, bitkinin kurutulmuş topraküstü kısımlarından su distilasyonu ile uçucu yağ elde edilmiş, uçucu yağ sulu fazdan koroform ile çekilmiş ve susuz sodyum sülfatla kurutulmuştur. Kloroform uçurulduktan sonra uçucu yağdan kolon kromatografisi yardımıyla aromatik hidrokarbon yapısındaki PHT izole edilmiştir. PHT'nin antifungal etkisi mikrodilüsyon yöntemi ile *Candida* türlerinin 104 suşu üzerinde (*Candida albicans*, *C. krusei*, *C. tropicalis*, *C. guilliermondii*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata*, *C. rugosa*, *C. inconspicua* türlerinin suşları) ve 16 Basidiomycetes suşu üzerinde (*Cryptococcus neoformans*, *C. albidus*, *Trichosporon cutaneum*, *Rhodotorula glutinis* türlerinin suşları) araştırılmıştır. PHT araştırılan suşlara karşı kaydadeğer ölçüde antifungal etki göstermiş olup, *Candida* türleri için Minimum İnhibitör Konstrasyon (MİK) 12,5-50 µg/ml ve Basidiomycetes suşları için MİK 12,5-100 µg/ml olarak bulunmuştur (Rybalchenko ve ark., 2010).

Kahire'den (Mısır) toplanan *B. pilosa* bitkisinin toprak üstü kısımlarından endofitik bir mantar olan *Botryosphaeria rhodina* izole edilmiştir. Mantarın etil asetat ekstresinin agar difüzyon testi sonucunda *Sporobolomyces cerevisiae*, *Candida albicans*, *Penicillium notatum*, *Penicillium avellanea* ve *Aspergillus terreus* suşlarına karşı anlamlı antifungal aktivite gösterdiği bulunmuştur. Etil asetat ekstresinden aktivite yönlendirmeli fraksiyonlama ile botriorhodin A, B, C ve D izole edilmiştir. Botriorhodin A ve B'nin patojenik mantarlar olan *A. terreus* (MİK 26,03 µM ve 49,70 µM) ve *Fusarium oxysporum*'a (MİK 191,60 µM ve 238,80 µM) karşı antifungal aktivite gösterdiği anlaşılmıştır (Abdou ve ark., 2010).

Adedapo ve arkadaşlarının 2011 yılında yaptığı bir çalışmada *B. pilosa* bitkisinin yapraklarından hazırlanan aseton, metanol ve su ekstresinin gram pozitif bakterilerden *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Micrococcus kristinae*, *Streptococcus pyrogens* ile gram negatif bakterilerden *Escherischia coli*, *Salmonella pooni*, *Serratia marcescens*, *Pseudomonas aeruginosa* ve *Klebsiella pneumoniae*'ye karşı antibakteriyel etkisi araştırılmıştır. Aseton ekstresi *P. aeruginosa* ve *K. pneumoniae* hariç tüm mikroorganizmalara karşı aktif bulunmuştur. Metanol ekstresi *B. cereus*, *M. kristinae*, *S. pyrogens*, *E. coli* ve *S. marcescens*'e karşı etkili bulunmuştur. Sulu ekstre ise *S. pyrogens* hariç tüm gram pozitiflere ve gram negatiflerden *S. marcescens*'e karşı antibakteriyel etki göstermiştir (Adedapo ve ark., 2011).

B. tripartita L.'nin köklerinden elde edilen uçucu yağın bileşiminin ve antifungal ve antibakteriyel aktivitelerinin araştırıldığı bir çalışmada, su distilasyonu ile elde edilen uçucu yağ GC-MS ile incelenmiş, uçucu yağın 8 Gram-pozitif, 11 Gram-negatif bakteri ve 10 fungal suş

üzerinde antibakteriyel ve antifungal aktiviteleri araştırılmıştır. Köklerden elde edilen uçucu yağın kuvvetli antifungal etki gösterdiği belirlenmiştir (Tomczykowa ve ark., 2011).

2012’de Japonya’da yapılan bir çalışmada, *B. pilosa*’nın *Herpes simplex* virüsüne (HSV) karşı etkisi araştırılmıştır. Bitkinin toprak üstü kısımları kaynar su ile ekstre edilmiş ve püskürtmeli kurutucu (spray dryer) ile kurutularak kahverengi bir toz elde edilmiştir. Elde edilen ekstre HSV-1 ve HSV-2 virüslerine karşı *in vivo* ve *in vitro* olarak test edilmiş ve her ikisine karşı virüsidal etki gösterdiği saptanmıştır. Çalışmalar *B. pilosa* ekstresinin virüsün hücre içine girişini engellediğini ve hücre içindeki viral replikasyonu etkileyerek biyolojik sentezini inhibe ettiğini göstermiştir (Nakama ve ark., 2012).

1.6.7. Antihipertansif Aktivite

2001 yılında yayınlanan bir çalışmada, *B. pilosa* bitkisinin yapraklarının sulu ekstresinin (150-350 mg/kg) ve metilen klorür ekstresinin (150-300 mg/kg) fruktoz-nedenli hipertansif sıçanlar üzerindeki etkisi araştırılmıştır. Wistar erkek sıçanların yiyecek ve sıvı tüketimi, sistolik kan basıncı, plazma glukoz, insülin, kolesterol, trigliserit ve kreatinin seviyeleri ölçülmüştür. Altı hafta boyunca fruktoz ile beslenme, sıçanlarda hipertansiyon ve hiperinsülinemiye neden olmuş, plazma trigliserit seviyesini yükseltmiştir. Ekstreler sıçanlara gastrik entübasyonla uygulanmıştır. Su ve metilen klorür ekstresinin yüksek kan basıncını ve hipertrigliseridemiye tersine çevirdiği, fakat plazma insülin ve glukoz seviyesini etkilemediği görülmüştür. Ekstrelerin yüksek dozlarının plazma kreatinin seviyesini düşürdüğü, plazma kolestrol seviyesinde ise artışa neden olduğu gözlenmiştir. Sonuçlar *B. pilosa* ekstrelerinin hipotansif

etkisinin insülin duyarlılığı ile ilişkili olmadığını göstermiştir (Dimo ve ark., 2001).

B. pilosa yapraklarının nötr ekstresinin hipotansif ve kardiyak etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada, kurutulmuş yapraklar metanol-metilen klorür (1:1) karışımı ile 48 saat süreyle maserasyondan sonra NaOH ve HCl ile nötralize edilerek ekstre hazırlanmıştır. Ekstre 10, 20 ve 30 mg/kg dozlarda intravenöz olarak normotansif, spontan (kendiliğinden) hipertansif ve tuz-nedenli hipertansif sıçanlara uygulanmıştır. *B. pilosa* ekstresi sistolik kan basıncını normotansif sıçanlarda % 18,26, % 42,5, % 30, spontan hipertansif sıçanlarda % 25,77, % 38,96, % 28,64, tuz-nedenli hipertansif sıçanlarda ise % 27, % 34,13, % 18,73 oranlarında düşürmüştür. Kalp atım hızını ise 20 ve 30 mg/kg dozda sırasıyla % 23,68 ve % 61,18 oranında azaltmıştır. Kalbin kasılma gücü ise sadece 30 mg/kg dozda etkilenmiştir. Sonuçlar, *B. pilosa*'nın hipotansif etkisinin birinci nedeninin kalbin pompalama etkinliğinden, ikinci nedeninin ise vazodilatasyondan ileri geldiğini göstermiştir (Dimo ve ark., 2003).

B. pilosa bitkisinin uzun süreli antihipertansif etkisinin vazodilatasyondan kaynaklandığı düşünülmektedir. Bu hipotezi değerlendirmek için 2005 yılında yayınlanan bir çalışmada, bitkinin yaprakları metanol:metilen klorür (1:1) karışımında 48 saat süreyle masere edilmiş, NaOH ve HCl kullanılarak nötral *B. pilosa* ekstresi hazırlanmıştır (NBp). Ekstre *in vitro* olarak KCl veya norepinefrin ile kasılmış izole sıçan aortu üzerinde denenmiştir. NBp (0,25-1,5 mg/ml) KCl ile kasılmış aort üzerinde konsantrasyona bağlı olarak artan (% 25-% 105) gevşeme göstermiştir. Norepinefrine bağlı kasılmalar üzerinde 1,5 mg/ml konsantrasyonda uygulanan ekstre % 88 gevşeme meydana getirmiştir. İndometazin veya pirilamin

maleatın düşük dozlardaki varlığı bitki ekstresiyle sağlanan gevşeme yanıtını inhibe etmiştir. Bitki ekstresi dinlenme halindeki aortun tonusunu düşürmüş, KCl nedenli kasılımı 1,5 mg/ml dozda % 90 oranında, CaCl₂ nedenli kasılımı 0,75 mg/ml dozda % 95 oranında baskılamıştır. Sonuçlar *B. pilosa*'nın nötral ekstresinin vazodilatör etkisinin olduğunu ve bir kalsiyum antagonisti gibi davrandığını göstermiştir (Nguelefack ve ark., 2005).

1.6.8. Antipiretik Aktivite

Sundararajan ve arkadaşlarının yaptıkları bir çalışmada, *B. pilosa* L. bitkisinin tamamı *n*-hekzan, kloroform ve metanol ile ekstre edilerek E1, E2, E3 şeklinde kodlanmıştır. Ekstreler etil asetat, aseton ve su kullanılarak kolon kromatografisi ile fraksiyonlanmıştır (F1, F2, F3). Bütün ekstre ve fraksiyonların antipiretik aktivitesinin araştırıldığı çalışmada E3 en iyi antipiretik aktiviteyi göstermiştir. Antipiretik aktivite için referans olarak parasetamol kullanılmıştır. Bitkinin metanol ekstresinde de tavşan pirojen testinde kıyaslanabilir antipiretik aktivite görülmüştür (Sundararajan ve ark., 2006).

1.6.9. İmmünomodulator Aktivite

2004 yılında Abajo ve arkadaşları tarafından yayınlanan bir çalışmada, *B. pilosa*'nın toprak üstü kısımlarının sulu infüzyonunun immünomodulator etkisi araştırılmıştır. İnfüzyon kandaki (*Escherichia coli* ve *Salmonella abortus equi*.'den elde edilmiş lipopolisakkaritle uyarılmış ve uyarılmamış) sitokin üretimini artırmıştır. Ayrıca eritrositleri klorpromazinin fototoksik etkisinden koruduğu görülmüştür. *B. pilosa*'nın immun parametreleri

düzenleme etkisi, kronik viral enfeksiyon, tüberküloz, AIDS ve kanser gibi çeşitli hastalıklarda kullanımının klinik olarak anlamlı olabileceğini düşündürmüştür (Abajo ve ark., 2004).

B. pilosa Asya, Amerika ve Afrika'da halk arasında bakteriyel enfeksiyonlara karşı veya immunomodulator olarak kullanılmaktadır. Chiang ve arkadaşlarının 2007 yılında yaptıkları bir çalışmada, *B. pilosa*'nın sulu ekstresinin, *n*-butanol fraksiyonunun ve izole edilen flavonoit yapısındaki iki bileşiğin (sentaurein ve aglikonu sentaureidin) interferon gama (IFN- γ) salınımının uyarılması üzerindeki etkisi araştırılmıştır. Pozitif kontrol olarak Fitohemaglutinin (PHA-1 $\mu\text{g/ml}$) kullanılmıştır. Sulu ekstre (500 $\mu\text{g/ml}$) ve butanol fraksiyonu (500 $\mu\text{g/ml}$), sentaurein (100 $\mu\text{g/ml}$) ve sentaureidin (2 $\mu\text{g/ml}$) IFN- γ düzenleyici aktiviteyi artırmıştır (Chiang ve ark., 2007).

1.6.10. Antikanser ve Antitümör Aktivite

2001 yılında yayınlanan bir çalışmada *B. pilosa* L. var. *minor* (Blume) Sherff ve *Houttuynia cordata* Thunb. bitkilerinin tamamından sıcak su ile hazırlanan ekstrelerinin L1210, U937, K562, Raji ve P3HR1 hücrelerine karşı antilösemik etkisi 5-floro urasil ile kıyaslanarak incelenmiştir. *B. pilosa* var. *minor* ekstresinin bu beş lösemi hücrelerine karşı IC_{50} değerleri 145 ve 586 $\mu\text{g/ml}$ aralığında bulunmuştur. *B. pilosa*'nın lösemi hücrelerine karşı etkisinin *H. cordata*'dan daha yüksek olduğu gözlenmiştir. Sonuçlar *B. pilosa*'nın lösemi tedavisinde tıbbi bitki olarak kullanılabileceğini düşündürmüştür (Chang ve ark., 2001).

Sundararajan ve arkadaşlarının yayınladıkları bir çalışmada, antipiretik aktivitenin yanında antikanser aktivite de incelenmiştir. *B. pilosa* bitkisinin tamamından hazırlanan hekzan ekstresi en yüksek antikanser aktiviteyi göstermiştir. Bitkinin metanol ekstresinde de He-la hücrelerine karşı *in vitro* olarak kayda değer sitotoksik aktivite görülmüştür (Sundararajan ve ark., 2006).

B. pilosa bitkisi Brezilya geleneksel tıbbında kansere ait durumların tedavisinde kullanılmaktadır. 2008 yılında yayınlanan bir çalışmada bu türün toprak üstü kısımlarından hazırlanan ekstrelerin antitümör etkisi araştırılmıştır. Sulu-etanollü (6:4) ekstre ve etanol-su (9:1) ekstresinden hareketle hazırlanan kloroform, etil asetat ve metanol ekstrelerinin sitotoksik aktivitesi, deniz (tuzlu su) karidesi testi, hemolitik analiz, neutral red uptake (NRU) ve tetrazolyum tuzu deneyleri ile incelenmiştir. Antiproliferatif etki ise ekstre ve fraksiyonların Ehrlich asit tümörü taşıyan Balb/c farelerine tümör oluşumundan 24 saat sonra başlayarak 9 gün boyunca intraperitoneal olarak 150 ve 300 mg/kg dozda uygulanmasıyla incelenmiştir. Sonuçta kloroform ekstresinin en yüksek antitümör ve sitotoksik etkiyi gösterdiği, Ehrlich asit tümörü taşıyan farelerin yaşam süresini uzattığı, serum laktat dehidrogenaz aktivitesini ve tümör sıvısının glutatyon (GSH) seviyesini düşürdüğü belirlenmiştir (Kwiecinski ve ark., 2008).

Kumari ve arkadaşlarının çalışmasında, Hindistan'dan toplanan *B. pilosa* bitkisinin yaprakları Soxhlet cihazında hekzan, kloroform, etil asetat ve metanol ile ekstre edilmiştir. Ekstreler ve hekzan ekstresinden izole edilen PHT bileşiğinin insan oral (KB), karaciğer (HepG), kolon (CaCO₂) ve göğüs (MCF-7) hücre dizilerine karşı

antikanser etkisi *invitro* yöntemle araştırılmıştır. Hekzan ekstresi ve PHT'nin ümit vaat edici olduğu bulunmuştur (Kumari ve ark., 2009).

B. pilosa bitkisinin toprak üstü kısımlarından izole edilen endofitik bir mantar olan *Botryosphaeria rhodina*'nın etil asetat ekstresi çeşitli kanser hücrelerine karşı güçlü sitotoksik ve antiproliferatif etki göstermiştir. Etil asetat ekstresinden izole edilen botriorhodin A ve B'nin He-la hücre serilerine karşı ortadan zayıfa değişen sitotoksik etki gösterdiği saptanmıştır (Abdou ve ark., 2010).

2011 yılında yapılan bir çalışmada, *B. pilosa*'nın toprak üstü kısımlarından hazırlanan etanol-su (9:1) ekstresi ve süper kritik sıvı ekstresi antitümör aktivite açısından incelenmiştir. İki ekstrenin de doza bağlı olarak MCF-7 hücrelerini öldürdüğü ve süper kritik sıvı ekstresinin daha yüksek sitotoksik aktivite gösterdiği belirlenmiştir. Süper kritik sıvı ekstresinin 24 saatteki IC₅₀ değeri 437 (428-446) µg/l bulunmuş ve 48 saat içinde bu değer 291 (282-299) µg/l'ye düşmüştür. *In vitro* olarak etanol-su ekstresi 160 µg/l dozda, süper kritik sıvı ekstre ise 40 µg/l dozda DNA yarılmasını başlatmıştır. Süper kritik sıvı ekstredeki poliasetilenik bileşikler İTK ile tespit edilmiştir. Antitümör aktivitenin araştırılması için Ehrlich asit tümörü taşıyan fareler kullanılmıştır. Hayvanlar normal, negatif kontrol, pozitif kontrol (doksorubisin 0,06 mg/kg), etanol-su ekstresi test ve süper kritik sıvı ekstre test grubu olmak üzere 5 gruba ayrılmıştır. Dokuz günlük tedaviden sonra hayvanlar rastgele seçilerek vücut ağırlığı, abdomen çevresi, asidik sıvı ve tümör hücrelerinin hacmi, yaşayan ve yaşamayan tümörlü hücre sayısı, ortalama hayatta kalış süresi ve artan hayat süresi faktörleri açısından değerlendirilmiştir. İki ekstre de antitümör aktivite göstermiş olup, süper kritik sıvı ekstrenin asidik sıvı ve tümör

hücrelerinin hacmini daha fazla indirgemesine bağlı olarak daha yüksek ortalama hayatta kalış süresi (17 gün) ve artan hayat süresine (% 31) sebep olduğu tespit edilmiştir. Sonuçlar *B. pilosa*'da bulunan poliasetilenik bileşiklerin süper kritik teknoloji kullanılarak yeni antikanser ilaçların geliştirilmesinde lider olarak rol oynayabileceğini göstermiştir (Kwiecinski ve ark., 2011a).

1.6.11. Antimalaryal Aktivite

B. pilosa Brezilya'da halk arasında malarya ateşi ve karaciğer hastalıklarının tedavisinde kullanılmaktadır. 1997 yılında yayınlanan bir çalışmada, aralarında *B. pilosa*, *B. frondosa*, *B. tripartita*, *B. ferulaefolia*, *B. bipinnata*, *B. maximovicziana*, *B. campylotheca*, *B. bitternata* ve *B. parviflora*'nın da olduğu 41 farklı türün antimalaryal etkisi araştırılmıştır. *B. pilosa*'nın tüm kısımlarından hazırlanan etanol ekstraktları ile gövde, yaprak ve köklerden hazırlanan eter, etanol ekstraktları ve kloroform, *n*-butanol fraksiyonları 50 µg/ml dozda *Plasmodium falciparum*'un gelişimini *invitro* olarak % 90 inhibe etmiştir. Fareler üzerindeki *invivo* çalışmalarda, fraksiyonların *P. berghei* kaynaklı parazitemiyi (kanda parazit bulunması) kısmi olarak azalttığı gözlemlenmiştir. Çalışmalarda kullanılan 9 *Bidens* türünden 7'sinin etanol ekstraktlarının parazitlerin gelişimini % 65 ila % 91 oranında durdurduğu tespit edilmiştir. HPLC çalışmaları *Bidens* türlerinin fenil asetilen bileşiklerini ve flavonoidleri içerdiğini göstermiştir. *B. pilosa* köklerinden hazırlanan kloroform fraksiyonunun *in vitro* çalışmalarda parazit büyümesini % 86 inhibe ettiği ve bu fraksiyonun majör bileşiğinin 1-fenil-1,3-din-5-en-7-ol-asetat olduğu belirlenmiştir. Sonuçlar alifatik asetilen yapısında bileşikler içeren *Bidens* türlerinin çok etkili olduğunu, hiç asetilenik bileşik içermeyen *B. parviflora*'nın inaktif olduğunu ve 3 adet asetilen

içeren *B. bitternata*'nın ise alt sınırdaki aktif olduğunu göstermiştir (Brandao ve ark., 1997).

Brezilya'da antimalaryal olarak kullanılan *B. pilosa* bitkisinin köklerinden perkolasyonla hazırlanan % 80'lik etanol ekstresinin *Plasmodium falciparum*'a karşı *in vitro* olarak aktif olduğu, bu etkinin poliasetilenler ve flavonoidlerden kaynaklandığı daha önceki çalışmalarda gösterilmiştir. Oliveira ve arkadaşlarının 2004 yılında yayınladığı bir çalışmada, bu ekstre eter ve eter:metanol (1:1) çözücülerini kullanılarak kolon kromatografisi yardımıyla poliasetilenler ve flavonoidlerden zengin fraksiyonlar elde edilmiştir. Ekstre ve fraksiyonlar HPLC/DAD analizi ve *in vivo* testler ile değerlendirilmiştir. Etanol ekstresi HPLC ile incelendiğinde kersetin-3-3'-dimetoksi-7-O-ramnoglukopiranoz ve asetilen 1-fenil-1,3-din-5-en-7-ol-asetat piklerinin varlığı tespit edilmiştir. Eter fraksiyonunda flavonoidler bulunmamıştır, eter:metanol karışımında ise poliasetilenler tespit edilmiştir. Etanol ekstresi *in vivo* testlerin 5. gününde % 36, 7. gününde % 29 oranında parazitemiyi azaltmıştır. Eter:metanol fraksiyonu parazitemiyi 5. günde % 36 azaltırken, 7. günde etkisiz bulunmuştur. Etanol ekstresi uygulanan hayvanların fraksiyonların uygulandığı hayvanlara göre hayatta kalma oranının daha yüksek olduğu görülmüştür. Sonuçlar etanol ekstresinin *in vivo* aktivitesinin poliasetilenler ve flavonoidlerden kaynaklandığını göstermiştir (Oliveira ve ark., 2004).

2004 yılında Brezilya'da yapılan bir çalışmada, yabani ve kültüre alınmış *B. pilosa* bitkilerinin köklerinden hazırlanan etanol ekstraktları *P. berghei*'ye karşı *in vivo* ve *P. falciparum*'a karşı *in vitro* olarak test edilmiştir. Humuslu topraklarda kültüre alınmış olan bitkiler etkili bulunmuştur. Fakat en yüksek antimalaryal etki yabani bitkilerin ekstresinde görülmüştür. Aynı çalışmada İTK analizleri sonucu bütün

ekstrelerde değişik miktarlarda flavonoit yapısında bileşikler bulunduğu anlaşılmış olup etkinin bu bileşiklerden ileri geldiği düşünölmüştür (Andrade-Neto ve ark., 2004).

Bir başka çalışmada, *B. pilosa* bitkisinin yaprakları soxhlet cihazında hekzan, kloroform, etil asetat ve metanol ile ekstre edilmiştir. Ekstreler ve hekzan ekstresinden izole edilen fenil-1,3,5-heptatrin bileşiğinin antimalaryal etkisi *Plasmodium falciparum*'a (NF54 zincir) karşı *in vitro* olarak test edilmiştir. Hekzan ekstresi ve fenil-1,3,5-heptatrinin ümit vaat edici olduğu bulunmuştur (Kumari ve ark., 2009).

1.6.12. Karaciğer Üzerine Etkileri

Zhong ve arkadaşlarının 2007 yılında yayınladığı bir çalışmada, *B. bipinnata*'nın toplam flavonoitlerinin farelerde CCl₄ ile meydana getirilmiş karaciğer hasarına karşı hepatoprotektif etkisi araştırılmıştır. Bitkinin kurutulmuş toprak üstü kısımları % 80'lik etanolle ekstre edilip çeşitli işlemlerden sonra flavonoit içeren ve TFB olarak adlandırılan ekstre hazırlanmıştır. TFB'nin 50, 100 ve 200 mg/kg dozlarda 7 gün boyunca oral olarak uygulanmasıyla yükselmiş olan serum transaminazları alanin aminotransferaz ve aspartat aminotransferazı düşürdüğü, CCl₄'ün karaciğerde neden olduğu morfolojik değişimleri azalttığı, lipid peroksidasyonunu inhibe ettiği ve antioksidan enzimler olan SOD ve GSHPx artırdığı görölmüştür. Çalışmanın sonucu *B. bipinnata*'da bulunan flavonoitlerin önemli ölçüde hepatoprotektif olduğunu ve bu etkinin antioksidan özelliklerinden kaynaklandığını göstermiştir (Zhong ve ark., 2007).

2009 yılında yayınlanan bir çalışmada, *B. pilosa* bitkisinin yapraklarından hazırlanan sulu ekstrenin genç sıçanların koledok kanalı hasara uğratarak meydana getirilmiş kolestatik karaciğer hastalığı üzerindeki etkisi 10 hayvandan oluşan 4 grup üzerinde 21 günlük çalışmayla araştırılmıştır. Ekstrenin karaciğer fonksiyonlarını koruduğu, karaciğer hücrelerinde nekrozu ve fibrozisi azalttığı görülmüştür. *B. pilosa* sulu ekstresinin kronik obstruktif kolestaz nedenli karaciğer hasarına karşı fitoterapötik olarak kullanılabileceği düşünülmüştür (Suzigan ve ark., 2009).

1.6.13. Diüretik Aktivite

B. odorata'nın topraküstü kısımları Meksika halk tıbbında böbrek hastalıklarının tedavisinde kullanılmaktadır. Eylül ayında Meksika'dan toplanan *B. odorata* bitkisinin toprak üstü kısımları gölgede kurutularak toz edilmiş ve distile su ile ekstre edilmiştir. Diüretik etki 41 ve 166 mg/kg dozda sulu ekstrenin 2 mg/kg dozdaki furosemite karşı dişi sıçanlara oral yoldan verilerek test edilmesiyle araştırılmıştır. Sulu ekstrenin her iki dozu ve furosemit idrarla sodyum, potasyum ve su atılımını kaydadeğer ölçüde artırmıştır. Bu artışın doza bağımlı olduğu, ekstrenin yüksek dozunun sodyum ve su atılımını furosemitten daha fazla artırdığı, potasyum atılımını ise furosemite göre daha az artırdığı görülmüştür. Sonuçlar *B. odorata*'nın sulu ekstresinin diüretik kullanımını doğrulamıştır (Camargo ve ark., 2004).

1.6.14. Diğer Etkiler

1980 yılında yayınlanan bir çalışmada aralarında *B. pilosa* bitkisinin de bulunduğu 44 bitkinin etanol ekstrelerinin *Escherichia*

coli, *Saccharomyces cerevisiae* ve *Candida albicans*'a karşı antibiyotik ve fototoksik etkileri araştırılmıştır. *B. pilosa*'nın aken, çiçek, yaprak ve kök ekstrelerinin *C. albicans*'a karşı fototoksik ve antibiyotik aktivitesinin bulunduğu, gövde ekstresinin ise herhangi bir aktivite göstermediği belirlenmiştir (Wat ve ark., 1980).

B. pilosa L. Kamerun'un güney bölgelerinde halk arasında çeşitli kalp rahatsızlıklarının tedavisinde ve güney Amerika'da yüksek kan basıncının düşürülmesinde ampirik olarak kullanılmaktadır. Dimo ve arkadaşlarının 1998 yılında yayınladıkları bir çalışmada, *B. pilosa*'nın güneşte kurutulmuş yapraklarından hazırlanan sulu ekstrenin, sıçan aort şeritlerinde KCl ve norepinefrin ile oluşturulmuş kasılmalara karşı etkisi değerlendirilmiştir. Ekstrenin (8 mg/ml) her iki kasılma tipini de doza bağlı olarak gevşettiği, norepinefrin-nedenli kasılmalarda ise daha dikkate değer etki gösterdiği belirtilmiştir. Sonuçlar gevşetici etkinin ekstraselüler Ca^{+2} 'nin hücre içine akışının blokajı ile olduğunu düşündürmüştür (Dimo ve ark., 1998).

1999 yılında yayınlanan, *B. pilosa* yapraklarının metanol ekstresi ve bu ekstreden hareketle izole edilen poliasetlenik yapıda bir bileşiğin (2-O- β -D-glukoziltrideka-11E-en-3,5,7,9-tetrain-1,2-diol) immunosupresif etkisinin *in vivo* ve *in vitro* yöntemlerle araştırıldığı bir çalışmada, ekstrenin immunosupresif etkisinin bulunduğu ve bu etkinin içerdiği poliasetlenik bileşikten kaynaklandığı belirlenmiştir (Pereira ve ark., 1999).

B. parviflora bitkisinden izole edilen poliasetlenik glukozit yapısında 5 bileşiğin (bidensineozit A₁, A₂, B, C, 3-deoksibidensineozit B) antihistaminik etkisinin araştırıldığı bir çalışmada, bileşiklerin lipopolisakkaritlerle ve interferon- γ ile aktive edilmiş fare makroajlarında (RAW 264,7) nitrik oksit (NO) üretimini ve sıçan mast

hücrelerinde antijen-antibadi reaksiyonu ile uyarılmış histamin salınımını inhibe ettiği gözlenmiştir (Wang ve ark., 2001).

Wang ve arkadaşlarının 2003 yılında yayınladığı bir çalışmada, *B. parviflora* bitkisinden izole edilen 3 sükroz esteri ve 1 adet lignan yapısında bileşiğin sıçan mast hücrelerinin antijen-antibadi reaksiyonu sonucu oluşan histamin salınımını ve fare RAW 264.7 makrofaj benzeri hücrelerinin PGE₂ üretimini inhibe ettiği bildirilmiştir (Wang ve ark., 2003).

2004 yılında yayınlanan bir çalışmada, *B. pilosa* var. *radiata* bitkisinin taze tüm kısımlarından hazırlanan % 70'lik etanol ekstresi, etil asetat ve *n*-butanol fraksiyonları ve izole edilen iki poliasetilenik bileşiğin antianjiyogenik etkisi anti-hücre proliferasyon, anti-tüp formasyon ve hücre migrasyon deney yöntemleri kullanılarak araştırılmıştır. Etil asetat fraksiyonunun HUVEC (human umbilical vein endothelium cells) hücrelerine karşı kaydadeğer anti-hücre proliferasyon ve anti-tüp formasyon aktivitesi gösterdiği belirlenmiştir. Etil asetat fraksiyonundan biyolojik aktivite yönlendirmeli fraksiyonlama ile izole edilen poliasetilen yapıda 1,2-dihidroksitrideka-5,7,9,11-tetrain (1) ve 1,3-dihidroksi-6 (*E*)-tetradeken-8,10,12-trin (2) bileşiklerinin HUVEC proliferasyonuna karşı yüksek oranda spesifik ve ciddi ölçüde (IC₅₀ değerleri sırasıyla 2,5 ve 0,375 µg/ml) aktivite gösterdiği saptanmıştır. 1 numaralı bileşiğin HUVEC tüp formasyonunun önlenmesinde daha güçlü olduğu görülmüştür. Etil asetat fraksiyonunun ve izole edilen bileşiklerin güçlü anti-anjiyogenik aktivite gösterdiği belirlenmiştir (Wu ve ark., 2004).

2006 yılında Wang ve arkadaşlarının yayınladığı bir çalışmada *B. parviflora* bitkisinin tüm kısımlarının ekstre edilmesiyle izole edilen iki adet neolignan glukozit yapısında bileşiğin peritoneal mast

hücrelerinden antijen-antibadi reaksiyonuyla indüklenmiş histamin salınımını inhibe ettiği gözlemlenmiştir (Wang ve ark., 2006).

Wang ve arkadaşlarının 2007 yılında yayınladığı bir çalışmada, *B. parviflora* bitkisinin tüm kısımları kullanılarak % 60'lık etanolle hazırlanan ekstreden ve hekzan, etilasetat, *n*-butanol fraksiyonlarından hareketle kalkon, flavanon ve auron yapısında 9 adet bileşik izole edilmiştir. İzole edilen bileşiklerin antihistaminik etkileri, sıçanların peritoneal eksuda hücrelerinden antijen-antibadi reaksiyonu ile indüklenmiş histamin salınımının inhibe etme yeteneği ve lipopolisakkarit ve fare rekombinant interferon- γ ile aktive edilmiş fare (murine) makrofaj benzeri hücre serileri RAW 264.7'nin NO üretimini inhibe etme yeteneği incelenerek araştırılmıştır. Kalkon ve auron glukozitlerinin antihistaminik etkisinin aglikon hallerinden daha kuvvetli olduğu ve flavonoidlerin antialerjik veya antienflamatuvar ilaçlarda kullanımıyla ilgili sonraki çalışmalar için umut vaad ettiği bulunmuştur (Wang ve ark., 2007).

Deba ve arkadaşlarının 2007 yılında yayınladığı çalışmada, fungisidal aktivitenin yanında, *B. pilosa* var. *radiata* herbisidal aktivitesi de araştırılmıştır. *Raphanus sativus* ve *Echinochloa crus-galli* bitkileri indikatör olarak kullanılmıştır. Ekstrelerin indikatör bitkilerin büyümesini güçlü şekilde engellediği ortaya çıkmıştır (Deba ve ark., 2007).

2008 yılında yayınlanan bir çalışmada, *B. pilosa* yapraklarının sulu ve etanollü ekstreleri, *in vivo* ve *in vitro* olarak erişkin olmayan dişi sıçanların rahim kasları üzerindeki etkileri araştırılmıştır. Etanollü ekstre sulu ekstrenin biraz üzerinde toksik etki göstermekle birlikte her iki ekstre de zayıf toksisite göstermiştir. Sulu ekstrenin zayıf toksisite göstermesi, östrojenik ve oksitoksik etki göstermesi, geleneksel kullanımını doğrulamakla birlikte doğumu kolaylaştırmak

için uterotonik preparatlarda kullanılabileceğini düşündürmüştür (Frida ve ark., 2008).

1.7. Toksisite Çalışmaları

2011 yılında yayınlanan bir çalışmada *B. pilosa* yaprak ekstresinin (BPLE) akut ve sub-kronik toksisitesi araştırılmıştır. Fitokimyasal analizlerle sekonder metabolitlerin varlığı tespit edilmiştir. Çalışmada *B. pilosa* yapraklarının dekoksasyonu kullanılmıştır. Akut toksisite deneyleri sırasında Wistar sıçanlarından oluşan her bir gruba BPLE'nin tek dozu (500-10,000 mg/kg) ve distile su oral olarak uygulanmıştır. Sub-kronik toksisite deneylerinde ise BPLE (200-800 mg/kg) ve distile su oral yolla 28 gün boyunca uygulanmıştır. Toksisite işaretleri incelenmiş, hayvanların, kan ve organları biyokimyasal ve histolojik çalışmalar için toplanmıştır. Ekstrede tanen, flavonoit, terpen ve kardiyak glukozitlerin varlığı tespit edilmiştir. Deneyler sırasında sıçanlarda ölüm gözlenmemiştir. Kontrol grubu, 400 mg/kg ve 800 mg/kg uygulanan gruplar arasında ortalama vücut ağırlığı artışında düşüş, kontrol ve 400 mg/kg uygulanan gruplar karşılaştırıldığında kalbin relatif organ ağırlığında artış görülmüştür. Kontrol grubu ile kıyaslandığında 800 mg/kg dozlu grupta serum alanin aminotransferaz (ALT), aspartat aminotransferaz (AST) ve gama glutamil transpeptidaz (GGT) seviyelerinde ve 200 mg/kg, 400 mg/kg, 800 mg/kg dozlu gruplarda kardiyak kreatin kinaz (CK-MB) seviyelerinde artış gözlenmiştir. Karaciğer, böbrek ve kalp dokuları incelendiğinde normal durumda oldukları değişim meydana gelmediği görülmüştür. Çalışma sonucunda *B. pilosa* yaprak ekstresinin güvenlik seviyesinin yüksek olduğu anlaşılmıştır (Ezeonwumelu ve ark., 2011).

1.8. Kontrendikasyonları

Bairwa ve arkadaşlarının *B. pilosa* ile ilgili 2010 yılında yayınladığı derlemede bu bitkiye ait bazı kontrendikasyonlardan bahsedilmiştir. Bunlar;

1. Kobaylarda zayıf uterus uyarıcı etki gözlendiğinden hamilelikte kullanılmamalıdır.
2. Kumarin türevi bileşikler içerdiğinden kan inceltici özelliği sahiptir. Varfarin gibi ilaçlarla birlikte kullanılırken hasta dikkatle takip edilmelidir.
3. Bitkinin kan şekerini düşürücü etkisi bulunmaktadır. Diyabet için kullanımı kan şekeri seviyesi düzenli aralıklarla kontrol edilerek doktor kontrolünde olmalıdır.
4. Antihipertansif etkisi nedeniyle hipotansif ilaç kullanan hastalar bitkiyi kullanmadan önce doktora danışmalıdır.

(Bairwa ve ark., 2010)

Yukarıda verilen bilgiler değerlendirildiğinde, dünyada bazı *Bidens* türleri üzerinde kimyasal içerik ve biyolojik aktivite çalışmalarının yapılmış olduğu ancak; Türkiye’de yetişen *Bidens cernua* var. *radiata*, *B. tripartita* ve *B. frondosa* taksonları üzerinde bu konularla ilgili yapılmış herhangi bir çalışma bulunmadığı görülmüştür. Ülkemizde yetişen bu taksonların ekstreleri üzerinde antidiyabetik, antioksidan ve asetilkolinesteraz inhibitör aktivitelerin belirlenmesi, ekstrelerin HPLC profillerinin oluşturulması, söz konusu bitkilerin toprak üstü kısmında bulunan bazı kimyasal bileşiklerin kalitatif ve kantitatif olarak tespit edilmesiyle bilim dünyasına yeni veriler kazandırılması amaçlanmıştır.

2. GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. Gereç:

2.1.1. Bitkisel Gereç

Bu çalışmada aşağıda isimleri ve toplandığı lokaliteler belirtilen bitkilerin gölgede elekler üzerinde kurutulmuş çiçekli toprak üstü kısımları toz edilerek kullanılmıştır.

1. *Bidens cernua* var. *radiata* 21.08.2011 tarihinde Düzce-Gölyaka Efteni Gölü (A3) Kuş gözlem evi iskelesi göl kenarı bataklık sazlık alandan ve Gölyaka Efteni Gölü kıyısı bataklık bölgelerden toplandı. Doç. Dr. Ayşe Mine GENÇLER ÖZKAN tarafından teşhisi yapıldı.
2. *B. tripartita* 20.08.2011 tarihinde Düzce - Yeniçağa parkta göl kenarından ve 06.08.2011 tarihinde Afyon-Eber gölü, Eber köyü sazlığı ile Oğuzhüyüğü arasındaki su yatağının kenarından toplandı. Prof. Dr. Mehmet KOYUNCU ve Doç. Dr. Ayşe Mine GENÇLER ÖZKAN tarafından teşhisi yapıldı.
3. *B. frondosa* 01.09.2011 tarihinde Trabzon-Dereboyu caddesine yakın yol kenarından toplandı. Doç. Dr. Ayşe Mine GENÇLER ÖZKAN tarafından teşhisi yapıldı.

B. frondosa L. Türkiye Flora kitabında (Flora of Turkey and the East Agean Islands) bulunmamakta olup, Kamil Coşkunçelebi (Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi-Trabzon) ve arkadaşları tarafından 2007 yılında tespit edilmiş olup yeni bir kayıt olarak yayınlanmıştır.

Tez konusu olarak seçtiğimiz üç türün örnekleri preslenip kurutulduktan sonra, Ankara Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi Herbaryumuna (AEF) kaldırılmıştır. Herbaryum kayıtları aşağıda belirtilen numaralarla yapılmıştır.

Bidens cernua var. *radiata* : 25995

B. tripartita (Düzce) : 25996

B. tripartita (Afyon) : 25994

B. frondosa : 25993

Çalışmalarımızda miktarının fazla olması nedeniyle Düzce-Yeniçağa'dan toplanan *B. tripartita* kullanılmıştır. Afyon'dan toplanan türün sadece teşhisi yapılmıştır. Tüm türler Ülkü Gökçen İÇÖZ ve Kutluhan İÇÖZ tarafından toplanmıştır.



Şekil 2.1. *B. cernua* var. *radiata* genel görünüş



Şekil 2.2. *B. cernua* var. *radiata* çiçek ve yaprakları



Şekil 2.3. *B. cernua* var. *radiata* herbaryum örneği (genel)



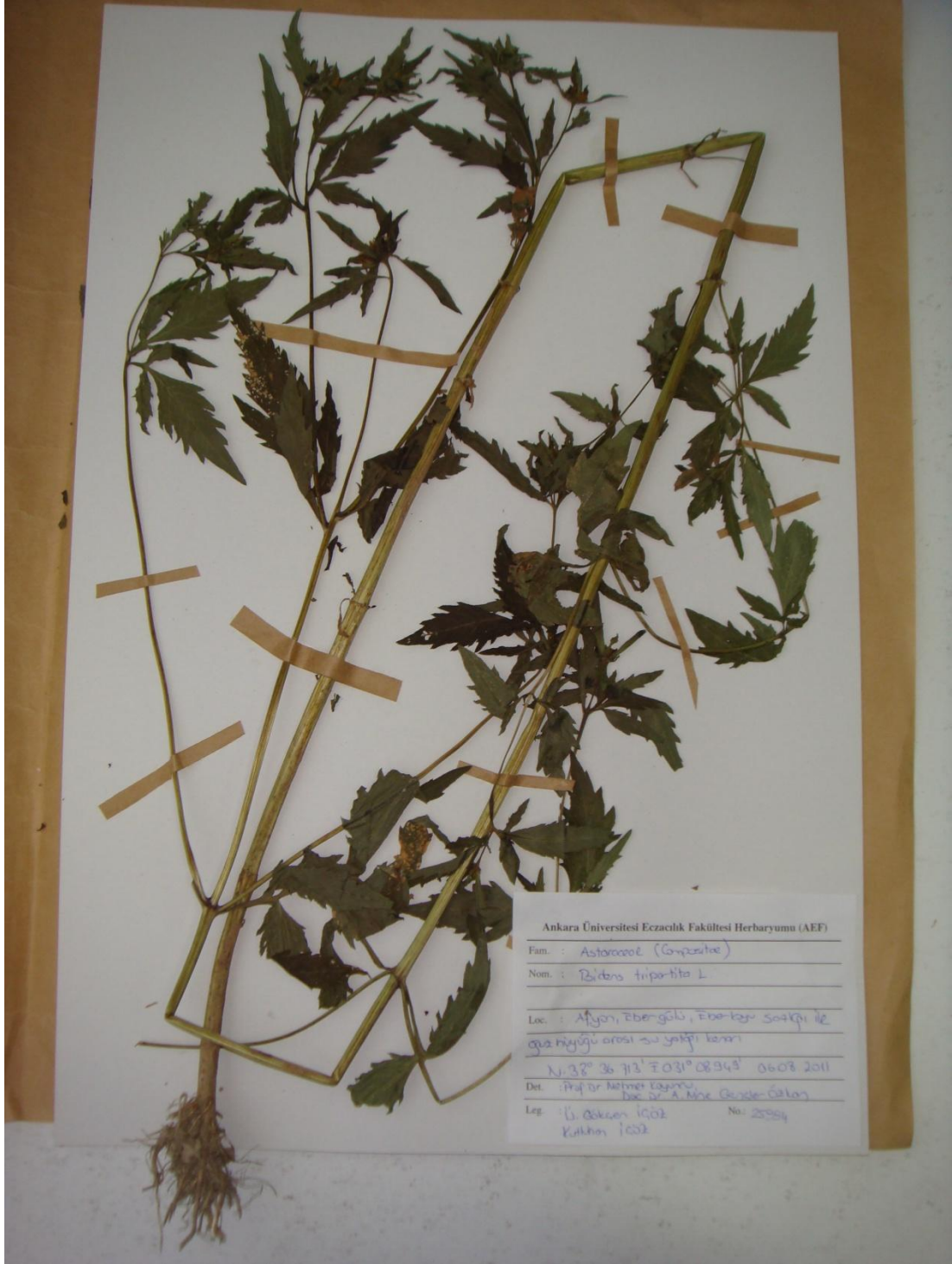
Şekil 2.4. *B. cernua* var. *radiata* herbaryum örneği (çiçek ve yaprak)



Şekil 2.5. *B. tripartita* genel görünüş



Şekil 2.6. *B. tripartita* çiçek ve yapraklar



Şekil 2.7. *B. tripartita* herbarium örneği (Afyon)



Şekil 2.8. *B. tripartita* herbarium örneği (Düzce)



Şekil 2.9. *B. frondosa* genel görünüş



Şekil 2.10. *B. frondosa* çiçek ve yapraklar



Şekil 2.11. *B. frondosa* herbarium örneği (genel)



Şekil 2.12. *B. frondosa* herbaryum örneği (çiçek ve yaprak)

2.2. Yöntem:

2.2.1. Ön Ekstraksiyon

Toplanan materyallerin kimyasal içerik bakımından karşılaştırılabilmesi için sulu ve etanollü ekstraktları hazırlanmıştır. Bu amaçla her bir takson için 10'ar g toz bitki 200 ml su ve 200 ml % 80'lik etanol ile 2'şer kez 2 saat boyunca çalkalanmış, süzölmüş, süzöntöler birleştirilmiş, rotavaporda yoğunlaştırılmış, derin dondurucuda bekletildikten sonra liyofilizatörde kurutulmuştur. Aşağıdaki yöntemle ekstre içerikleri karşılaştırılmıştır.

2.2.2. Ekstre İçeriklerinin İnce Tabaka Kromatografisi (İTK) İle Karşılaştırılması

Küçük ölçekte hazırlanan ekstrelerden Etil asetat:MeOH:Formik asit:Su- 100:11:11:27; CHCl₃:MeOH:Su-61:32:7; oranlarındaki solvan sistemleri ile İTK incelemeleri yapılmış ve etanollü ekstrelerin sulu ekstre içerisinde bulunan tüm maddeleri içerdiği ve madde çeşitliliği bakımından daha zengin olduğunun belirlenmesi nedeniyle, antidiyabetik aktivitenin etanollü ekstreler üzerinden yürütülmesine karar verilmiştir.

2.2.3. Aktivite Tayinleri İçin Ekstre Hazırlanışı

2.2.3.1. Sulu Ekstrelerin Hazırlanışı:

25'er g bitki üzerine 400 ml su eklenerek 2'şer kez 2 saat boyunca çalkalandı. Süre sonunda ekstre süzgeç kağıdından süzüldü. Süzüntüler birleştirildi ve rotavaporda 50°C'nin altındaki sıcaklıkta yoğunlaştırıldı. Derin dondurucuda bekletildikten sonra liyofilizatörde kurutuldu.

2.2.3.1.1. Sulu Ekstrelerin % Verimleri:

Bidens cernua var. *radiata* : % 18,1766

B. tripartita : %19,2089

B. frondosa : %19,4908

2.2.3.2. Etanollü Ekstrelerin Hazırlanışı:

Antidiyabetik aktivitenin tayini için 3 taksondan 100'er g bitki üzerine 1,5 lt % 80'lik etanol eklendi, 24 saat çalkalayıcıda çalkalandı. Tülbentten süzüldü. Artıkların Üzerine 1lt daha % 80'lik etanol eklendi ve 24 saat daha çalkalandı, tülbentten süzüldü. Süzüntüler etanol tamamen uçuncuya kadar rotavaporda 50°C' de yoğunlaştırıldı. Kalan sulu kısım darası alınmış kaplara konup donduruldu ve liyofilize edildi. Kuru ekstrelerin tartımları alındı ve verimleri hesaplandı.

2.2.3.2.1. Etanollü Ekstrelerin % Verimleri:

Bidens cernua var. *radiata* : % 22, 2848

B. tripartita : % 15,6326

B. frondosa : % 17,5721

Etanollü ekstrelerin antidiyabetik aktivite sonuçları değerlendirildiğinde *B. tripartita* taksonunun hem akut hem de subakut denemelerde olumlu netice göstermesi sebebiyle bu taksona ait etanollü ekstrenin çözücü-çözücü ekstraksiyonu ile alt ekstrele ayrılmasına karar verilmiştir. Bu amaçla aşağıdaki ekstraksiyon ve fraksiyonlama metodları uygulanmıştır.

2.2.4. *B. tripartita* Etanol Ekstresinin Fraksiyonlanması

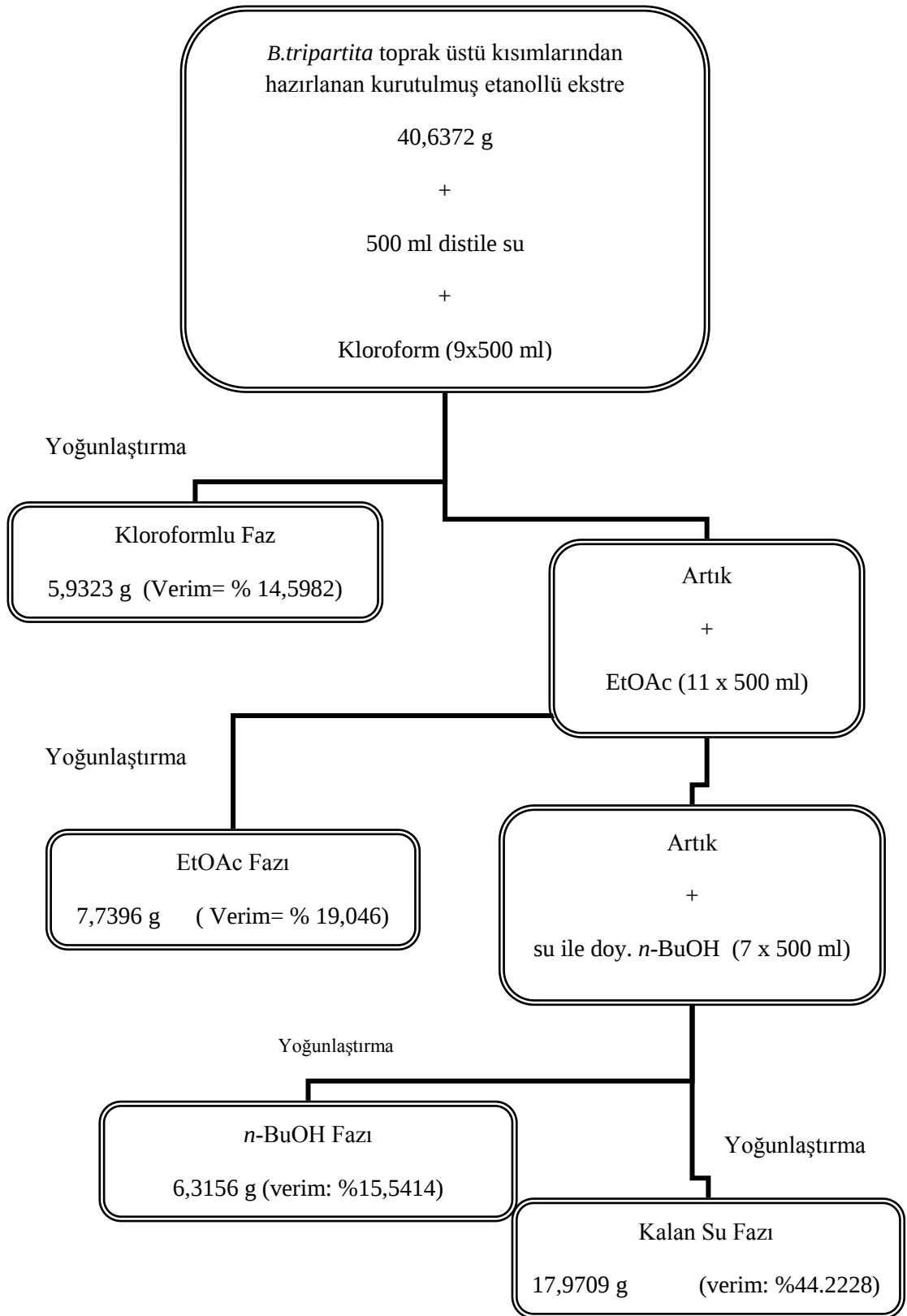
302,2518 g bitki üzerine 3000 ml % 80'lik etanol eklendi, 24 saat çalkalandı, süzüldü, 2000 ml daha etanol eklenerek 24 saat daha çalkalandı, süzüldü. Süzüntüler rotavaporda 50°C'de yoğunlaştırıldı. Artık, su ile behere aktarıldı. Liyofilize edildi. 45,6901 g ekstre elde edildi. 40,6372 g ekstre 500 ml suda çözüldü. 1 l'lik ayırma hunisine alındı. 9 kez 500 ml (toplam 4500 ml) kloroform ile çalkalandı. Alt fazlar toplandı. Rotavaporda yoğunlaştırıldı, kloroformla darası alınmış behere aktarılarak, çeker ocak altında kurutuldu. Kalan sulu faz üzerine 11 kez 500 ml EtOAc (toplam 5500 ml) ilave edildi. EtOAc fazı 250 ml'lik darası alınmış balonda biriktirildi. Kuruluğa kadar uçuruldu. Son olarak da sulu faz üzerine 7 kez 500 ml (toplam 3500 ml) su ile doyurulmuş *n*-butanol ilave edilerek çalkalandı. Üst fazlar 250 ml'lik darası alınmış balonda biriktirildi, kuruluğa kadar uçuruldu. Tamamen kuruduktan sonra 2 kez metanol eklenerek rotavaporda tekrar kurutularak *n*-butanol tamamen uzaklaştırıldı. Kalan su fazı yoğunlaştırılarak liyofilize edildi. Kloroform, EtOAc ve *n*-butanol fazları vakumlu desikatörde bekletildi. Tartımlar alındı, verimler hesaplandı.

Kloroform fraksiyonu: 5,9323 g % Verim=14,5982

EtOAc fraksiyonu: 7,7396 g % Verim= 19,046

n-Butanol fraksiyonu: 6,3156 g % Verim= 15,5414

Su fraksiyonu: 17,9709 g % Verim= 44,2228



Şekil 2.13. *B. tripartita* toprak üstü kısımlarının etanollü ekstresinin çözücü-çözücü ekstraksiyonu ile fraksiyonlanması

2.2.4.1. Ekstre ve Fraksiyonların Hazırlanmasında Kullanılan Çözücüler

Kloroform: Riedel-de Haen Puriss UN 1888

Atabay 98007

Etilasetat: Riedel-de Haen Puriss 27227 UN 11173

Merck I 923468 Li Chrosol für die Chromatographie

n-Butanol: Riedel-de Haen A.G. 24124

Su: Bidistile su

2.3. Biyolojik Aktivite Çalışmaları

2.3.1. Antidiyabetik Aktivite Tayini

Deney Hayvanları:

Aktivite çalışmalarında Gazi Üniversitesi, Deney Hayvanları Araştırma Merkezinden (GÜDAM) temin edilen Wistar albino erkek sıçanlar kullanılmıştır. Deney hayvanlarında hormonal değişiklikler kan glukoz düzeyini etkilediğinden erkek hayvanlar tercih edilmiştir. Hayvanlar standart laboratuvar şartlarında (24°C sıcaklık, 12 saat ışık, 12 saat karanlık) barındırılmış ve deneyden 12 saat önce aç bırakılarak sadece su verilmiştir.

Deney Numunelerinin Hazırlanışı:

Numuneler süspansiyon yapıcı madde (% 0,5 karboksi metil selüloz çözeltisi) ile hazırlanmıştır.

Deney Numunesinin Uygulanması:

Hazırlanan numuneler deney hayvanlarına gastrik gavaj yardımıyla oral olarak uygulanmıştır (1 ml/100 g).

Kan Glukoz Konsantrasyonlarının Ölçülmesi

Belirli aralıklarla toplanan kan örnekleri glukoz-oksidaz metoduna göre ölçüm yapan “Glucometer Elite” Cihaz ve stripleri kullanılarak ölçülmüştür. Sonuçlar mg/dl olacak şekilde kaydedilmiştir.

Referans İlaç:

Tip 2 diyabete karşı etki araştıracağımız için oral antidiyabetikler içinde en çok kullanılanlardan biri olan tolbutamit (100 mg/kg) kullanılmıştır.

2.3.1.1. Normoglisemik Hayvanlar Üzerinde Çalışma:

Deneyden 12 saat önce aç bırakılan, standart laboratuvar koşullarında barındırılan deney hayvanlarının açlık kan glukoz seviyeleri ölçüldükten sonra 6'şarlı gruplara ayrılarak ekstre ve referans madde uygulandı. Kontrol grubuna sadece ekstre hazırlanırken kullanılan çözücü uygulanmıştır.

Kan örnekleri başlangıçta (0. dakika), 30., 60., 120. ve 240. dakikalarda hayvanların kuyruk ucundan toplanmış ve kan glukoz konsantrasyonları mg/dl olarak tespit edilmiştir.

2.3.1.2. Glukoz-Hiperglisemik Hayvanlar Üzerinde Çalışma (Oral Glukoz Tolerans Testi-OGTT):

12 saat aç bırakılan hayvanlara açlık kan glukoz konsantrasyonları ölçüldükten sonra ekstre uygulanmıştır. Ekstre uygulanmasını takip eden 30. dakikada sıçanlara oral olarak 2 g/kg dozda glukoz yüklemesi yapılmıştır. Glukoz uygulandıktan 30, 90 ve 210 dakika sonra kan örneklerinde glukoz konsantrasyonu tespit edilmiştir.

2.3.1.3. Diyabetik Hayvanlar Üzerinde Çalışmalar

Deneysel Diyabetin Oluşturulması:

Deneysel diyabet oluşturmak amacıyla intraperitoneal olarak 60 mg/kg dozda streptozotosin uygulanmıştır. Streptozotosin ısıyla bozulduğu için derin dondurucuda saklanmış ve uygulamanın hemen öncesinde buz banyosu içinde hazırlanmıştır. Uygulamadan 7 gün sonra ölçülen kan glukoz seviyeleri 250 mg/dl üzerinde olan hayvanlar diyabetik kabul edilmiş ve deney gruplarına alınmıştır.

Akut Antidiyabetik Etkinin Tesbiti:

Deneysel diyabet oluşturulmuş sıçanlar deneyden önce en az 8 saat aç bırakılmıştır. Sadece su içmelerine izin verilen hayvanların açlık kan şekerleri deneyden hemen önce ölçülmüştür. Antidiyabetik etkinin tespiti için sıçanlara ekstre verildikten sonraki 30., 60., 120. ve 240. dakikalarda kan örnekleri hayvanların kuyruk uçlarından toplanmıştır.

Subakut Antidiyabetik Etkinin Tespit Edilmesi:

Ekstreler 7 gün boyunca deneysel diyabet oluşturulmuş sıçanlara oral yolla verilmiştir. Hayvanların kanları 1, 4 ve 8. günlerde toplanmış ve kan glukoz değişimleri incelenmiştir. Diğer taraftan ekstre uygulaması esnasında sıçanların vücut ağırlıklarında meydana gelen değişiklikler de 1., 4., ve 8. günlerde kaydedilmiştir.

2.3.1.4. Etanollü Ekstreler Üzerinde Antidiyabetik Aktivite Çalışmaları

Üç taksonun (*B. cernua* var. *radiata*, *B. tripartita*, *B. frondosa*) etanollü ekstreleri 250 mg/kg ve 500 mg/kg dozda normoglisemik, glukoz hiper glisemik (OGTT) ve streptozotosin-nedenli diyabetik (akut, subakut) sıçanlara oral olarak uygulanmıştır. Uygulama esnasında her üç deney modeli içinde gruplar aşağıdaki şekilde oluşturulmuştur.

Normoglisemik (Sağlıklı Hayvanlar)

- 1.Grup.....Negatif kontrol (sadece çözücü uygulanmıştır)
- 2.Grup.....Pozitif kontrol (Tolbutamid 100 mg/kg)
- 3.Grup.....*B. cernua* ekstresi (250 mg/kg)
- 4.Grup.....*B. cernua* ekstresi (500 mg/kg)
- 5.Grup.....*B. tripartita* ekstresi (250 mg/kg)
- 6.Grup.....*B. tripartita* ekstresi (500 mg/kg)
- 7.Grup.....*B. frondosa* ekstresi (250 mg/kg)
- 8.Grup.....*B. frondosa* ekstresi (500 mg/kg)

Glukozhiperglisemik (OGTT) (Sağlıklı Hayvanlar)

- 1.Grup.....Negatif kontrol+2 g/kg glukoz
- 2.Grup.....Pozitif kontrol (Tolbutamit 100mg/kg) +2g/kg glukoz
- 3.Grup.....*B. cernua* ekstresi (250 mg/kg) +2 g/kg glukoz
- 4.Grup.....*B. cernua* ekstresi (500 mg/kg) +2 g/kg glukoz
- 5.Grup.....*B. tripartita* ekstresi (250 mg/kg) +2 g/kg glukoz
- 6.Grup.....*B. tripartita* ekstresi (500 mg/kg) +2 g/kg glukoz
- 7.Grup.....*B. frondosa* ekstresi (250 mg/kg) +2 g/kg glukoz
- 8.Grup.....*B. frondosa* ekstresi (500 mg/kg) +2 g/kg glukoz

Akut Diyabetik (Streptozotosin ile diyabet yapılmış hayvanlar)

- 1.Grup.....Negatif kontrol (sadece çözücü uygulanmıştır)
- 2.Grup.....Pozitif kontrol (Tolbutamit 100 mg/kg)
- 3.Grup.....*B. cernua* ekstresi (250 mg/kg)
- 4.Grup.....*B. cernua* ekstresi (500 mg/kg)
- 5.Grup.....*B. tripartita* ekstresi (250 mg/kg)
- 6.Grup.....*B. tripartita* ekstresi (500 mg/kg)
- 7.Grup.....*B. frondosa* ekstresi (250 mg/kg)
- 8.Grup.....*B. frondosa* ekstresi (500 mg/kg)

Subakut Diyabetik (Streptozotosin ile diyabet yapılmış hayvanlar)

Bu deneyde 7 gün boyunca günde 1 kez aşağıdaki dozlarda uygulama yapılmıştır.

- 1.Grup.....Negatif kontrol (sadece çözücü uygulanmıştır)
- 2.Grup.....Pozitif kontrol (Tolbutamit 100 mg/kg)
- 3.Grup.....*B. cernua* ekstresi (250 mg/kg)
- 4.Grup.....*B. cernua* ekstresi (500 mg/kg)
- 5.Grup.....*B. tripartita* ekstresi (250 mg/kg)
- 6.Grup.....*B. tripartita* ekstresi (500 mg/kg)
- 7.Grup.....*B. frondosa* ekstresi (250 mg/kg)
- 8.Grup.....*B. frondosa* ekstresi (500 mg/kg)

Hayvanların kanları 1., 4. ve 8. günlerde toplanmış ve kan glukoz değişimleri incelenmiştir. Diğer taraftan ekstre uygulaması esnasında sıçanların vücut ağırlıklarında meydana gelen değişiklikler de 1., 4., ve 8. günlerde kaydedilmiştir.

2.3.1.5. *B. tripartita*'nın Fraksiyonları Üzerinde Antidiyabetik Aktivite Çalışmaları

B. tripartita'nın etanollü ekstresinin çözücü-çözücü ekstraksiyonu ile fraksiyonlanması sonucunda elde edilen 4 fraksiyonun antidiyabetik aktivite deneylerinde aşağıdaki grup ve dozlar kullanılmıştır. Doz hesabı fraksiyonların % verimleri dikkate alınarak hesaplanmıştır.

2.3.1.5.1. Fraksiyonlar İçin Doz Hesabı

Kloroform fr.: % 14,5982 EtOAc fr.: % 19,046

n-BuOH fr.: % 15,5414 *k*-su fr.: % 44,2228

Verimler toplamı: % 93,4

Total ekstrede yüksek etkili doz 500 mg/kg (Fraksiyonlama yapıldığı için doz 2 ile çarpıldı =1000 mg/kg)

93,4 14,6 (Her fraksiyon için aynı orantı kuruldu)
1000 mg/kg x

Dozlar (mg/kg):

Kloroform = 156,3169>>156

EtOAc= 203,9186>>204

n-BuOH= 166,3961>> 166

k-su=473,4775>>473

Hayvan Ağırlığına göre;

Her grupta 6 hayvan olacak şekilde deney tasarlandı, ortalama hayvan ağırlığı 200 g olarak kabul edildi. Her gruptaki hayvan sayısının bir fazlası kadar tartım yapıldı.

200 x 7= 1400 g toplam hayvan ağırlığı (her grup için)

1000 g	156 mg	Kloroform= 218,4 mg	EtOAc= 285,6 mg
<u>1400 g</u>	<u>x</u>	<i>n</i> -BuOH= 232,5 mg	k-su = 666,2 mg

Hayvanların her 100 g'ı için 1 ml ekstre uygulanacağı kabul edildiğinde 1400 g hayvan için 14 ml ekstre uygulanmalıdır.

Tüm fraksiyonlar 14'er ml karboksimetil selüloz (% 0,5'lik) çözeltisinde çözülerek uygulanmıştır. Hayvan ağırlıkları ekstre verilmeden önce tartılmış ve 14 ml'den ne kadar çekileceği belirlenmiştir. Her fraksiyon yarı dozda da çalışılmıştır.

Normoglisemik (Sağlıklı Hayvanlar)

- 1.Grup.....Negatif kontrol (sadece çözücü uygulanmıştır)
- 2.Grup.....Pozitif kontrol (Tolbutamit 100 mg/kg)
- 3.Grup.....Kloroform fr. 78 mg/kg
- 4.Grup.....Kloroform fr. 156 mg/kg
- 5.Grup.....Etil asetat fr. 102 mg/kg
- 6.Grup.....Etil asetat fr. 204 mg/kg
- 7.Grup.....*n*-Butanol fr. 83 mg/kg
- 8.Grup.....*n*-Butanol fr.166 mg/kg
- 9.Grup.....Kalan su fr. 236 mg/kg
- 10.Grup.....Kalan su fr. 473 mg/kg

Glukozhiperglisemik (OGTT) (Sağlıklı Hayvanlar)

- 1.Grup.....Negatif kontrol (sadece çözücü uygulanmıştır)
- 2.Grup.....Pozitif kontrol (Tolbutamit 100 mg/kg)+2 g/kg glukoz
- 3.Grup.....Kloroform fr. 78 mg/kg+2 g/kg glukoz
- 4.Grup.....Kloroform fr. 156 mg/kg+2 g/kg glukoz
- 5.Grup.....Etil asetat fr. 102 mg/kg+2 g/kg glukoz
- 6.Grup.....Etila setat fr. 204 mg/kg+2 g/kg glukoz
- 7.Grup.....*n*-Butanol fr. 83 mg/kg+2 g/kg glukoz
- 8.Grup.....*n*-Butanol fr. 166 mg/kg+2 g/kg glukoz
- 9.Grup.....Kalan su fr. 236 mg/kg+2 g/kg glukoz
- 10.Grup.....Kalan su fr. 473 mg/kg+2 g/kg glukoz

Akut Diyabetik (Streptozotosin ile diyabet yapılmış hayvanlar)

- 1.Grup.....Negatif kontrol (sadece çözücü uygulanmıştır)
- 2.Grup.....Pozitif kontrol (Tolbutamit 100 mg/kg)
- 3.Grup.....Kloroform fr. 78 mg/kg
- 4.Grup.....Kloroform fr. 156 mg/kg
- 5.Grup.....Etil asetat fr. 102 mg/kg
- 6.Grup.....Etil asetat fr. 204 mg/kg
- 7.Grup.....*n*-Butanol 83 mg/kg
- 8.Grup.....*n*-Butanol fr.166 mg/kg
- 9.Grup.....Kalan su fr.236 mg/kg
- 10.Grup.....Kalan su fr.473 mg/kg

Subakut Diyabetik (Streptozotosin ile diyabet yapılmış hayvanlar)

Bu deneyde 7 gün boyunca günde 1 kez aşağıdaki dozlarda uygulama yapılmıştır.

- 1.Grup.....Negatif kontrol (sadece çözücü uygulanmıştır)
- 2.Grup.....Pozitif kontrol (Tolbutamit 100 mg/kg)
- 3.Grup.....Kloroform fr. 78 mg/kg
- 4.Grup.....Kloroform fr. 156 mg/kg
- 5.Grup.....Etilasetat fr. 102 mg/kg
- 6.Grup.....Etilasetat fr. 204 mg/kg
- 7.Grup.....*n*-Butanol fr. 83 mg/kg
- 8.Grup.....*n*-Butanol fr. 166 mg/kg
- 9.Grup.....Kalan su fr. 236 mg/kg
- 10.Grup.....Kalan su fr. 473 mg/kg

Hayvanların kanları 1., 4. ve 8. günlerde toplanmış ve kan glukoz değişimleri incelenmiştir. Diğer taraftan ekstre uygulaması esnasında sıçanların vücut ağırlıklarında meydana gelen değişiklikler de 1., 4., ve 8. günlerde kaydedilmiştir.

2.3.1.6. Antidiyabetik Aktivite Çalışmalarının İstatistiksel Olarak Değerlendirilmesi

Deney sonuçlarının değerlendirilmesinde Instat-2 bilgisayar programı kullanılmıştır. Programda tek yönlü ANOVA ve Student-Newman-Keuls seçilerek grupların toplam, ortalama, standart sapma ve standart hata değerleri hesaplanmıştır.

Antidiyabetik aktivite deneylerinde her numune grubu kendi zaman birimindeki kontrol ve referans grubu ile karşılaştırılmıştır.

İstatistiksel olarak belirginlik: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$

Kan glukoz konsantrasyonlarında, % değişim incelenirken aşağıdaki formül kullanılmıştır:

$$\% \text{ İnhibisyon} = \frac{\text{Numune Grubunun Değeri} \times 100}{\text{Kontrol Grubunun Değeri}} - 100$$



Şekil 2.14. Antidiyabetik aktivite deneylerinde kullanılan hayvanlar



Şekil 2.15. Deney hayvanlarına STZ uygulanması

2.4. Antioksidan Aktivite Tayini

Antioksidan aktivitenin tayini için toprak üstü kısımdan hazırlanan sulu, etanollü ekstrelerin ve alt fraksiyonların DPPH serbest radikali süpürücü aktivitesi ve metal-şelasyon aktivitesi incelenmiştir.

2.4.1. DPPH Serbest Radikal Süpürücü Aktivite:

Ekstrelerin 2,2-difenil-1-pikril hidrazil (DPPH-Sigma Aldrich Chemie) radikale karşı, koyu-viyole renkten açık-sarı renge dönüşümün UV/görünür bölgede 515 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak ölçülmesiyle tayin edilmiştir. Çalışmada uygulanan yöntem gereği; 6×10^{-5} M DPPH solüsyonu ölçümlerden önce hazırlanan ve ekstre solüsyonlarından 77 µl alınarak, üzerlerine 3'er ml DPPH solüsyonu ilave edilmiştir. Daha sonra ekstre ve DPPH solüsyonları, karanlıkta, oda sıcaklığında 15 dakika bekletilerek inkübe edilmiştir. Kör olarak metanol kullanılarak tüm solüsyonların absorbanları 515 nm'de UV spektrofotometrede (Unico 4802 UV/Vis Double Beam Spectrophotometer, USA) okunmuştur (Miliauskas ve ark., 2004). Tüm ekstreler için deney üç paralelli olarak uygulanmış ve kersetin referans madde olarak kullanılmıştır

% inhibisyon ise şu formüle göre hesaplanmıştır:

$$\% \text{ İnhibisyon} = [(A_B - A_A) / A_B] \times 100$$

A_B = DPPH stok solüsyonunun absorbanı, A_A = Örnek solüsyonunun absorbanı

2.4.2. Metal (Demir) İyonu Şelasyon Etkisi :

Dinish ve arkadaşlarının (1994) yöntemi uygulanmıştır. Deneyde kullanılmak üzere 2 mM demir-II-klorür ile 5 mM ferrozin çözeltisi de hazırlanmıştır. Yönteme göre; her bir örnekten ve kontrol çözeltisini hazırlamak için çözücünden (etanol) 200 µl mikropipet ile alınarak deney tüplerine konulup, üzerlerine 50 µl demir-II-klorür ve ardından 200 µl ferrozin çözeltisi eklenmiştir. Daha sonra, son miktar 4000 µl olacak şekilde etanol ilave edilmiştir, karışım 10 dakika oda sıcaklığında bekletilerek süre sonunda absorbans 562 nm dalga boyunda spektrofotometrede ölçülmüştür. Örneklerin % inhibisyonları aşağıda verilen formüle göre hesaplanmıştır. Her örnek 3 paralel olarak çalışılmıştır ve sonuçlar 3 deneyden elde edilen % inhibisyonların ortalaması ± standart sapma olarak verilmiştir.

$$\% \text{ İnhibisyon} = [(A_1 - A_2) / A_1] \times 100$$

A_1 = Kontrol çözeltisinin 562 nm dalga boyundaki absorbansı

A_2 = Örnek çözeltilerinin 562 nm dalga boyundaki absorbansı

2.5. Asetilkolinesteraz Enzim İnhibitör Aktivite Tayini

Toprak üstü kısımdan hazırlanan sulu, etanollü ekstraktların ve alt fraksiyonların AChE inhibisyonu aşağıdaki gibi incelenmiştir.

Ellman ve arkadaşları (1961) tarafından bulunan spektrofotometrik yöntemle yapılmıştır. 140 µl 0,1 mM fosfat tamponu (pH 8), 20 µl 5,5-ditiyobis (2-nitrobenzoik asit) (DTNB-Sigma, ABD) çözeltisi, 20 µl test çözeltisi ve 20 µl AChE enzimi (Elektirikli yılan balığı AChE'ı Sigma, EC 3.1.1.7), 96 kuyucuklu mikroyağa eklenerek 25°C lik etüvde 15

dakika süreyle inkübe edilmiştir. İnkübasyonun ardından, 10 µl asetiltiyokolin iodür (ATCI-Sigma ABD) eklenmesiyle reaksiyon başlamış ve oluşan sarı rengin absorbansı 412 nm dalga boyunda ELISA mikropalak okuyucuda ölçülmüştür. Kör olarak fosfat tamponu (pH 8) içinde etanol kullanılmıştır. Tüm solüsyonlar için deney 3 paralelli olarak yapılmış ve referans madde olarak galantamin (Reminyl®) kullanılmıştır.

%AChE aktivitesi ise şu formüle göre hesaplanmıştır:

$$\% \text{ AChE aktivitesi} = (E-S)/E \times 100$$

E= Numune içermeyen enzim çözeltisinin absorbansı

S= Numune ve enzim çözeltisi karışımının absorbansı

2.6. HPLC, Sıvı Kromatografisi-Kütle Spektrofotometresi Analizleri (HPLC-LC/MS ve UV Analizleri)

Ekstre ve fraksiyonlar ile standartların HPLC kromatogramları karşılaştırılmış ve ultraviyole spektrumları çakıştırılmıştır. Ekstre ve fraksiyonlarda var olduğu tahmin edilen maddeler (klorojenik asit, sinarozit, luteolin ve kafeik asit) ekstre ve fraksiyonlara ilave edilmiş ve şüphelenilen piklerin miktarlarının artıp artmadığına bakılarak varlıkları doğrulanmıştır. *B. tripartita* etanol ekstresinde ve EtOAc fraksiyonunda klorojenik asit, luteolin-7-O-glukozit (sinarozit) ve luteolin varlığı, *B. cernua* var. *radiata*, *B. frondosa* etanol ekstrlerinde ve *n*-BuOH fraksiyonunda ise klorojenik asit, luteolin-7-O-glukozit (sinarozit) varlığı saptanmıştır. Etil asetat fraksiyonunda kafeik asit varlığından şüphelenilmiş ve fraksiyon içine kafeik asit standartı eklenerek yapılan analizde pik yüksekliğinde değişim gözlenmemiş ve kafeik asitin bulunmadığı anlaşılmıştır.

2.6.1. HPLC Analiz Koşulları

Cihaz	: Agilent 1200 Series
Kolon	: ACE 5 μ , C ₁₈ (150 mm x 4,6)
Enjeksiyon Hacmi	: 20 μ l
Akış Hızı	: 1 ml/dk
Dedektör	: G1315D DAD dedektör
Taranan Dalga Boyları	: 210 nm, 254 nm, 280 nm, 350 nm
Mobil Faz	: Asetonitril: % 0,03 TFA'lı su

Çizelge 2.1. HPLC Çözücü akış grafiği

Zaman (Dakika)	Asetonitril (%)	%0,03 TFA-Su(%)
0	10	90
30	30	70

2.6.2. LC-MS Analiz Koşulları

Cihaz	: Agilent Technologies LC/MSDVL
Kolon	: ACE 5 μ , C ₁₈ (150 mm * 4,6)
Enjeksiyon Hacmi	: 20 μ l
Akış Hızı	: 1 ml/dk
Dedektör	: G1956 A Mass dedektör
Mobil Faz	: Asetonitril:% 0,03 TFA-su

2.6.3. Kullanılan Çözücüler

Asetonitril: Sigma Aldrich Chromasol V gradient grade for HPLC % 99,9

Metanol: Sigma Aldrich Chromasol V gradient grade for HPLC % 99,9

Bidistile su

2.6.4. Analiz ve Standart Numunelerinin Hazırlanması

Bidens taksonlarının sulu ve EtOH ekstrelerinden, EtOAc ve *n*-BuOH fraksiyonlarından 10'ar mg tartıldı. Sulu ekstreler, etanollü ekstreler ve *n*-BuOH fraksiyonu MeOH:Su (1:1), EtOAc fraksiyonu ise metanol ile 10 ml'ye tamamlandı (1 mg/ml). Hazırlanan stok çözeltiler 0,45 µl'lik filtrelerden süzüldü.

2.6.4.1. Ekstre ve Fraksiyonlarda HPLC ve Sıvı Kromatografisi-Kütle Spektroskopisi ile Taranan Bileşikler ve Molekül Ağırlıkları

Klorojenik asit	354,31 g/mol
Luteolin-7-o-glukozit (Sinarozit)	448,38 g/mol
Luteolin	286,241 g/mol
Kafeik asit	180,16 g/mol
Rutin	610,53 g/mol
Flavanomarein	450,4 g/mol
Kateşin	290,273 g/mol
Kemferol	286,241 g/mol
Kersetin	302,24 g/mol

Hiperozit	464,39 g/mol
Rosmarinik asit	360,32 g/mol
Kilorik asit	474,38 g/mol
Askorbik asit	176, 126 g/mol

2.7. Miktar Tayini İçin Kalibrasyon Eğrilerinin Oluşturulması

2.7.1. Analitik Yöntem Validasyonu

2.7.1.1. Doğrusallık

Konsantrasyona karşı analit cevabının doğru orantılı olarak artması ve çizilen grafikte cevap noktalarının düz bir çizgi üzerinde yer almasıdır. Korelasyon (r) ve/veya determinasyon (tanımlayıcılık) (r^2) katsayısı doğrusallığı veren parametrelerdir. Doğrusallık “r” ve “ r^2 ” değerleri 1’e ne kadar yakınsa (0,999) ve analitin cevap değerleri çizilen doğru üzerinde yer alıyorsa, sağlanmış demektir.

$$y = mx + n$$

Y= Alan [hesaplanan]

X = Konsantrasyon [mg / mL]

m = Regresyon doğrusunun eğimi

n = Doğrunun Y-eksenini kestiği nokta r^2 = Korelasyon katsayısı

Kabul Kriterleri; $r^2 > 0,995$, doğrunun y-eksenini kestiği nokta doğrunun eğim değerinin $\pm \% 2.0$ aralığında olmalıdır.

2.7.1.2. Kesinlik

Geliştirilen yöntemin çalışılan koşullar altında tekrarlanabilirliğinin ölçüsüdür. Bir numuneye aynı yöntem birden fazla sayıda uygulandığı zaman analit için bulunan sonuçların birbirine yakınlığının ölçüsüdür. Sonuçlar bağıl standart sapma (% BSS) olarak ifade edilir. Deney sonuçlarının % BSS sı teorik değerlerin % 5'inden daha fazla sapma göstermemelidir.

2.7.1.2.1. Tayin Edilebilir En Düşük Limit (Teşhis Sınırı-TS) (Limit of Detection- LOD)

Analizi yapılan örneğin belirlediği fakat nicel sınırlar içerisine girmediği en alt konsantrasyondur. Yapılan deneylerden elde edilen verilerin Sinyal/Gürültü oranı 3 olarak alınır.

Kalibrasyon eğrisi oluşturmak için kullanılan konsantrasyonlardan en düşüğü olan 0,01 mg/ml'lik kromatogramda tespit edilen gürültü sinyalinin 3 katı alınarak hesaplandı.

2.7.1.2.2. Hesaplanabilir En Düşük Limit (Tayin Alt Sınırı-TAS) (Limit of Quantitation- LOQ)

Analizi yapılan maddenin kabul edilebilir düzeyde kesin ve doğru miktarının tayin edilebileceği, doğrusallık sınırları içerisinde olmayan fakat kalibrasyon eğrisinin en alt konsantrasyonunu oluşturan veya onun da altında olabilen konsantrasyon düzeyidir. Yapılan deneylerden elde edilen verilerin Sinyal/Gürültü oranı 9 olarak alınır.

Tayin edilebilir en düşük limitin 3 katı alınarak hesaplandı.

Kabul Kriterleri;

Analiz sonuçları aralarındaki BSS maksimum % 5 olmalıdır.

2.8. Miktar Tayini ve Analitik Yöntem Validasyonu İçin Numune Dilüsyonlarının Hazırlanışı

Analizi yapılacak standart maddelerin uygun çözücülerle 0,01 mg/ml, 0,05 mg/ml, 0,1 mg/ml, 0,2 mg/ml, 0,3 mg/ml, 0,4 mg/ml, 0,5 mg/ml'lik konsantrasyondaki çözeltileri hazırlanmıştır.

Kalibrasyon eğrisini oluşturmak için standart maddelerin HPLC'de 3'er kez analizi yapılmış, pik altında kalan alanların ortalaması konsantrasyona karşı grafiğe geçirilmiştir.

LOD ve LOQ hesabı için her bir standart maddenin en düşük konsantrasyonu olan 0,01 mg/ml'lik dilüsyonun analizindeki gürültü piki kullanılmıştır. % BSS hesabı için 9 kez HPLC analizi yapılmış ve pik alanlarının en az 7 tanesi kullanılmıştır.

3. BULGULAR

Araştırmamızdan elde edilen bulgular 2 ana başlık altında verilmiştir. İlk bölümde biyolojik aktivite çalışmalarından elde edilen bulgular, antidiyabetik, asetilkolinesteraz inhibitör aktivite ve antioksidan aktivite bulguları sırasıyla sunulmuştur. İkinci bölümde ise aktif ekstre ve fraksiyonların kromatografik analizlerinden elde edilen sonuçlar verilmiştir.

3.1. Aktivite Bulguları

3.1.1. Antidiyabetik Aktivite Bulguları

Bidens türlerinin etanollü ekstreleriyle yapılan akut antidiyabetik aktivite denemelerinde tüm türler etkili bulunmuştur. Aynı şartlarda referans madde olarak kullanılan tolbutamid kan glukoz konsantrasyonları üzerinde % 20 civarında bir azalma sağlarken *Bidens* taksonlarının ekstreleri % 30 civarında azalma meydana getirmiştir (Çizelge 3.1.). Dolayısıyla tüm türlere ait ekstrelerin subakut denemelerinin yapılmasına karar verilmiştir.

Çizelge 3.1. *Bidens* türlerinin diyabetik sıçanların kan glukoz konsantrasyonları üzerine akut etkisi

Deney Grubu ve Dozu	Kan Glukoz Konsantrasyonu (mg/dl) ± Standart Hata (% İnhibisyon)				
	Başlangıç	30. dakika	60. dakika	120. dakika	240. dakika
Kontrol	335,4± 19,53	303,4 ± 13,01	294,6 ± 16,6	265,8 ± 18,60	204,4 ± 15,42
Tolbutamit 100 mg/kg	300,8 ± 17,68	253,7 ± 11,18* (16,4)	235,6 ± 15,4* (20,0)	222,0 ± 7,4* (16,5)	210,0 ± 9,78
<i>B. cernua</i> var. <i>radiata</i> 250 mg/kg	311,8 ± 13,92	223,0 ± 19,28** (26,5)	191,8 ± 12,6*** (34,9)	169,8 ± 16,50*** (36,11)	138,2 ± 8,19** (32,4)
<i>B. cernua</i> var. <i>radiata</i> 500 mg/kg	313,00 ± 16,13	246,0 ± 6,10* (18,9)	224,2 ± 10,2* (23,9)	185,0 ± 14,7*** (40,5)	156,2 ± 12,26* (23,6)
<i>B. tripartita</i> 250 mg/kg	308,8 ± 16,68	260,8 ± 4,64* (14,0)	249,2 ± 13,09* (15,4)	206,0 ± 12,20** (22,5)	158,8 ± 16,21** (22,3)
<i>B. tripartita</i> 500 mg/kg	307,6 ± 16,97	229,4 ± 8,69** (24,3)	214,0 ± 19,40** (27,3)	178,8 ± 12,43*** (32,7)	152,6 ± 8,37* (25,3)
<i>B. frondosa</i> 250 mg/kg	296,6 ± 29,40	204,6 ± 8,88*** (32,5)	192,0 ± 12,02*** (34,8)	177,0 ± 8,13*** (33,4)	121,2 ± 7,00*** (40,7)
<i>B. frondosa</i> 500 mg/kg	293,0 ± 14,79	228,0 ± 17,53** (24,8)	230,0 ± 8,02* (21,9)	171,8 ± 8,60*** (35,3)	118,4 ± 12,51*** (42,1)

* p<0,05, ** p<0,01, ***p<0,001

Akut denemelerde elde edilen umut verici sonuçlar üzerine; tüm etanollü ekstreler subakut olarak denenmiş ve sonuçlar Çizelge 3.2.de gösterilmiştir. Tüm dozlarda % 15 civarında bir etki tespit edilmiş iken, *B. tripartita*'nın 500 mg/kg dozunda % 40 civarında bir etki bulunmuştur. Bu sonuçlardan sonra *B. tripartita*'nın çözücü-çözücü ekstraksiyonu ile fraksiyonlarına ayrılmasına ve elde edilecek fraksiyonların aktivite deneylerinin yapılmasına karar verilmiştir.

Çizelge 3.2. *Bidens* türlerinin diyabetik sıçanların kan glukoz konsantrasyonları üzerine subakut etkisi

Deney Grubu ve Dozu	Kan Glukoz Konsantrasyonu (mg/dl) $\pm$ Standart Hata (% İnhibisyon)		
	1. Gün	4. Gün	8. Gün
Kontrol	335,4 $\pm$ 19,53	391,5 $\pm$ 17,44	328,7 $\pm$ 12,63
Tolbutamit	300,8 $\pm$ 17,68	336,5 $\pm$ 15,64* (14,0)	266,3 $\pm$ 8,73* (18,9)
<i>B. cernua</i> var. <i>radiata</i> 250 mg/kg	311,8 $\pm$ 13,92	327,8 $\pm$ 21,89* (16,3)	280,0 $\pm$ 8,02* (14,8)
<i>B. cernua</i> var. <i>radiata</i> 500 mg/kg	313,00 $\pm$ 16,13	344,2 $\pm$ 7,89	349,0 $\pm$ 12,7
<i>B. tripartita</i> 250 mg/kg	308,8 $\pm$ 16,68	342,4 $\pm$ 10,45	282,6 $\pm$ 8,25* (14,0)
<i>B. tripartita</i> 500 mg/kg	307,6 $\pm$ 16,97	252,3 $\pm$ 18,44*** (35,5)	195,3 $\pm$ 24,93*** (40,6)
<i>B. frondosa</i> 250 mg/kg	296,6 $\pm$ 29,40	317,2 $\pm$ 6,68* (18,9)	309,6 $\pm$ 19,32
<i>B. frondosa</i> 500 mg/kg	293,0 $\pm$ 14,79	330,4 $\pm$ 9,49* (15,6)	276,0 $\pm$ 4,58* (16,0)

* p<0,05, ** p<0,01, ***p<0,001

Ekstrelerin sıçanlara subakut uygulanması esnasında hayvanların vücut ağırlıklarında meydana gelen değişimler kayıt altına alınmış ve Çizelge 3.3. de gösterilmiştir. Çizelge incelendiğinde görülecektir ki, ekstre verilen deney gruplarındaki hayvanların vücut ağırlıklarında % 10'a yakın bir artış görülürken kontrol grubundaki ağırlık artışı % 3'te kalmıştır. İlginç bir şekilde tolbutamit grubundaki hayvanlar 8. günün sonunda % 4 civarında kilo kaybına uğramıştır. Kan glukoz konsantrasyonları üzerindeki azaltıcı etkiye paralel olarak 500 mg/kg dozda *B. tripartita* uygulanan deney hayvanlarında görülen kilo artışı en yüksek oranda (% 14,5) bulunmuştur.

Çizelge 3.3. Subakut uygulamada diyabetik hayvanların vücut ağırlığı değişimleri tablosu

Deney Grubu ve Dozu	Subakut Uygulamada Diyabetik Hayvanların Ağırlıkları (% değişim)		
	1. Gün	4. Gün	8. Gün
Kontrol	180,16±11,64	193,03±11,35 (+7,1)	185,67±13,608 (+3,1)
Tolbutamit	194,17±10,09	200,83±9,5 (+3,4)	186,5±10,84 (-3,9)
<i>B. cernua</i> var. <i>radiata</i> 250 mg/kg	195,6±9,33	210±10,44 (+7,4)	214,2±10,97 (+9,5)
<i>B. cernua</i> var. <i>radiata</i> 500 mg/kg	170,8±11,31	173,2±11,70 (+1,4)	186±12,29 (+8,9)
<i>B. tripartita</i> 250 mg/kg	183±11,99	189,8± 13,1 (+3,7)	196,2±13,91 (7,2)
<i>B. tripartita</i> 500 mg/kg	169,6±17,76	176,2±30,2 (+3,9)	194,33±30,25 (+14,5)
<i>B. frondosa</i> 250 mg/kg	181,4±6,62	190,8±6,51 (+5,2)	198,6±7,24 (+9,5)
<i>B. frondosa</i> 500 mg/kg	158,8±11,75	170±13,97 (+7,1)	166,7±20,74 (+5,0)

Bidens türlerine ait etanollü ekstrelerin normal sıçanların kan glukoz üzerindeki etkisi Çizelge 3.4. de detaylarıyla gösterilmiştir. Referans ilaç olan tolbutamid tüm deney süresince yapılan ölçümlerde kuvvetli hipoglisemik etki göstermiştir (% 26-45,2). Çizelge incelendiğinde ekstrelerin yüksek dozlarının (500 mg/kg) anlamlı hipoglisemik etki meydana getirdiği görülecektir. Bu ekstrelerden *B. tripartita* 500 mg/kg dozda en yüksek hipoglisemik etkiyi ortaya çıkarmıştır (% 25,8). Bu etki deney süresince azalarak devam etmiştir. Dördüncü saatin sonunda yapılan ölçümde % 15,4'lük hipoglisemik etki gözlenmiştir. Tolbutamidte etki zayıf başlamış, 4. saatin sonunda maksimum seviyeye ulaşmıştır. *B. tripartita* ekstresinde ise bunun aksine etki kuvvetli başlamış, 4.saatin sonunda zayıflamıştır. Diğer *Bidens* ekstrelerinin % 11,5-17,5 arasında değişen zayıf hipoglisemik etkileri gözlenmiştir.

Çizelge 3.4. *Bidens* türlerine ait etanollü ekstrelerin normoglisemik sıçanlar üzerindeki etkisi

Deney Grubu ve Dozu	Kan Glukoz Konsantrasyonu (mg/dl) $\pm$ Standart Hata (% İnhibisyon)				
	Başlangıç	30. dakika	60. dakika	120. dakika	240. dakika
Kontrol	88,0 $\pm$ 4,98	110,19 $\pm$ 5,57	103,74 $\pm$ 5,60	99,78 $\pm$ 4,77	109,9 $\pm$ 3,56
Tolbutamit 100 mg/kg	88,0 $\pm$ 4,93	81,4 $\pm$ 1,69*** (26,1)	68,2 $\pm$ 4,06*** (34,3)	57,5 $\pm$ 3,48*** (42,4)	60,26 $\pm$ 4,33*** (45,2)
<i>B. cernua</i> var. <i>radiata</i> 250 mg/kg	84,7 $\pm$ 2,42	96,7 $\pm$ 4,56	99,3 $\pm$ 3,05	94,3 $\pm$ 3,89	90,7 $\pm$ 4,38* (17,5)
<i>B. cernua</i> var. <i>radiata</i> 500 mg/kg	79,6 $\pm$ 1,45	94,1 $\pm$ 1,60	87,1 $\pm$ 3,18* (16)	83,2 $\pm$ 2,06* (16,6)	97,2 $\pm$ 3,47* (11,5)
<i>B. tripartita</i> 250 mg/kg	88,7 $\pm$ 3,56	95,2 $\pm$ 3,51	88,7 $\pm$ 1,52* (14,5)	83,2 $\pm$ 1,05* (16,6)	97,2 $\pm$ 2,18* (11,5)
<i>B. tripartita</i> 500 mg/kg	82,2 $\pm$ 1,30	81,8 $\pm$ 3,28*** (25,8)	85,5 $\pm$ 4,17* (17,5)	79,3 $\pm$ 1,98** (20,5)	93,0 $\pm$ 4,13* (15,4)
<i>B. frondosa</i> 250 mg/kg	86,6 $\pm$ 3,32	100,8 $\pm$ 5,85	91,3 $\pm$ 2,85	96,8 $\pm$ 4,56	97,3 $\pm$ 3,77* (11,5)
<i>B. frondosa</i> 500mg/kg	85,2 $\pm$ 4,24	96,1 $\pm$ 3,04	94,5 $\pm$ 2,98	89,8 $\pm$ 4,76	96,0 $\pm$ 2,88* (11,9)

* p<0,05, ** p<0,01, ***p<0,001

Bidens türlerine ait etanollü ekstrelerin oral glukoz tolerans testi (OGTT) sonuçları Çizelge 3.5. de gösterilmiştir. Normoglisemik sıçanlar üzerinde olduğu gibi tolbutamid burada da deneyin başlangıcından itibaren artarak devam eden kuvvetli hipoglisemik etki meydana getirmiştir. *Bidens* ekstreleri glukoz yüklemesi yapıldıktan sonraki ilk ölçümde anlamlı hipoglisemik etki ortaya çıkarmışlardır (% 11,5-23,1). 60. dakikada ortaya çıkan hipoglisemik etki *B. cernua* ve *B. tripartita*' da 4. saatin sonunda da devam etmektedir. *B. frondosa*'da 120. dakikada gözlemlenen kuvvetli hipoglisemik etki daha sonra kaybolmuştur.

Çizelge 3.5. *Bidens* türlerine ait etanollü ekstrelerin glukoz hiperglisemik (OGTT) sıçanlar üzerindeki etkisi

Deney Grubu ve Dozu	Kan Glukoz Konsantrasyonu (mg/dl) $\pm$ Standart Hata (% İnhibisyon)				
	Başlangıç	30. dakika +2g/kg glukoz	60. dakika	120. dakika	240. dakika
Kontrol	85,0 $\pm$ 4,75	88,0 $\pm$ 3,94	134,2 $\pm$ 3,11	118,2 $\pm$ 5,31	95,6 $\pm$ 5,08
Tolbutamit 100 mg/kg	86,5 $\pm$ 4,30	64,6 $\pm$ 4,33** (26,6)	80,9 $\pm$ 7,51*** (39,7)	52,8 $\pm$ 4,76*** (55,3)	44,2 $\pm$ 6,90*** (53,8)
<i>B. cernua</i> var. <i>radiata</i> 250 mg/kg	96,0 $\pm$ 2,94	101,8 $\pm$ 4,19	136,5 $\pm$ 7,78	116,6 $\pm$ 5,61	85,8 $\pm$ 2,29
<i>B. cernua</i> var. <i>radiata</i> 500 mg/kg	82,2 $\pm$ 4,06	85,3 $\pm$ 4,29	103,2 $\pm$ 4,62** (23,1)	99,7 $\pm$ 2,69	77,2 $\pm$ 3,06** (19,2)
<i>B. tripartita</i> 250 mg/kg	83,2 $\pm$ 2,93	90,0 $\pm$ 3,90	118,8 $\pm$ 5,17* (11,5)	104,2 $\pm$ 5,72	81,0 $\pm$ 3,31* (15,3)
<i>B. tripartita</i> 500 mg/kg	76,7 $\pm$ 1,98	81,5 $\pm$ 1,73	117,7 $\pm$ 3,57* (11,5)	104,5 $\pm$ 2,05	75,5 $\pm$ 2,22** (21)
<i>B. frondosa</i> 250 mg/kg	97,3 $\pm$ 3,37	82,7 $\pm$ 2,40	126,8 $\pm$ 4,80* (12,1)	111,2 $\pm$ 5,17	84,8 $\pm$ 2,77
<i>B. frondosa</i> 500 mg/kg	85,0 $\pm$ 3,80	87,5 $\pm$ 5,31	136,5 $\pm$ 6,70	90,1 $\pm$ 7,80*** (23,8)	89,0 $\pm$ 3,74

* p<0,05, ** p<0,01, ***p<0,001

B. tripartita'dan çözücü-çözücü ekstraksiyonu ile elde edilen fraksiyonların normal hayvanların kan glukoz seviyeleri üzerinde herhangi bir hipoglisemik etkisi görülmemiştir. Ekstre halinde gözlemlenen etki ekstre fraksiyonlarına ayrılınca kaybolmuştur (Çizelge 3.6.).

Çizelge 3.6. *B. tripartita* alt fraksiyonlarının normoglisemik sıçanlar üzerindeki etkisi

Deney Grubu ve Dozu	Kan Glukoz Konsantrasyonu (mg/dl) $\pm$ Standart Hata (% İnhibisyon)				
	Başlangıç	30. dakika	60. dakika	120. dakika	240. dakika
Kontrol	70,67 $\pm$ 5,24	70,00 $\pm$ 1,40	63,50 $\pm$ 1,65	63,5 $\pm$ 2,56	58,33 $\pm$ 4,67
Tolbutamit 100 mg/kg	68,00 $\pm$ 1,81	55,17 $\pm$ 4,74** (21,2)	45,17 $\pm$ 3,54*** (28,9)	42,67 $\pm$ 4,86*** (32,8)	53,00 $\pm$ 7,49
Kloroform fr. 78 mg/kg	67,33 $\pm$ 0,62	74,67 $\pm$ 2,70	69,83 $\pm$ 3,10	64,67 $\pm$ 2,23	80,67 $\pm$ 8,25
Kloroform fr. 156 mg/kg	73,50 $\pm$ 3,77	76,50 $\pm$ 2,81	72,33 $\pm$ 1,28	69,33 $\pm$ 3,06	76,17 $\pm$ 3,28
Etil asetat fr. 102 mg/kg	71,67 $\pm$ 3,11	76,17 $\pm$ 2,99	72,50 $\pm$ 2,51	68,83 $\pm$ 3,67	70,17 $\pm$ 2,30
Etil asetat fr. 204 mg/kg	69,33 $\pm$ 3,99	73,50 $\pm$ 2,88	74,33 $\pm$ 3,41	64,00 $\pm$ 2,34	70,33 $\pm$ 3,58
<i>n</i> -Butanol fr. 83 mg/kg	74,83 $\pm$ 1,49	88,17 $\pm$ 3,25	81,67 $\pm$ 2,69	71,17 $\pm$ 1,33	80,50 $\pm$ 2,66
<i>n</i> -Butanol fr. 166 mg/kg	66,50 $\pm$ 1,98	76,33 $\pm$ 2,54	70,00 $\pm$ 1,39	63,83 $\pm$ 3,28	71,50 $\pm$ 5,40
Kalan su fr. 236 mg/kg	72,50 $\pm$ 1,84	80,67 $\pm$ 1,31	77,00 $\pm$ 1,57	69,17 $\pm$ 1,78	72,17 $\pm$ 3,77
Kalan su fr. 473 mg/kg	71,33 $\pm$ 1,84	87,83 $\pm$ 2,48	83,67 $\pm$ 2,20	71,17 $\pm$ 2,14	77,00 $\pm$ 3,37

* p<0,05, ** p<0,01, ***p<0,001

B. tripartita'dan çözücü-çözücü ekstraksiyonu ile elde edilen fraksiyonların OGTT sonuçları (Çizelge 3.7.) incelendiğinde tolbutamitin 4. saatin sonuna kadar artan bir hipoglisemik etki gösterdiği, kloroform, etil asetat ve kalan su fazlarının 120. ve 240. dakikada hem yüksek hem düşük dozlarının, *n*-butanol fraksiyonunun ise sadece yüksek dozunun anlamlı etki gösterdiği görülmüştür. Çizelgenin geneline bakıldığında ise tüm fraksiyonların yüksek dozlarının glukoz yüklenmiş sıçanlar üzerinde hipoglisemik etki gösterdiği görülmektedir. Bu etki etil asetat ve *n*-butanol fraksiyonlarında daha sürekli (60., 120. ve 240. dakikalar). Ana ekstrede görülen hipoglisemik etkinin fraksiyonların tamamına dağıldığı tespit edilmiştir.

Çizelge 3.7. *B. tripartita* alt fraksiyonlarının glukoz hiperglisemik (OGTT) sıçanlar üzerindeki etkisi

Deney Grubu ve Dozu	Kan Glukoz Konsantrasyonu (mg/dl) $\pm$ Standart Hata (% İnhibisyon)				
	Başlangıç	30. dakika	60. dakika	120. dakika	240. dakika
Kontrol	85,40 $\pm$ 5,15	93,2 $\pm$ 4,14	138,8 $\pm$ 2,68	134,3 $\pm$ 3,49	105,10 $\pm$ 5,09
Tolbutamit 100 mg/kg	86,0 $\pm$ 2,11	66,6 $\pm$ 2,93*** (28,5)	83,10 $\pm$ 3,23*** (40,1)	78,50 $\pm$ 3,58*** (41,5)	59,80 $\pm$ 4,77*** (43,1)
Kloroform fr. 78 mg/kg	85,00 $\pm$ 1,98	81,67 $\pm$ 3,53	142,5 $\pm$ 9,96	119,67 $\pm$ 2,98** (10,9)	88,33 $\pm$ 4,28* (15,9)
Kloroform fr. 156 mg/kg	85,00 $\pm$ 4,01	84,17 $\pm$ 2,68	137,33 $\pm$ 5,09	119,83 $\pm$ 2,99** (10,9)	91,33 $\pm$ 4,33* (13,1)
Etil asetat fr. 102 mg/kg	90,00 $\pm$ 4,57	87,83 $\pm$ 4,06	140,17 $\pm$ 4,88	103,50 $\pm$ 4,16*** (22,9)	82,50 $\pm$ 5,25** (21,5)
Etil asetat fr. 204 mg/kg	90,67 $\pm$ 4,95	81,83 $\pm$ 3,22	117,83 $\pm$ 4,37** (15,1)	113,67 $\pm$ 4,32** (15,4)	85,50 $\pm$ 3,39** (18,6)
n-Butanol fr. 83 mg/kg	84,17 $\pm$ 4,93	86,83 $\pm$ 5,65	163,17 $\pm$ 12,86	124,67 $\pm$ 6,18	86,17 $\pm$ 3,32** (18)
n-Butanol fr. 166 mg/kg	83,17 $\pm$ 2,68	85,50 $\pm$ 2,91	114,50 $\pm$ 5,50** (17,5)	118,67 $\pm$ 2,99** (11,6)	84,33 $\pm$ 2,72** (19,8)
Kalan su fr. 236 mg/kg	93,83 $\pm$ 3,83	88,50 $\pm$ 2,98	137,50 $\pm$ 7,46	117,17 $\pm$ 3,61** (12,8)	87,67 $\pm$ 3,77* (16,6)
Kalan su fr. 473 mg/kg	85,17 $\pm$ 2,02	86,33 $\pm$ 3,27	154,17 $\pm$ 8,45	119,83 $\pm$ 2,44** (10,9)	83,17 $\pm$ 1,85** (20,9)

* p<0,05, ** p<0,01, ***p<0,001

STZ ile diyabet yapılmış sıçanlar üzerinde *B. tripartita* alt fraksiyonlarının ortaya koyduğu antidiyabetik etki Çizelge 3.8. de görülmektedir. Kalan su fraksiyonu dışındaki fraksiyonların yüksek dozlarında anlamlı antihiperglisemik etki belirlenmiştir. *n*-Butanol fraksiyonu 166 mg/kg dozda en yüksek antidiyabetik etkiyi meydana getirmiştir. Bu etki 4. saatin sonunda en üst düzeye çıkmıştır (% 47,3). Etki görülen başka bir fraksiyon ise etil asetatın yüksek dozudur. % 10,6 ile başlayan antidiyabetik etki 4. saat ölçümünde % 29,1'e çıkmıştır. Kloroform fraksiyonu ise zayıf hipoglisemik etki meydana getirmiştir (% 9,4-21,5).

Çizelge 3.8. *B. tripartita* alt fraksiyonlarının diyabetik sıçanlar üzerindeki akut etkisi

Deney Grubu ve Dozu	Kan Glukoz Konsantrasyonu (mg/dl) $\pm$ Standart Hata (% İnhibisyon)				
	Başlangıç	30. dakika	60. dakika	120. dakika	240. dakika
Kontrol	388,0 $\pm$ 5,40	377,7 $\pm$ 6,75	351,5 $\pm$ 2,50	327,0 $\pm$ 15,0	300,0 $\pm$ 6,5
Tolbutamit 100mg/kg	381,0 $\pm$ 4,25	369,0 $\pm$ 14,65	341,0 $\pm$ 10,50	331,0 $\pm$ 14,0	265,0 $\pm$ 13,0* (11,7)
Kloroform fr. 78 mg/kg	376,0 $\pm$ 8,6	375,5 $\pm$ 7,2	363,2 $\pm$ 6,4	355,6 $\pm$ 11,5	336,8 $\pm$ 13,4
Kloroform fr. 156 mg/kg	391,0 $\pm$ 13,9	328,8 $\pm$ 13,6	312,6 $\pm$ 12,90* (11,1)	294,6 $\pm$ 16,70 (9,4)	235,4 $\pm$ 11,21** (21,5)
Etil asetat fr. 102 mg/kg	388,0 $\pm$ 3,9	395,0 $\pm$ 5,8	363,0 $\pm$ 9,5	345,0 $\pm$ 10,4	314,3 $\pm$ 11,2
Etil asetat fr. 204 mg/kg	371,8 $\pm$ 15,59	337,8 $\pm$ 16,0 (10,6)	338,6 $\pm$ 15,0	272,4 $\pm$ 18,0* (16,7)	212,6 $\pm$ 9,07*** (29,1)
n-Butanol fr. 83 mg/kg	380,0 $\pm$ 10,5	412,0 $\pm$ 6,8	374,0 $\pm$ 6,5	395,0 $\pm$ 7,8	268,0 $\pm$ 7,6
n-Butanol fr. 166 mg/kg	375,0 $\pm$ 15,0	338,4 $\pm$ 19,0 (10,4)	293,2 $\pm$ 5,0*** (16,6)	255,2 $\pm$ 9,4** (21,9)	158,2 $\pm$ 5,89*** (47,3)
Kalan su fr. 236 mg/kg	380,0 $\pm$ 6,7	380,0 $\pm$ 7,2	342,0 $\pm$ 8,5	334,0 $\pm$ 8,9	290,0 $\pm$ 10,5
Kalan su fr. 473 mg/kg	378,0 $\pm$ 14,0	415,5 $\pm$ 15,7	354,0 $\pm$ 18,0	325,5 $\pm$ 12,0	273,5 $\pm$ 19,5

* p<0,05, ** p<0,01, ***p<0,001

STZ ile diyabet oluşturulmuş sıçanlara subakut uygulanan fraksiyonların ortaya çıkardığı antidiyabetik etki Çizelge 3.9. da görülmektedir. Akut deneyde etkili bulunan yüksek dozların subakut uygulamada kan glukoz düzeyleri üzerine etkisi incelendiğinde kloroform ve kalan su fraksiyonlarının etkisiz olduğu, etil asetat ve *n*-butanol fraksiyonlarının ise kontrol grubuyla karşılaştırıldığında ilk günden itibaren etkili olduğu 8. günde ise her iki fraksiyonun da anlamlı antidiyabetik etki gösterdiği görülmüştür. Subakut antidiyabetik etki etil asetat fraksiyonunun uygulandığı grupta 8. gün ölçümünde tespit edilmiştir (% 13,9). Aynı şartlarda *n*-butanol fraksiyonu % 10-12,5 oranında bir etki ortaya çıkarmıştır.

Çizelge 3.9. *B. tripartita* alt fraksiyonlarının diyabetik sıçanlar üzerindeki subakut etkisi

Deney Grubu ve Dozu	Kan Glukoz Konsantrasyonu (mg/dl) $\pm$ Standart Hata (% İnhibisyon)		
	1. Gün	4. Gün	8. Gün
Kontrol	388,5 $\pm$ 5,4	424,5 $\pm$ 20,0	372,0 $\pm$ 10,09
Tolbutamit 100 mg/kg	381,0 $\pm$ 4,25	456,0 $\pm$ 16,0	447,0 $\pm$ 19,0
Kloroform fr. 156 mg/kg	391,0 $\pm$ 13,9	385,0 $\pm$ 18,0	379,6 $\pm$ 15,0
Etil asetat fr. 204 mg/kg	371,8 $\pm$ 15,59	396,0 $\pm$ 17,5 (6,71)	320,2 $\pm$ 17,0* (13,9)
<i>n</i>-Butanol fr. 166 mg/kg	375,0 $\pm$ 15,0	371,5 $\pm$ 15,4* (12,5)	333,0 $\pm$ 8,5* (10,5)
Kalan su fr. 473 mg/kg	378,0 $\pm$ 14,0	425,0 $\pm$ 16,0	392,5 $\pm$ 14,9

* p<0,05, ** p<0,01, ***p<0,001

Fraksiyonlar ile yapılan subakut uygulama esnasında diyabetik sıçanların vücut ağırlıklarındaki değişimler de kayıt altına alınmıştır. Çizelge 3.10. da görüldüğü üzere *n*-butanol ve kalan su fraksiyonları uygulanan hayvanların vücut ağırlıklarında başlangıca göre bir azalma görülürken kontrol, tolbutamit, kloroform ve etil asetat gruplarında vücut ağırlığı artmıştır. Bu artış kontrol ve tolbutamit gruplarında üst seviyededir (% 9,5). En büyük azalma ise *n*-butanol grubunda görülmüştür (% 3,2).

Çizelge 3.10. *B. tripartita* alt fraksiyonlarının diyabetik sıçanların vücut ağırlığı üzerindeki subakut etkisi

Deney Grubu ve Dozu	Vücut Ağırlıkları $\pm$ Standart Hata (% Değişim)		
	1. Gün	4. Gün	8. Gün
Kontrol	173,5 $\pm$ 11,0	182,6 $\pm$ 6,0 (+5,2)	190,3 $\pm$ 4,2 (+9,5)
Tolbutamit 100 mg/kg	170,0 $\pm$ 6,2	179,2 $\pm$ 5,4 (+5,4)	186,0 $\pm$ 4,4 (+9,4)
Kloroform fr. 156 mg/kg	176,0 $\pm$ 7,1	181,0 $\pm$ 3,6 (+3,12)	185,0 $\pm$ 5,2 (+5,1)
Etil asetat fr. 204 mg/kg	173,0 $\pm$ 2,4	176,1 $\pm$ 3,4 (+1,8)	176,3 $\pm$ 4,6 (+1,8)
<i>n</i>-Butanol fr. 166 mg/kg	172,5 $\pm$ 3,2	167,0 $\pm$ 4,1 (-3,2)	168,1 $\pm$ 3,8 (-3,2)
Kalan su fr. 473 mg/kg	170,0 $\pm$ 2,4	173,0 $\pm$ 5,2 (+1,76)	169,2 $\pm$ 4,4 (-0,5)

3.2. Asetilkolinesteraz Enzim İnhibitör Aktivite Bulguları

Test edilen ekstrelerden hiçbirinde asetilkolinesteraz inhibitör aktivite görülmemiştir. Test edilen konsantrasyonlar ve sonuçlar Çizelge 3.11. de gösterilmiştir.

Çizelge 3.11. *Bidens* türlerine ait etanollü ve sulu ekstrelerin asetilkolinesteraz enzim inhibitör aktivite sonuçları

Deney grubu ve Konsantrasyonu		Asetilkolinesteraz Enzim İnhibisyonu (%İnhibisyon±Standart sapma)			
		25 µg/ml	50 µg/ml	100 µg/ml	200 µg/ml
<i>B. cernua</i> <i>var. radiata</i>	EtOH	-	-	-	-
	Su	-	-	-	-
<i>B. frondosa</i>	EtOH	-	-	-	-
	Su	-	-	-	-
<i>B. tripartita</i>	EtOH	-	4,29±1,59	-	-
	Su	-	-	-	-
Galantamin (Referans)				93,93±0,07	TE

-: İnhibisyon gözlenmedi, TE: Test edilmedi

3.3. Antioksidan Aktivite Bulguları

Yapılan antioksidan aktivite çalışmalarında test edilen ekstreler referans bileşikler olan kersetin ve EDTA'ya göre daha zayıf etki göstermişlerdir. Ekstreler içerisinde *B. tripartita* türüne ait etanollü ekstre, 2000 µg/ml konsantrasyonda en yüksek radikal süpürücü etkiye yol açmıştır. Bu sonuç antidiyabetik aktivite bulgularıyla bir korelasyon göstermektedir (Çizelge 3.12.-3.13.). Bundan sonraki antioksidan aktivite çalışmaları *B. tripartita* alt fraksiyonları üzerinde yürütülmüştür.

Çizelge 3.12. *Bidens* türlerine ait etanollü ve sulu ekstrelerin DPPH radikal süpürücü aktivite sonuçları

Deney Grubu ve Konsantrasyonu		DPPH Serbest Radikal Süpürücü Etki (%Süpürme±Standart sapma)			
		250 µg/ml	500 µg/ml	1000 µg/ml	2000 µg/ml
<i>B. cernua</i> <i>var. radiata</i>	EtOH	13,21±2,48	22,35±5,62	40,86±0,07	63,12±2,64
	Su	5,07±0,20	4,64±1,21	14,02±0,27	26,15±4,71
<i>B. frondosa</i>	EtOH	6,01±1,14	9,09±1,74	20,36±0,40	53,72±2,19
	Su	-	-	-	10,98±2,70
<i>B. tripartita</i>	EtOH	7,39±0,40	18,94±2,54	33,76±1,94	66,51±4,84
	Su	-	3,84±0,60	8,71±0,94	21,00±1,19
Kersetin (Referans)				90,13±0,31	TE

-: Etki gözlenmedi, TE: Test edilmedi

Analizi yapılan ekstreler içinde *B. tripartita* sulu ekstresi kaydadeğer aktivite (Çizelge 3.13.) göstermiştir.

Çizelge 3.13. *Bidens* türlerine ait etanollü ve sulu ekstrelerin metal-şelasyon kapasiteleri

Deney Grubu ve Konsantrasyonu		Metal Şelasyon Etki (%Şelasyon±Standart sapma)			
		250 µg/ml	500 µg/ml	1000 µg/ml	2000 µg/ml
<i>B. cernua</i> <i>var. radiata</i>	EtOH	-	-	-	20,26±2,18
	Su	12,37±0,34	-	-	33,91±1,19
<i>B. frondosa</i>	EtOH	7,87±0,34	7,14±2,16	10,12±0,39	28,86±0,66
	Su	20,48±3,09	7,21±1,37	11,23±0,20	8,10±3,46
<i>B. tripartita</i>	EtOH	-	-	-	10,58±3,87
	Su	-	-	12,13±0,29	51,06±1,93
EDTA (Referans)					96,21±0,13

-: Etki gözlenmedi

Test edilen konsantrasyonlarda, *B. tripartita*'nın etil asetat (% 88,99±0,07) ve *n*-BuOH (% 85,25±0,55) alt fraksiyonları konsantrasyon-bağımlı olarak en yüksek radikal süpürücü etkiyi göstermiştir. Kalan su alt fraksiyonu da % 50'nin üzerinde olmak üzere (% 58,20±2,59) dikkate değer radikal süpürücü etkiye yol açmıştır (Çizelge 3.14.).

Çizelge 3.14. *B. tripartita* alt fraksiyonlarının DPPH radikal süpürücü aktivite ve metal şelasyon kapasiteleri

		DPPH Serbest Radikal Süpürücü Etki (%Süpürme±S.S.*)				Metal Şelasyon Etki (%Şelasyon±S.S.*)			
		250 µg/ml	500 µg/ml	1000 µg/ml	2000 µg/ml	250 µg/ml	500 µg/ml	1000 µg/ml	2000 µg/ml
<i>Bidens tripartita</i>	Kloroform	7,48±2,34	14,50±1,61	22,61±1,34	38,38±0,53	5,98±1,73	7,93±1,73	4,83±0,21	-**
	Etil asetat	60,11±1,06	82,35±0,13	87,52±0,33	88,99±0,07	-	-	-	-
	<i>n</i> -BuOH	24,72±3,17	40,06±1,46	67,51±2,53	85,25±0,55	-	-	-	-
	Kalan su	11,48±0,48	18,79±2,77	30,73±3,09	58,20±2,59	-	-	-	14,79±3,93
Referans	Kersetin			90,95±0,18	***				
	EDTA							61,87±4,69	***

*Standart sapma, ** Etki gözlenmedi, ***Test edilmedi

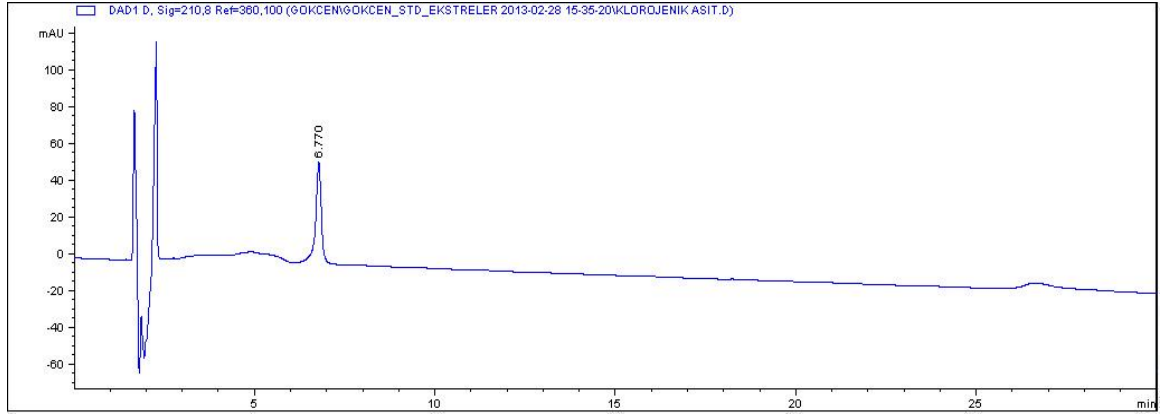
3.4. Teşhis ve Miktar Tayini Bulguları

Teşhis ve miktar tayini bulguları sırasıyla standart maddelerimize ait HPLC kromatogramları, araştırmamıza konu olan *Bidens* türlerinin etanollü ve sulu ekstrelerinin HPLC analizlerinden elde edilen kromatogramlar, *B. tripartita* fraksiyonlarına ait HPLC kromatogramları ve Kütle Spektrometresi (SIM-Pozitif Mod) bulguları verilmiştir.

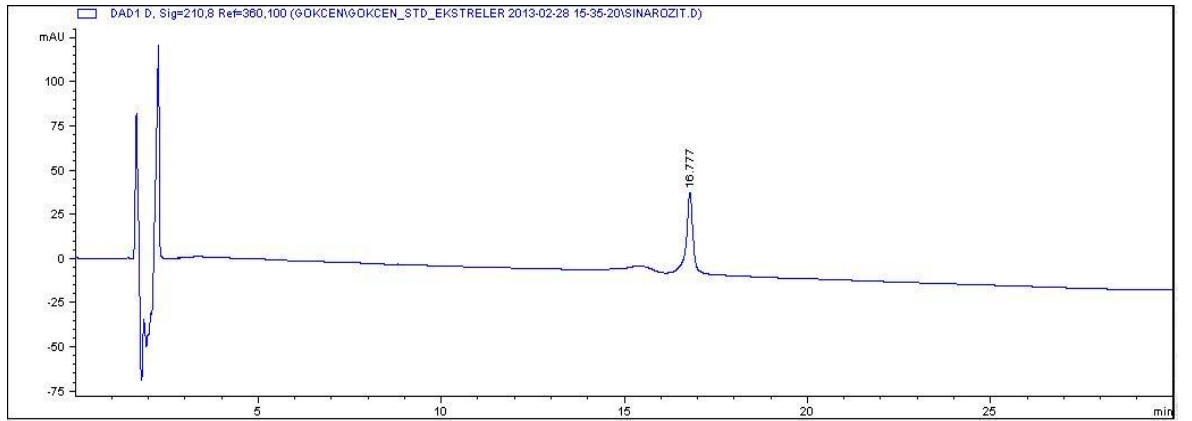
Analiz şartlarında referans maddeler için alıkonma zamanları klorojenik asit: 6,770 dak., luteolin-7-O-glukozit (sinarozit): 16,777 dak., luteolin: 29,586 dakika olarak bulunmuştur (Şekil 3.1.-3.3.).

Referans maddelerin etanollü ekstreler ve fraksiyonlar içerisindeki teşhisleri ve miktar tayinleri retansiyon zamanları, kütle spektrumları karşılaştırılarak yapılmıştır. Bu bulgulara ait kromatogramlar Şekil 3.4.-3.14. de verilmiştir. Kütle spektrumlarında tespit edilen ve referans madde ile örtüşen piklere ait kütle parçalanmaları Şekil 3.15.-3.22. de verilmiştir. Referans maddelere ait UV spektrumları, ekstreler ve fraksiyonlar içerisindeki tespit edilen maddelere ait piklerin UV spektrumları ile karşılaştırılmış ve sonuçlar doğrulanmıştır. Bu analizlere ait, spektrumlar Şekil 2.23.-3.37.'de verilmiştir. Ekstre ve fraksiyonlarımızda tespit edilen klorojenik asit, luteolin-7-O-glukozit (sinarozit) ve luteolin miktarları Çizelge 3.15.'de mg/ml cinsinden türlerin içerdiği toplam madde miktarları ise % verimleri hesaba katılarak ağırlık/ağırlık cinsinden Çizelge 3.16.'da gösterilmiştir.

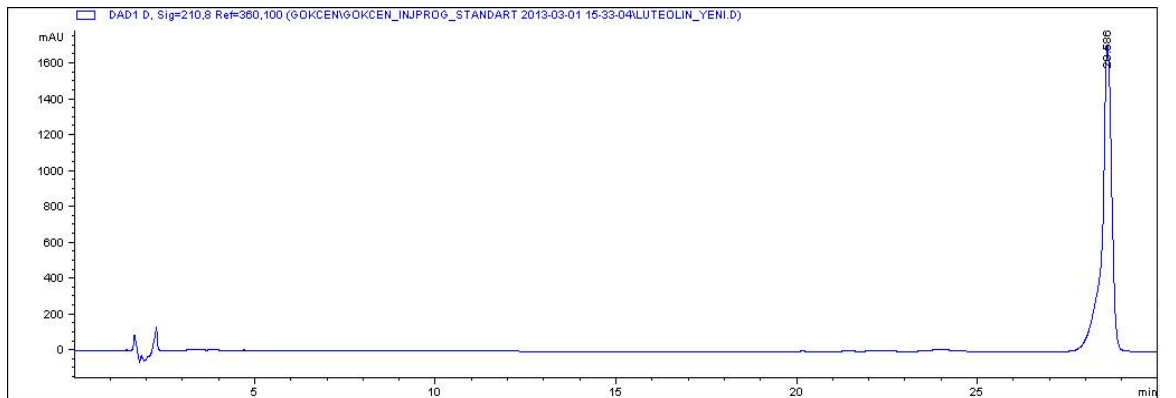
Analitik validasyon ile ilgili bulgular Çizelge 3.17.-3.20. ve kalibrasyon grafikleri Şekil 3.38.' de sunulmuştur.



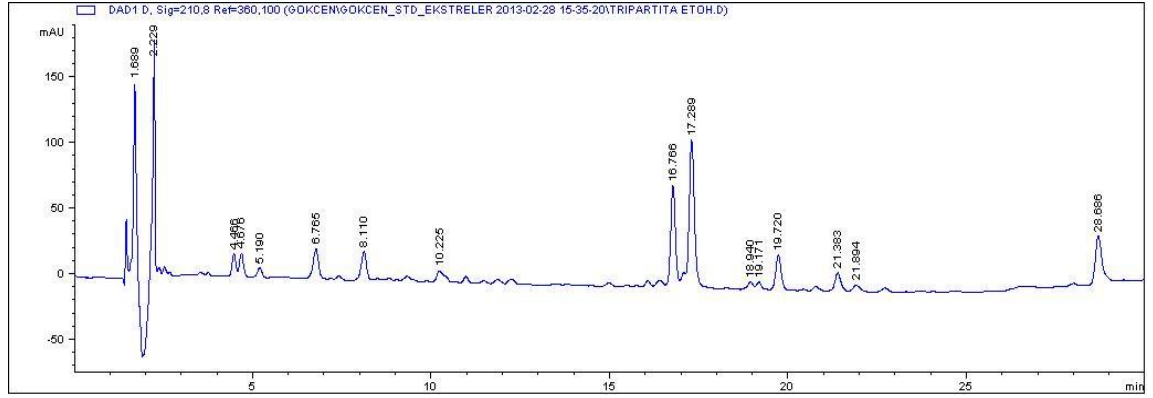
Şekil 3.1. Klorojenik asit HPLC kromatogramı



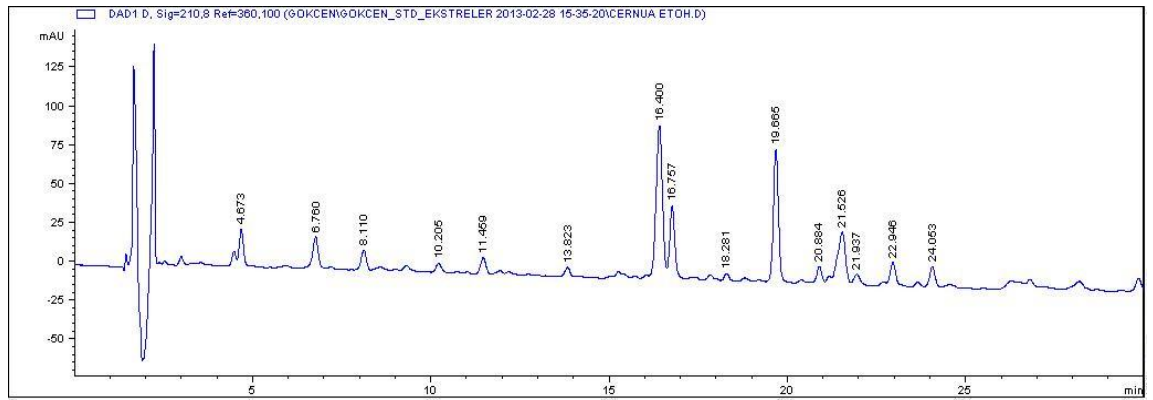
Şekil 3.2. Luteolin-7-O-glukozit (Sinarozit) HPLC kromatogramı



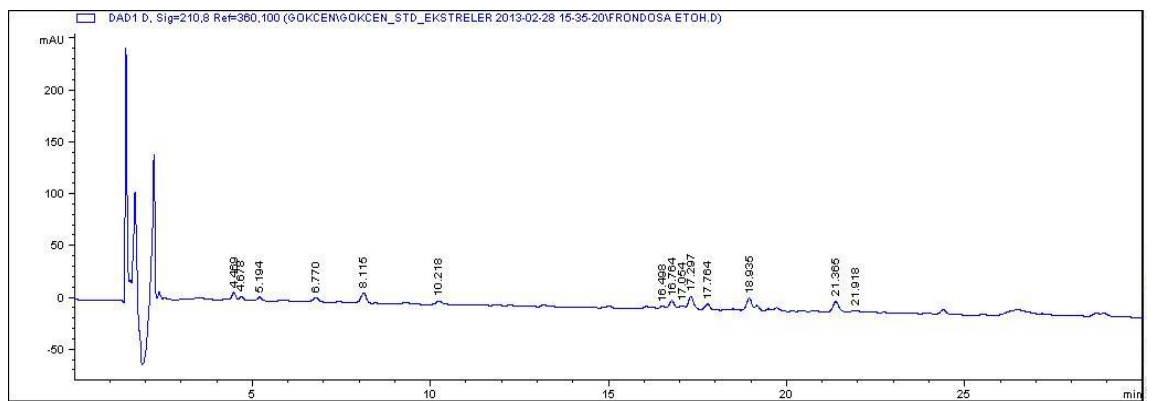
Şekil 3.3. Luteolin HPLC kromatogramı



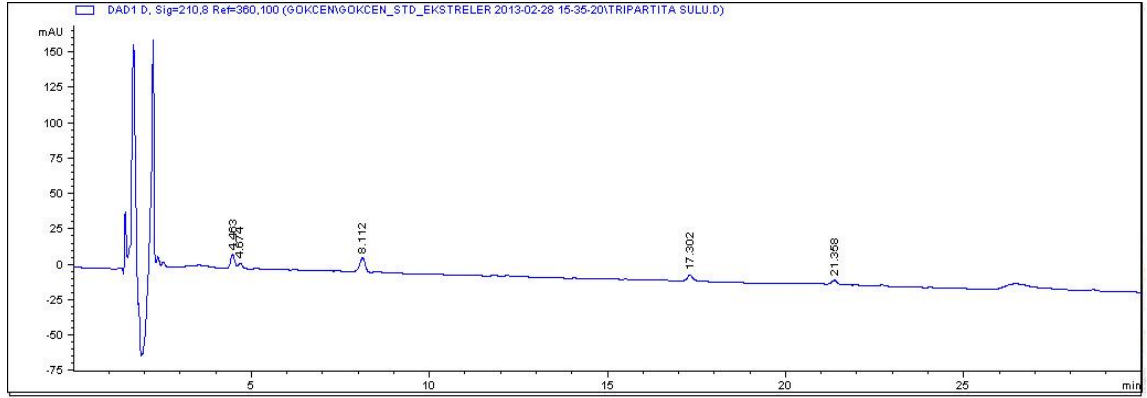
Şekil 3.4. *B. tripartita* etanol ekstresi HPLC kromatogramı



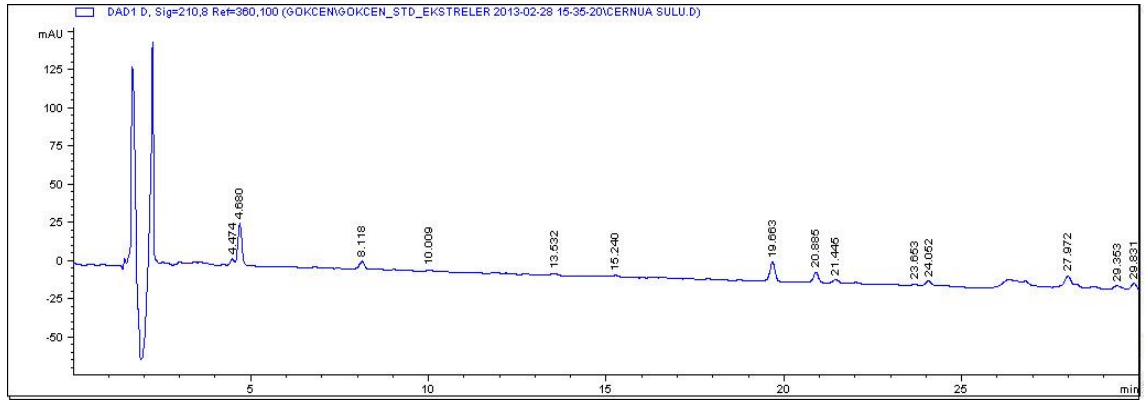
Şekil 3.5. *B. cernua* var. *radiata* etanol ekstresi HPLC kromatogramı



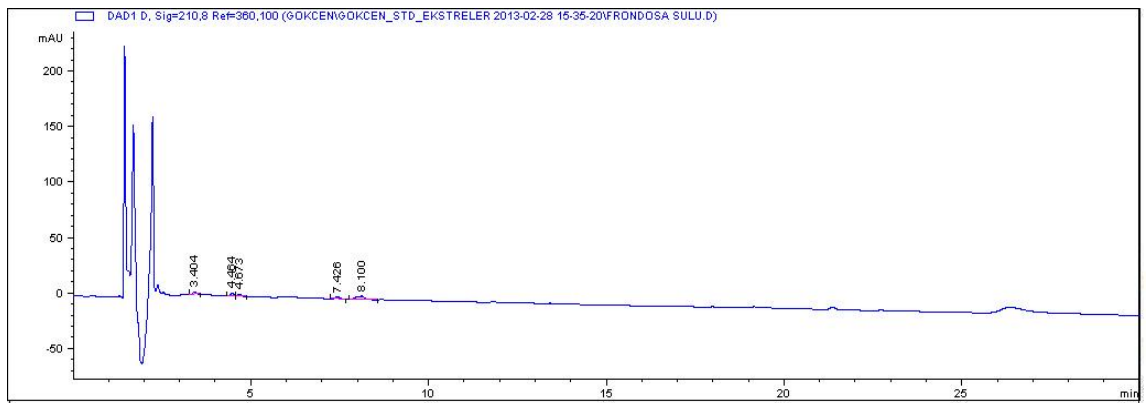
Şekil 3.6. *B. frondosa* etanol ekstresi HPLC kromatogramı



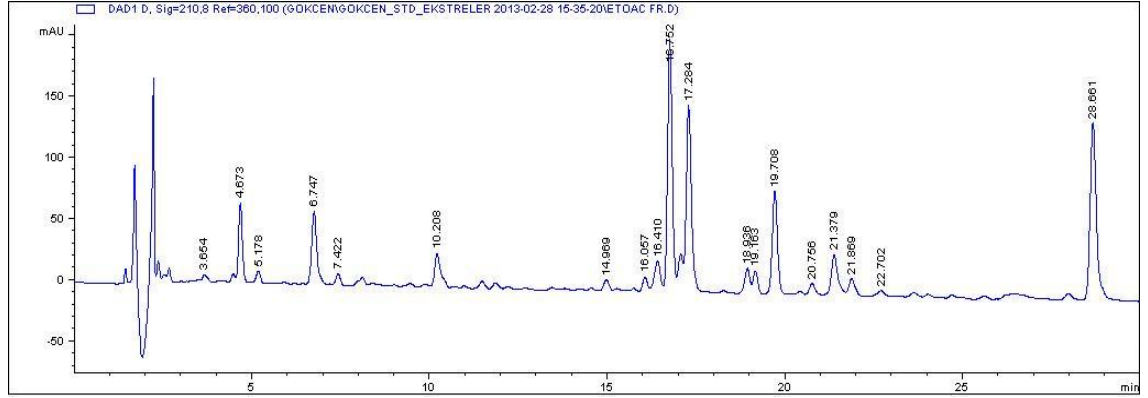
Şekil 3.7. *B. tripartita* sulu ekstresi HPLC kromatogramı



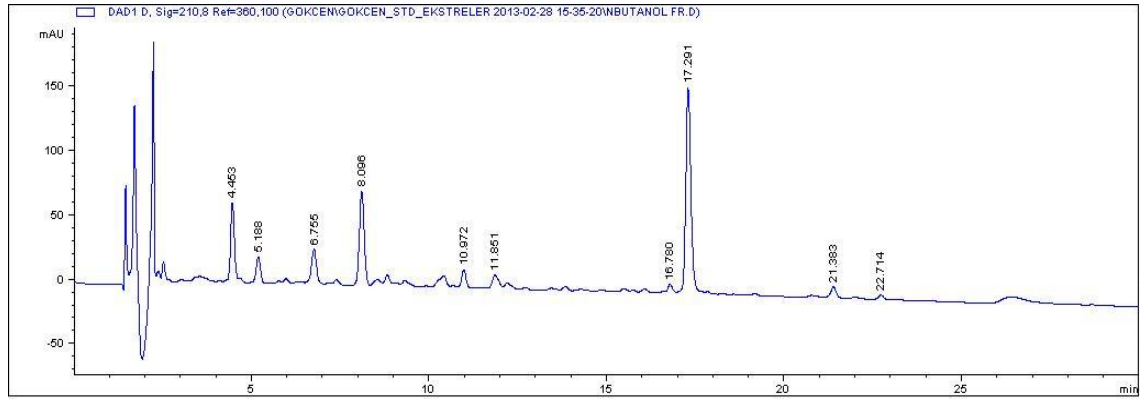
Şekil 3.8. *B. cernua* var. *radiata* sulu ekstresi HPLC kromatogramı



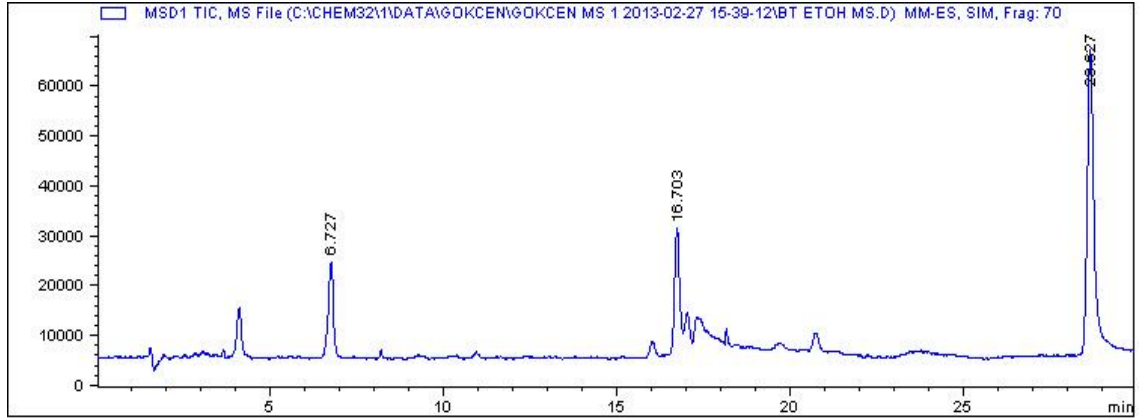
Şekil 3.9. *B. frondosa* sulu ekstresi HPLC kromatogramı



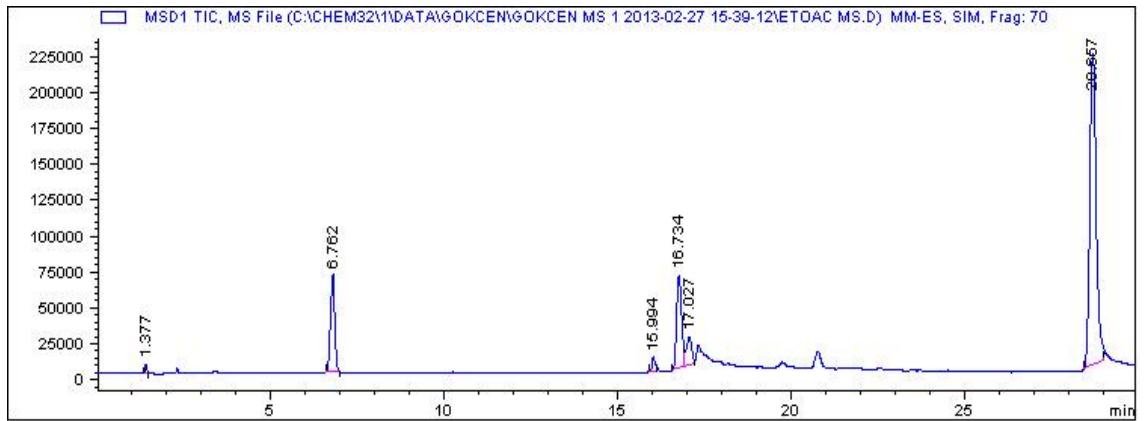
Şekil 3.10. EtOAc fraksiyonu HPLC kromatogramı



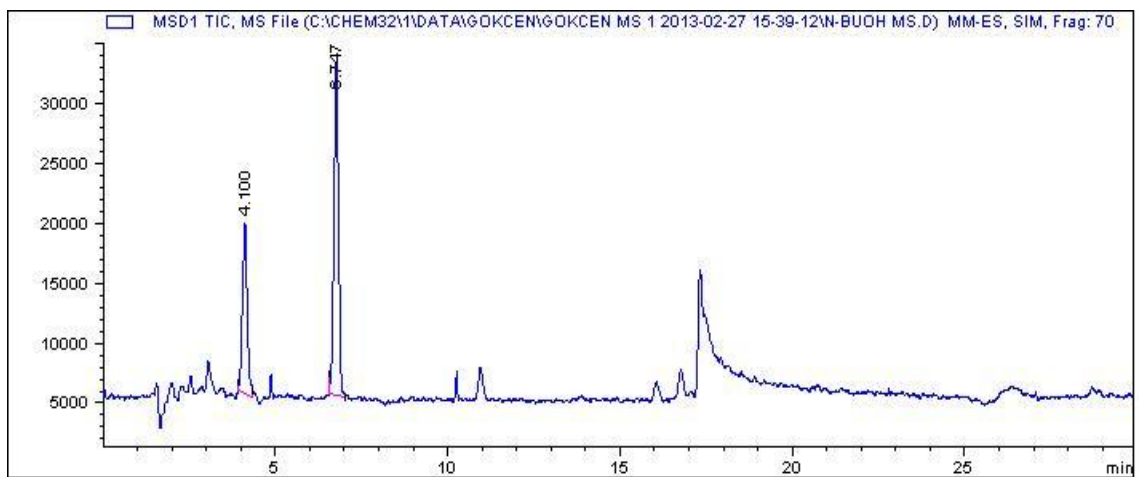
Şekil 3.11. *n*-BuOH fraksiyonu HPLC kromatogramı



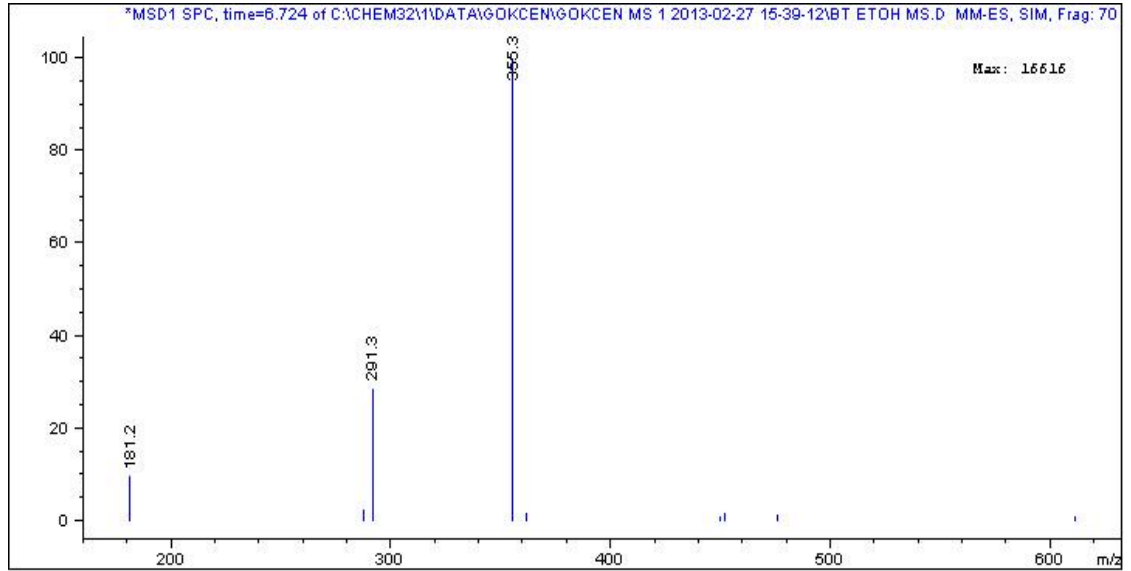
Şekil 3.12. *B. tripartita* etanol ekstresi LC-MS SIM tarama



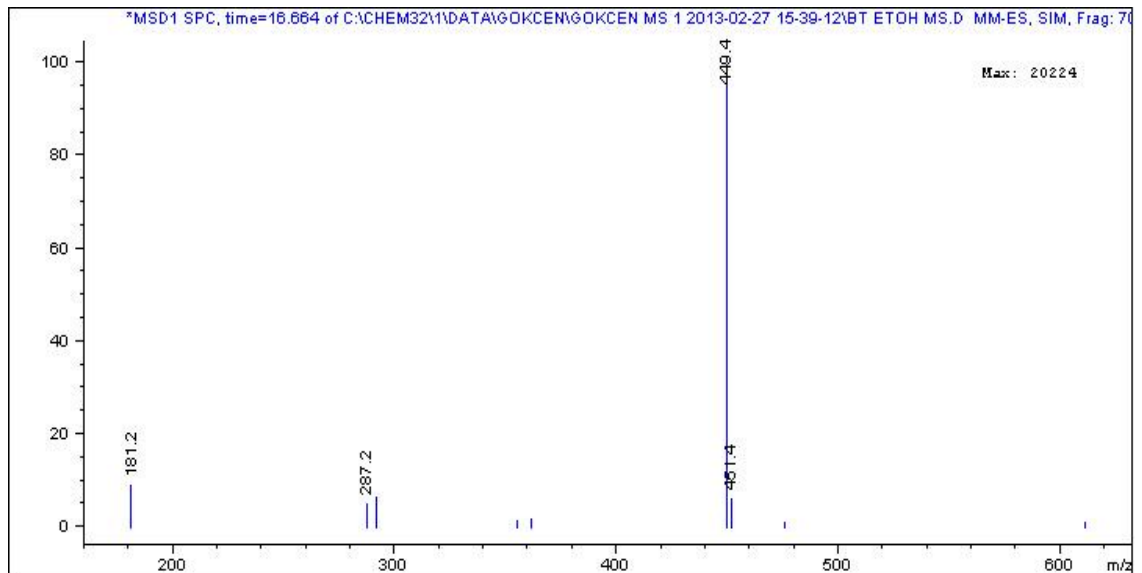
Şekil 3.13. EtOAc fraksiyonu LC-MS SIM tarama



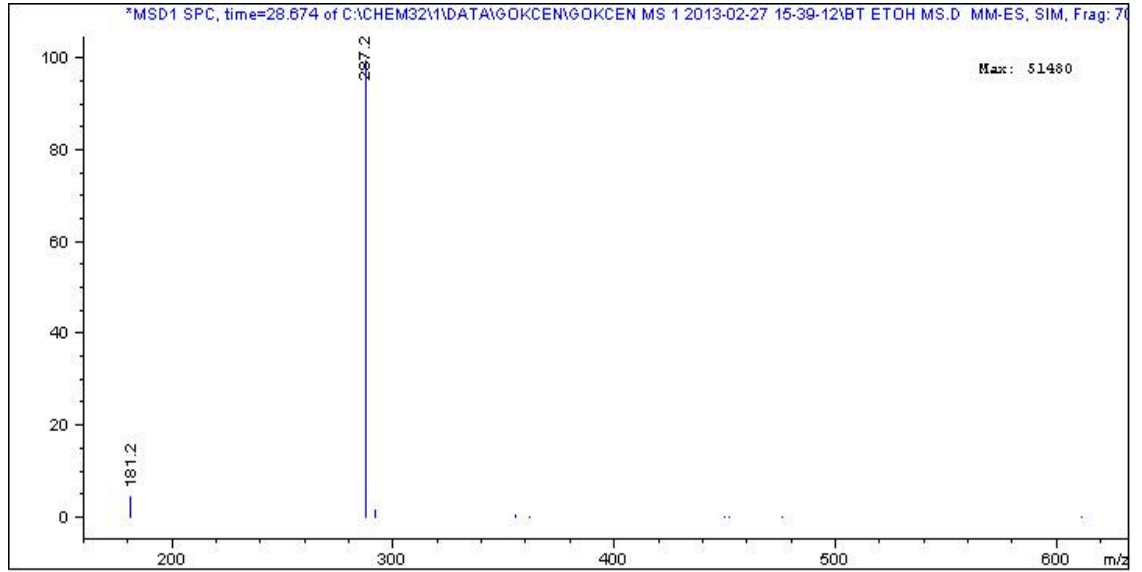
Şekil 3.14. *n*-BuOH fraksiyonu LC-MS SIM tarama



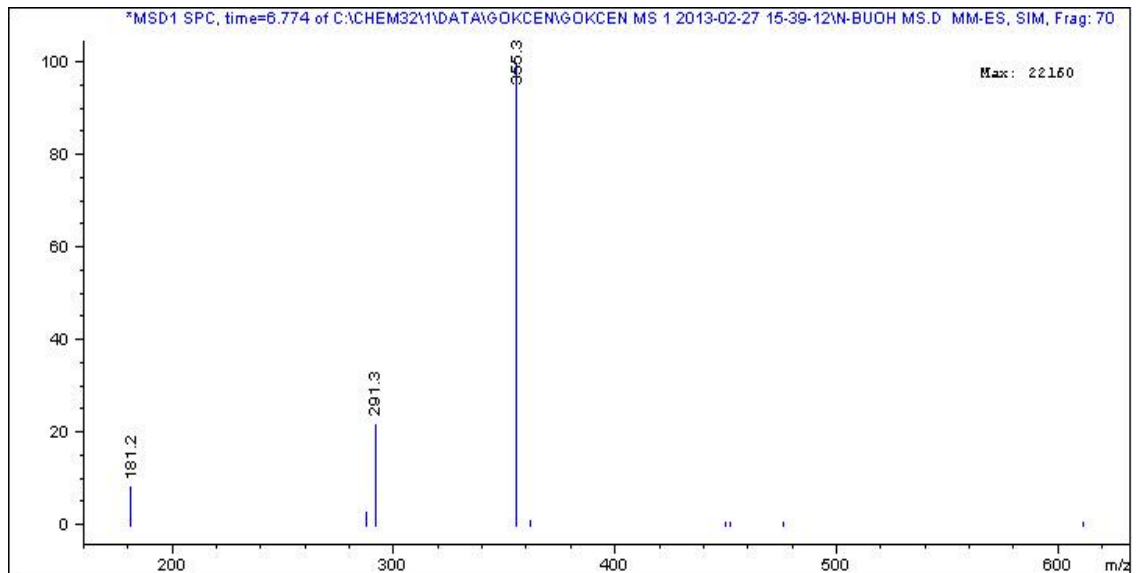
Şekil 3.15. *B. tripartita* etanol ekstresi klorojenik asit kütle parçalanması M^{+1} (Pozitif MOD)



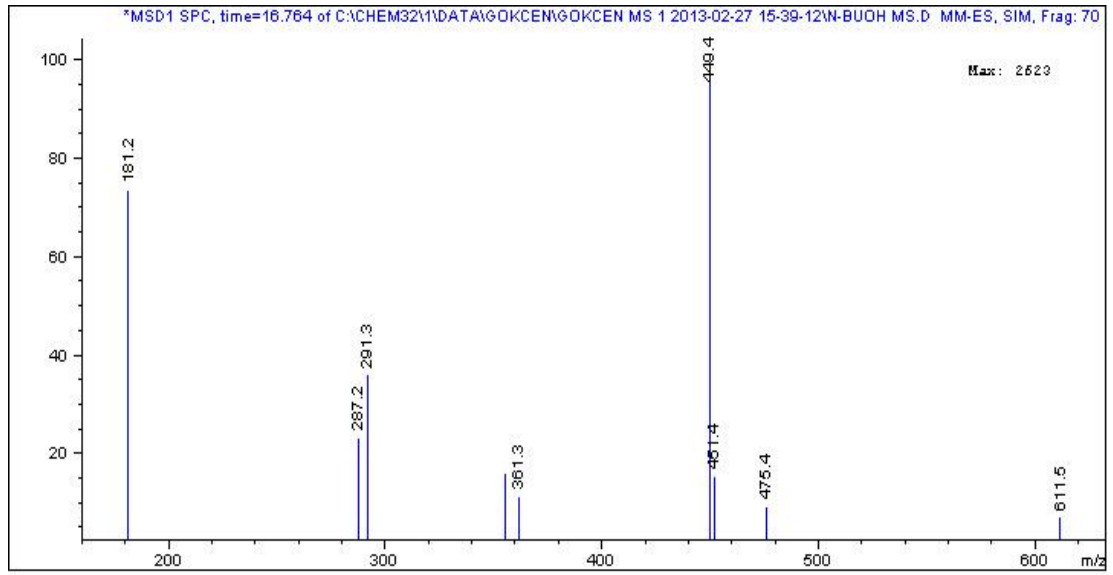
Şekil 3.16. *B. tripartita* etanol ekstresi luteolin-7-O-glukozit (sinarozit) kütle parçalanması M^{+1} (Pozitif MOD)



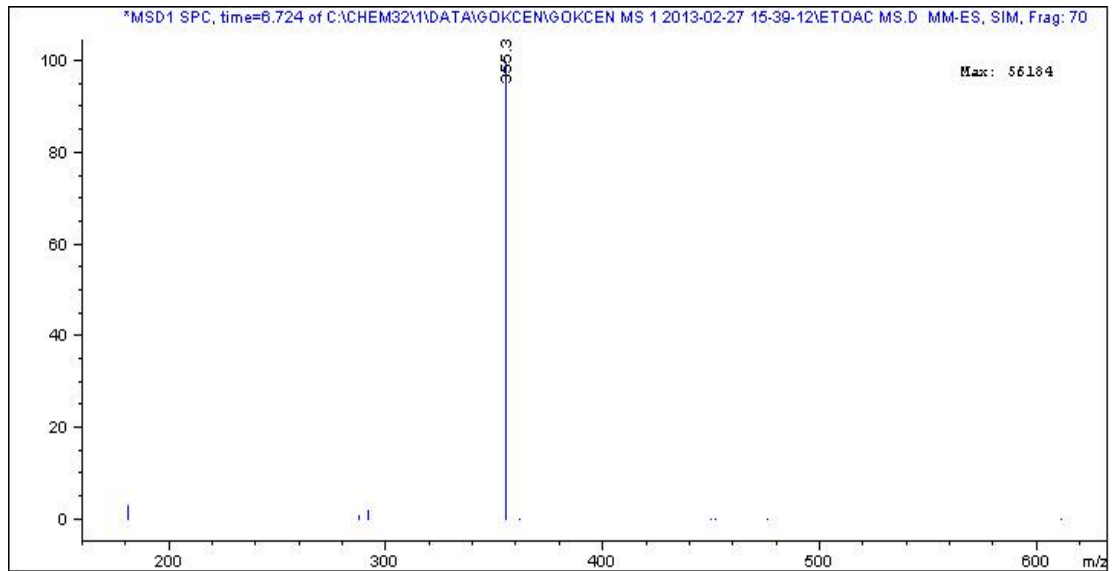
Şekil 3.17. *B. tripartita* etanol ekstresi luteolin kütle parçalanması M^{+1} (Pozitif MOD)



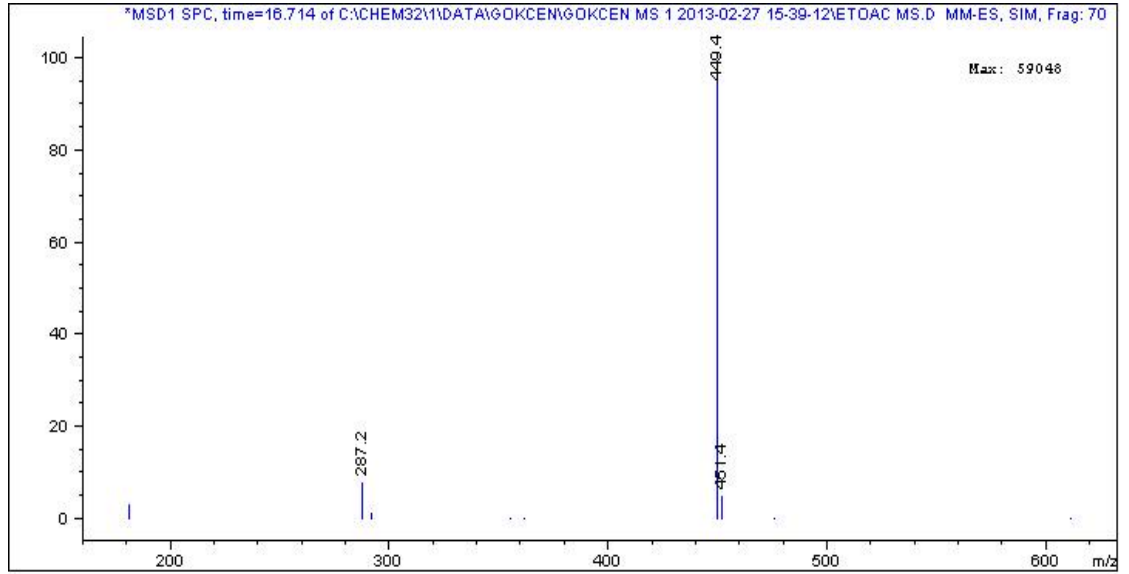
Şekil 3.18. *n*-BuOH fraksiyonu klorojenik asit kütle parçalanması M^{+1} (Pozitif MOD)



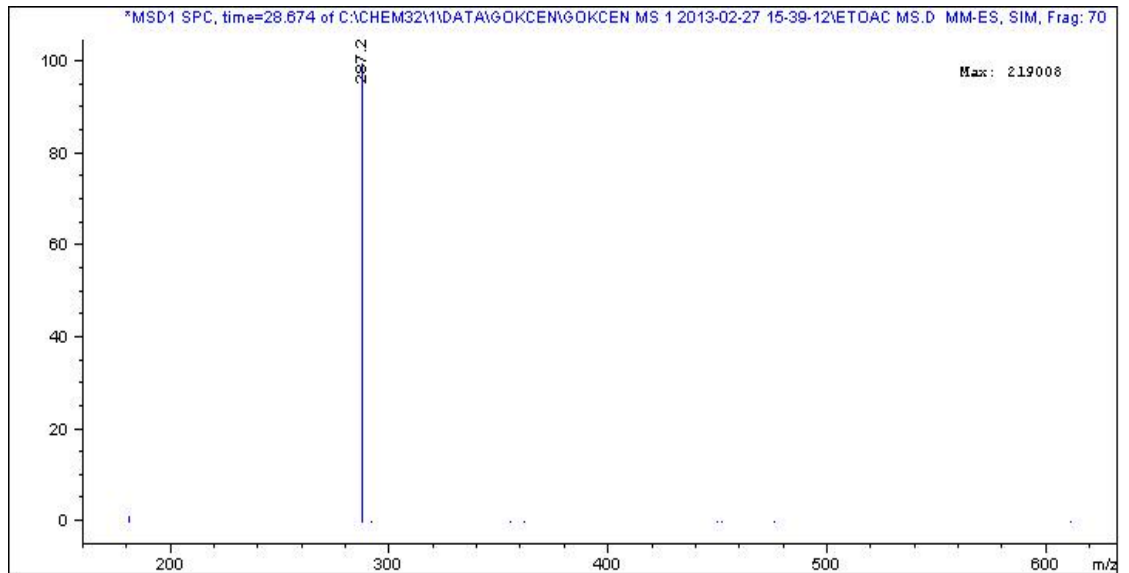
Şekil 3.19. *n*-BuOH fraksiyonu luteolin-7-O-glikozit (sinarozit) kütle parçalanması M^{+1} (Pozitif MOD)



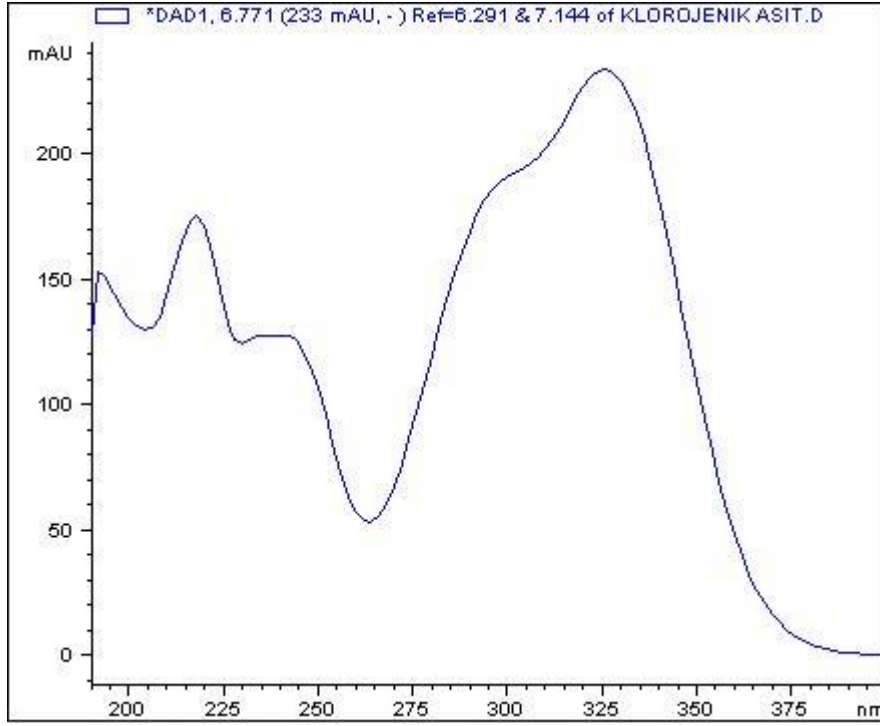
Şekil 3.20. EtOAc fraksiyonu klorojenik asit kütle parçalanması M^{+1} (Pozitif MOD)



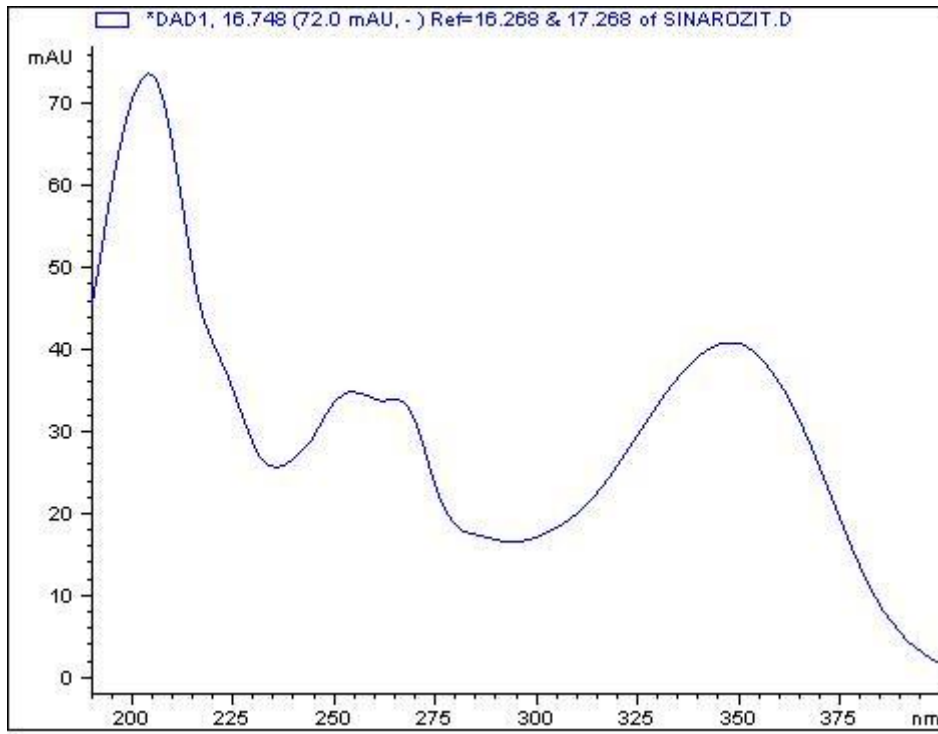
Şekil 3.21. EtOAc fraksiyonu luteolin-7-O-glukozit (sinarozit) kütle parçalanması M^{+1} (Pozitif MOD)



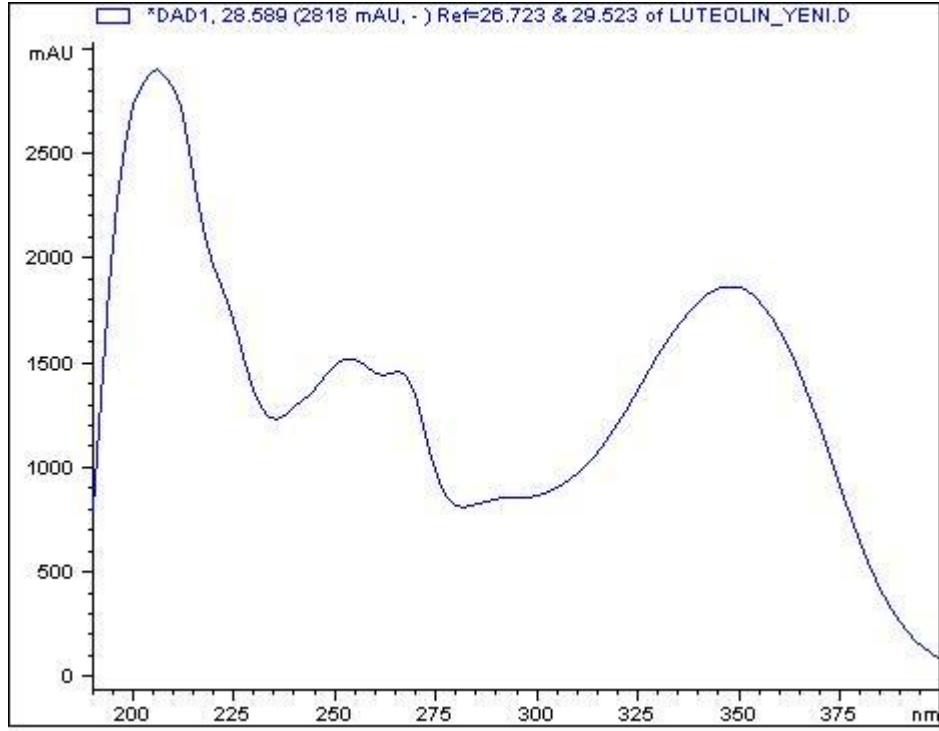
Şekil 3.22. EtOAc fraksiyonu Luteolin kütle parçalanması M^{+1} (Pozitif MOD)



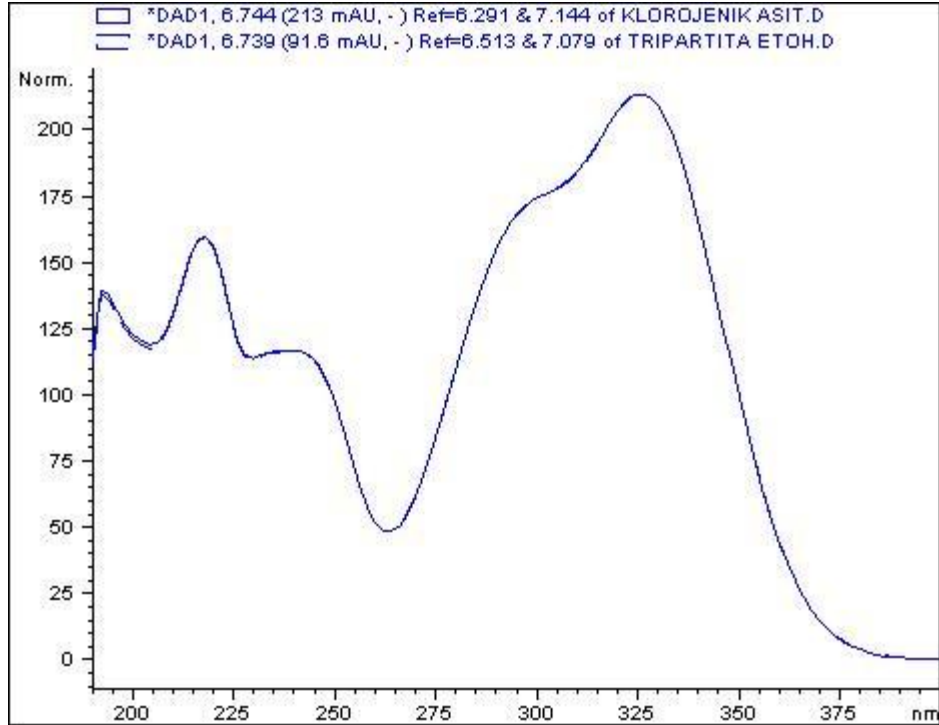
Şekil 3.23. Klorojenik asit UV spektrumu



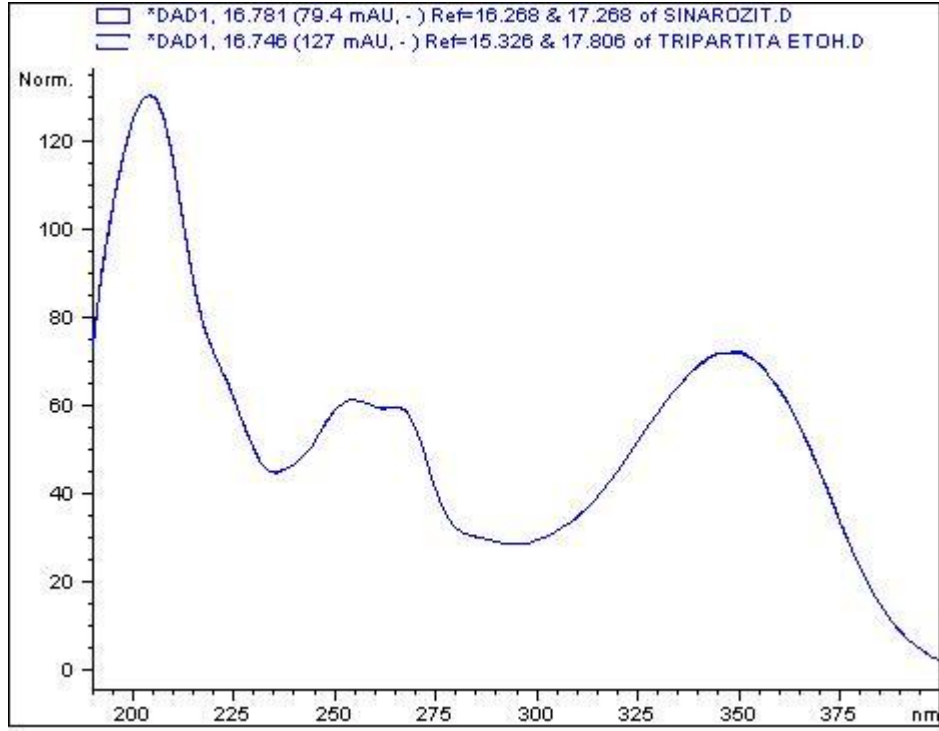
Şekil 3.24. Luteolin-7-O-glukozit (Sinarozit) UV spektrumu



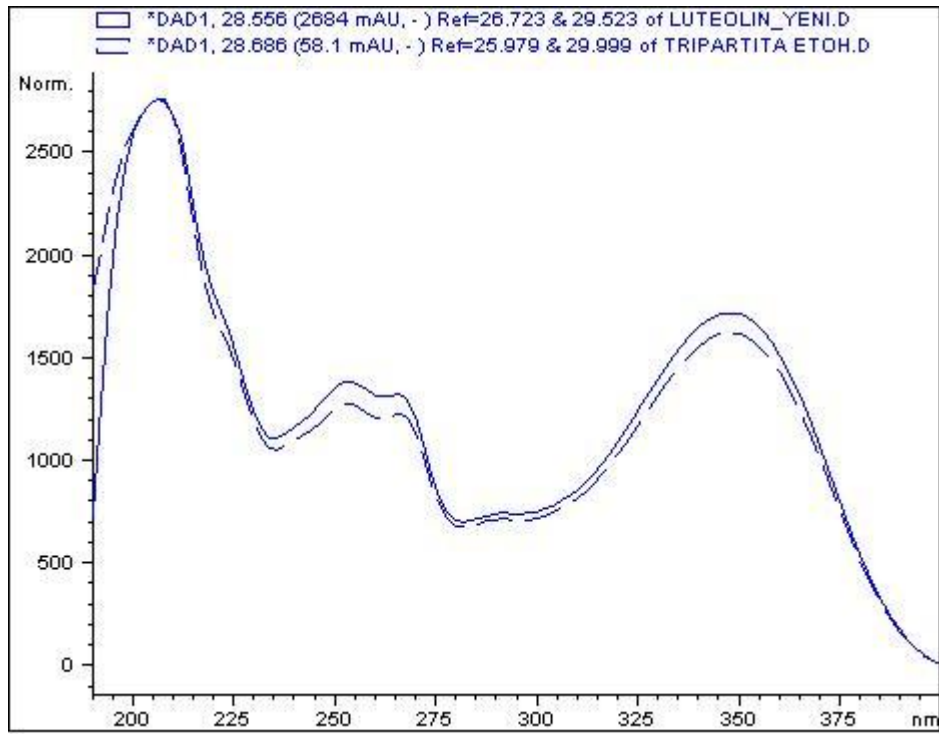
Şekil 3.25. Luteolin UV spektrumu



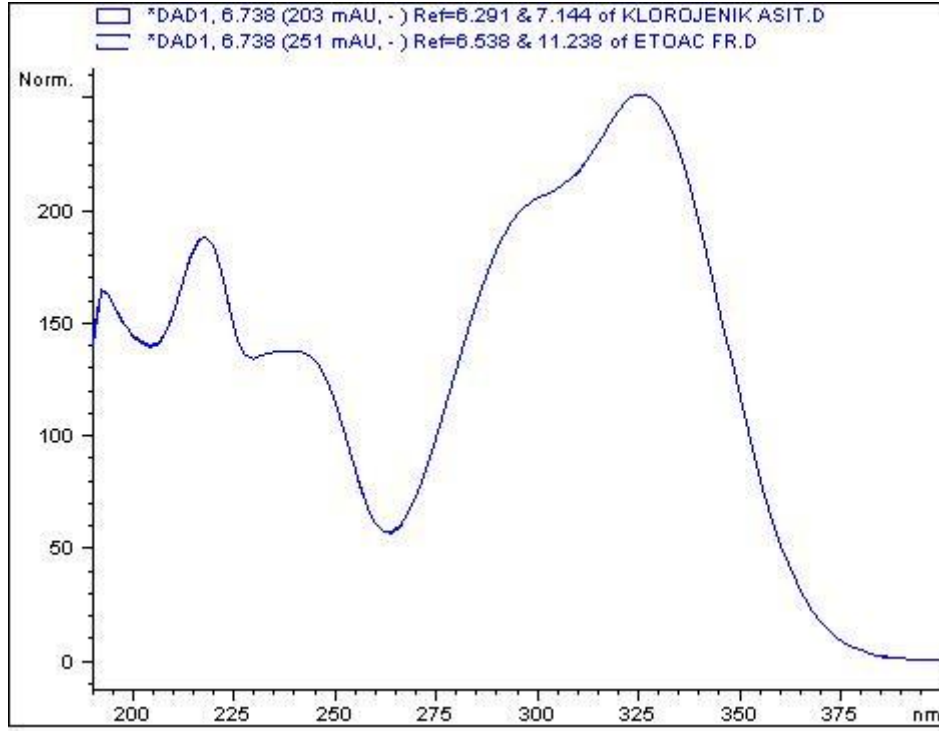
Şekil 3.26. *B. tripartita* etanol ekstresinde Rt: 6,765'teki pikin ve Klorojenik asitin UV'lerinin karşılaştırılması



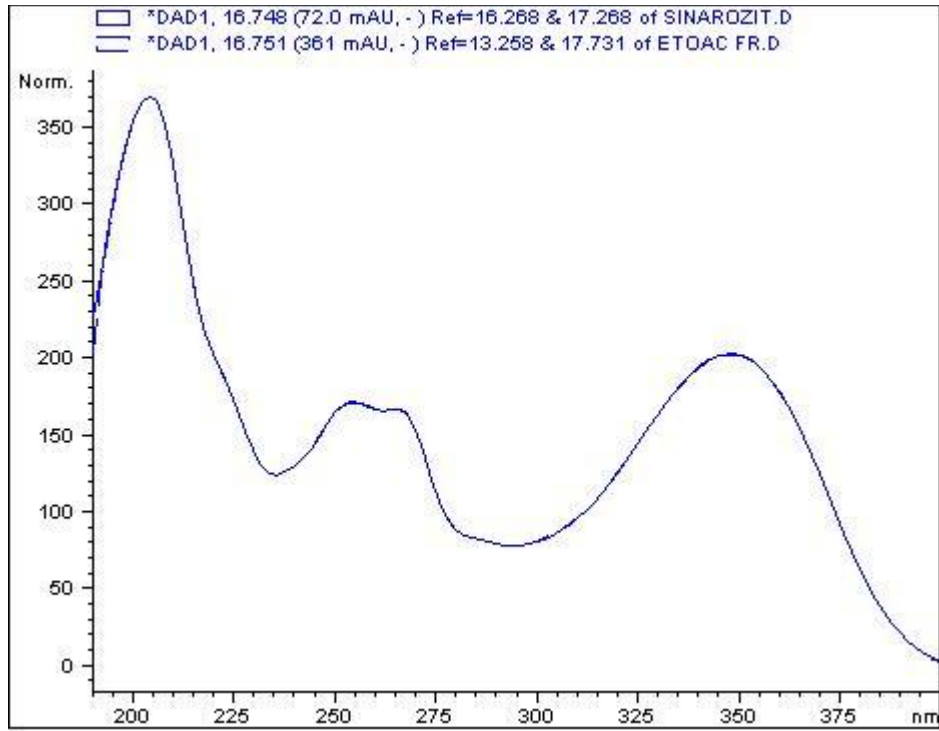
Şekil 3.27. *B. tripartita* etanol ekstresinde Rt: 16,766'daki pikin ve sinarozit UV'lerinin karşılaştırılması



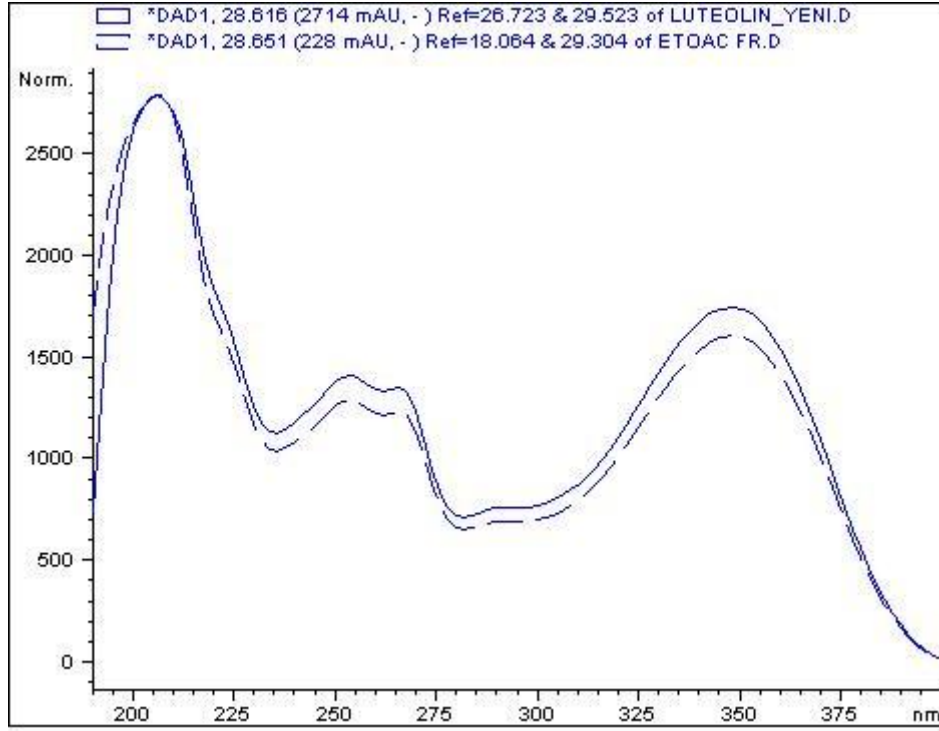
Şekil 3.28. *B. tripartita* etanol ekstresinde Rt: 28,686'daki pikin ve luteolin UV'lerinin karşılaştırılması



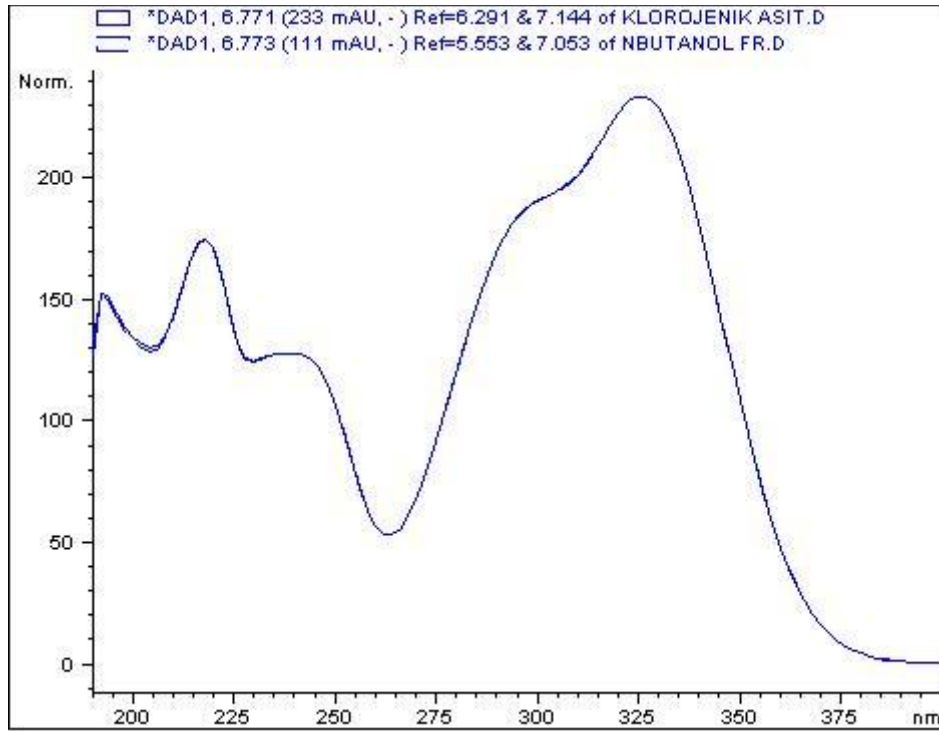
Şekil 3.29. EtOAc fraksiyonunda Rt: 6,747'deki pikin ve klorojenik asit UV'lerinin karşılaştırılması



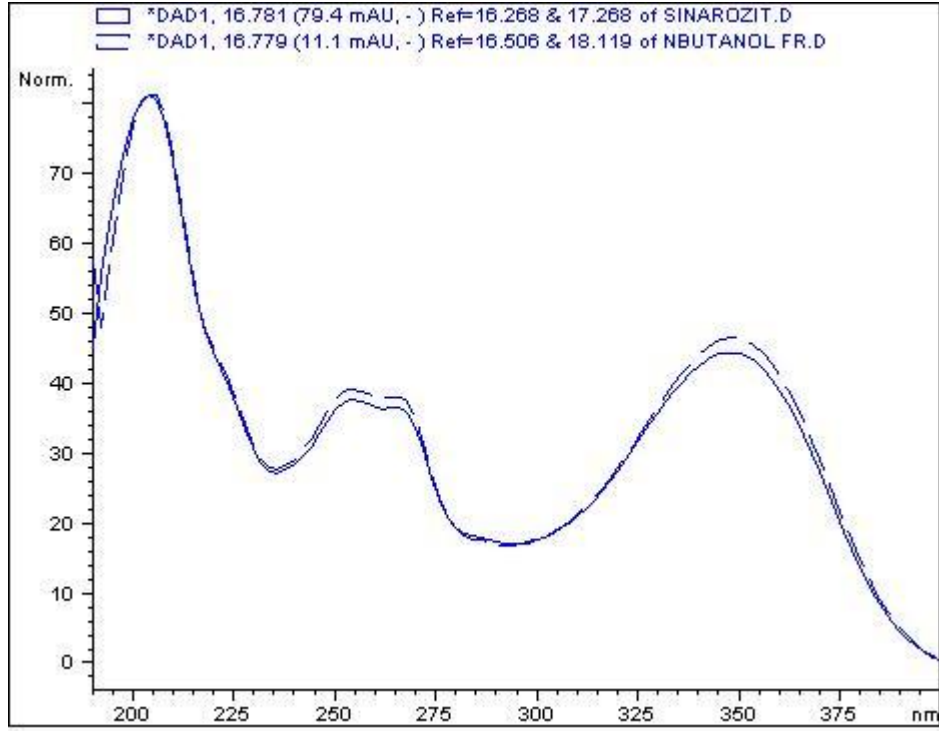
Şekil 3.30. EtOAc fraksiyonunda Rt: 16,752'deki pikin ve sinarozit UV'lerinin karşılaştırılması



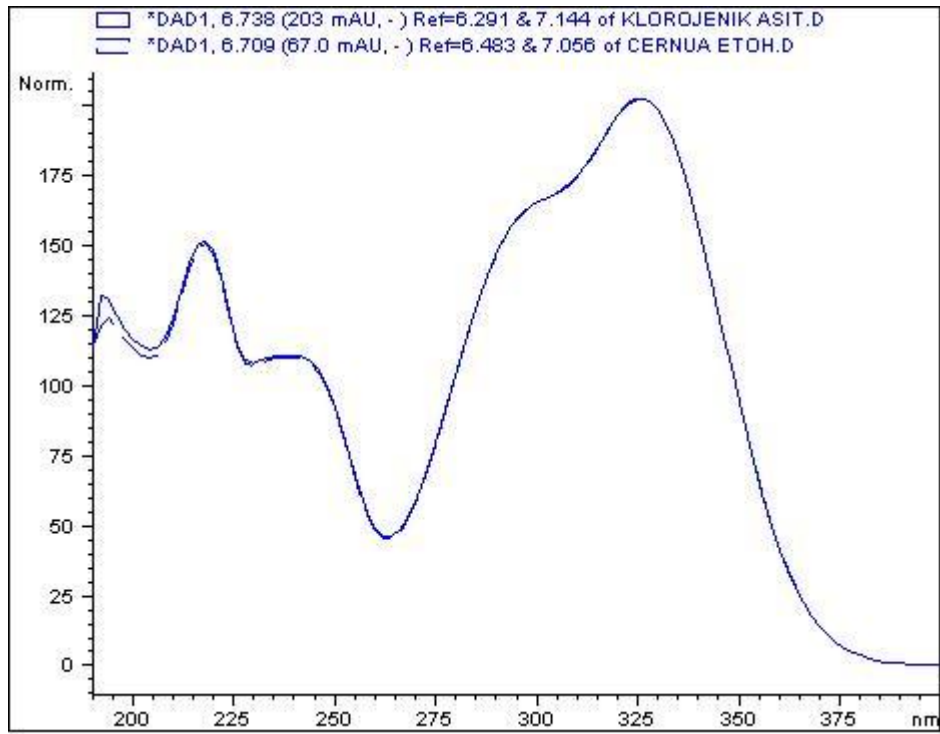
Şekil 3.31. EtOAc fraksiyonunda Rt: 28,661'deki pikin ve luteolin UV'lerinin karşılaştırılması



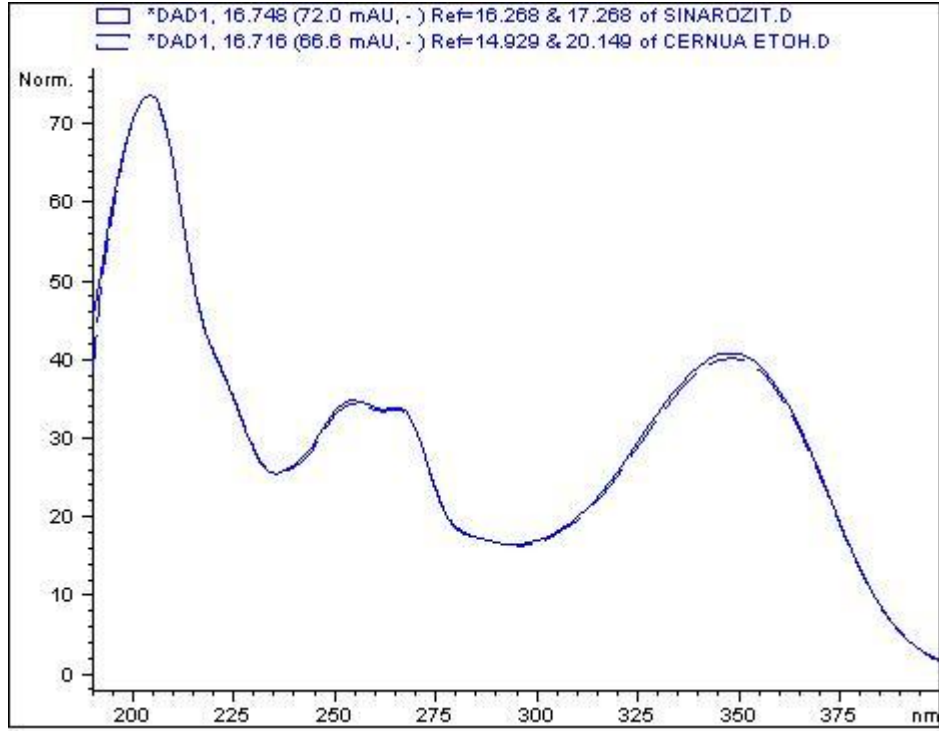
Şekil 3.32. *n*-BuOH fraksiyonunda Rt: 6,755'deki pikin ve klorojenik asit UV'lerinin karşılaştırılması



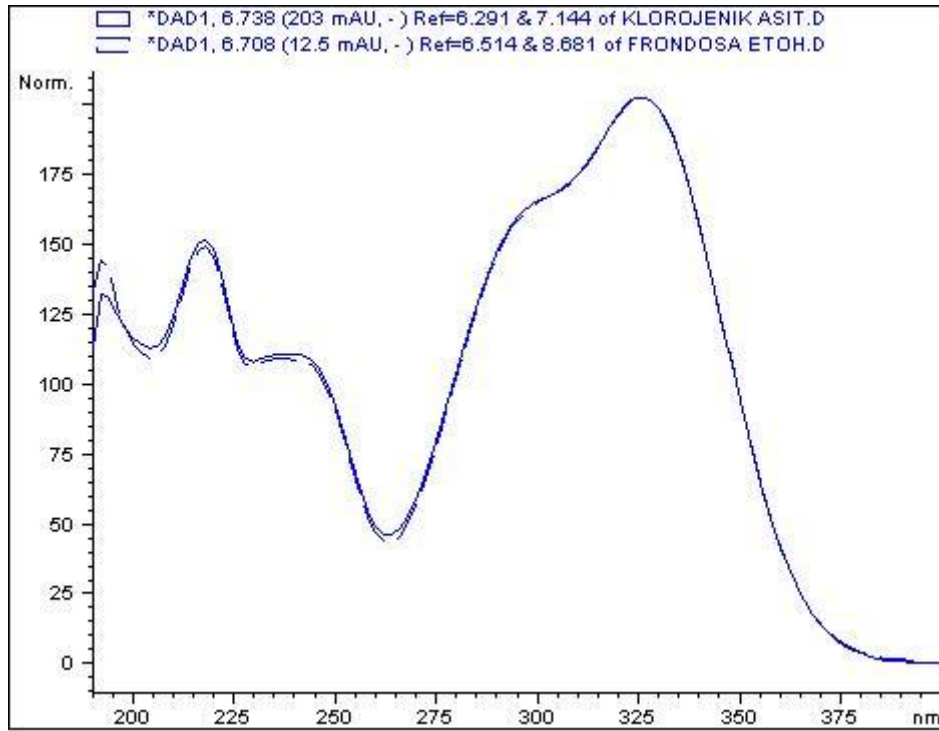
Şekil 3.33. *n*-BuOH fraksiyonunda Rt: 16,780'deki pikin ve sinarozit UV'lerinin karşılaştırılması



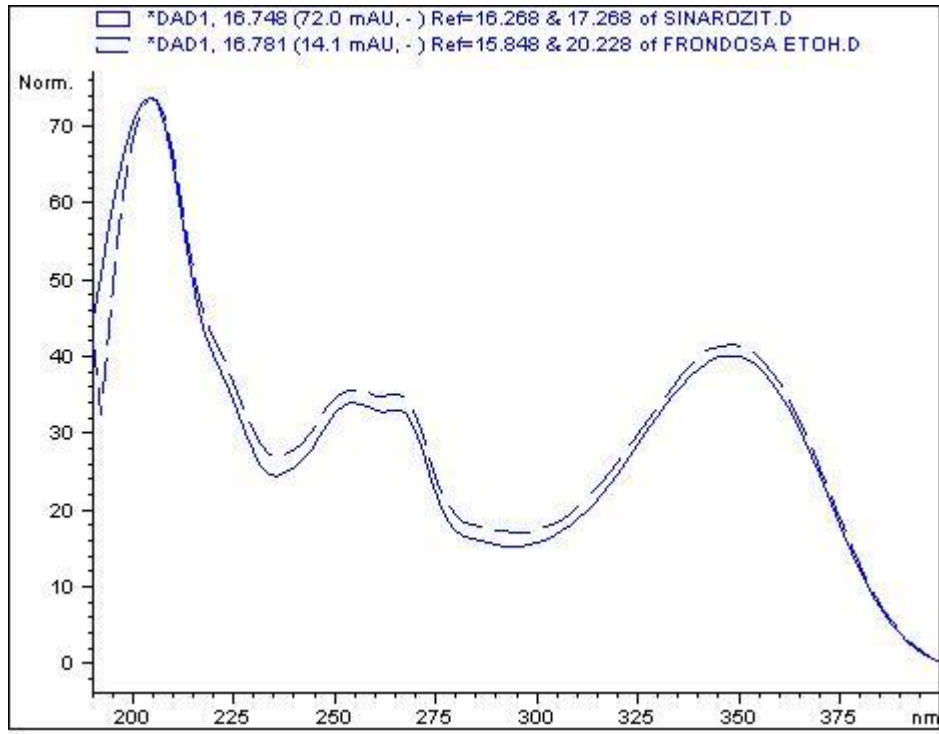
Şekil 3.34. *B. cernua* var. *radiata* etanol ekstresinde Rt: 6,760'daki pikin ve klorojenik asit UV'lerinin karşılaştırılması



Şekil 3.35. *B. cernua* var. *radiata* etanol ekstresinde Rt: 16,757'deki pikin ve sinarozit UV'lerinin karşılaştırılması



Şekil 3.36. *B. frondosa* etanol ekstresinde Rt: 6,770'deki pikin ve klorojenik asit UV'lerinin karşılaştırılması



Şekil 3.37. *B. frondosa* etanol ekstresinde Rt: 16,780'deki pikin ve sinarozit UV'lerinin karşılaştırılması

Çizelge 3.15. Etanollü ekstreler ve fraksiyonlarda klorojenik asit, sinarozit ve luteolin miktarları

Ekstre	Klorojenik Asit (mg/ml)	Sinarozit (mg/ml)	Luteolin (mg/ml)
<i>B. tripartita</i> EtOH Eks.	0,05160	0,0407	0,0209
<i>B. t</i> EtOAc Fr.	0,1063	0,1087	0,0758
<i>B. t</i> <i>n</i> -BuOH Fr.	0,0451	0,0033	-
<i>B. cernua</i> EtOH Eks.	0,0347	0,0295	-
<i>B. frondosa</i> EtOH Eks.	0,0128	0,0062	-

B.t : *B. tripartita*, - : Teşhis edilemedi

Çizelge 3.16. *Bidens* türlerinin içerdikleri % klorojenik asit, sinarozit ve luteolin miktarları (% a/a)

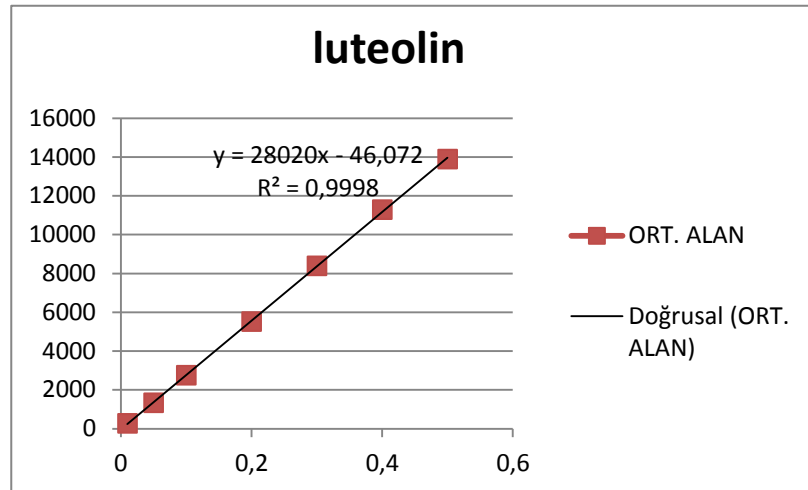
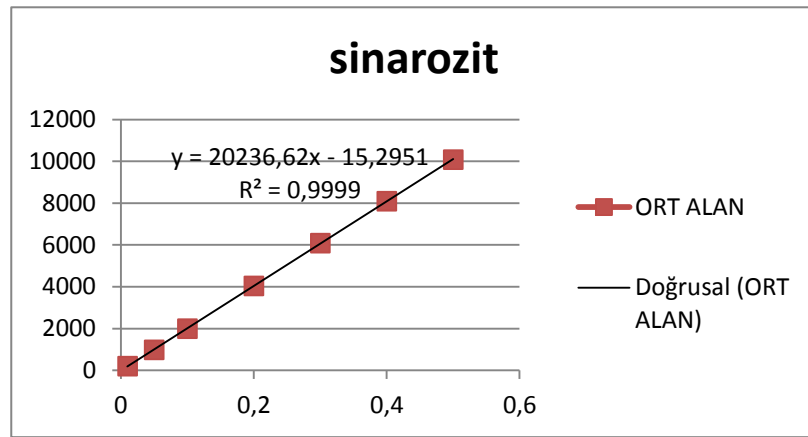
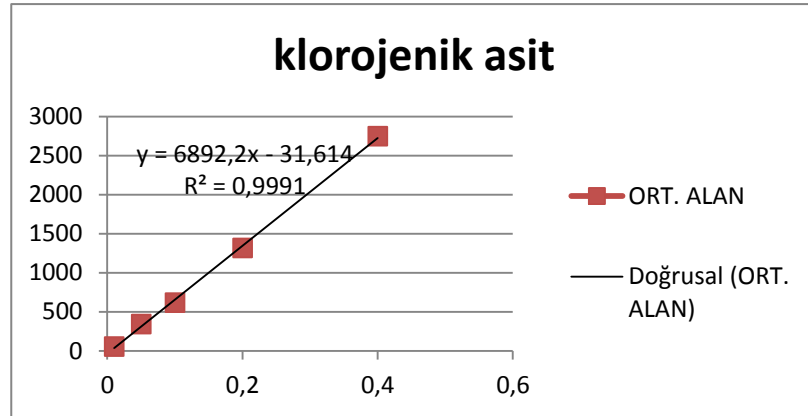
Bitki adı	% Klorojenik Asit	% Sinarozit	% Luteolin
<i>B. tripartita</i>	0,8066	0,6363	0,3267
<i>B. cernua</i> var. <i>radiata</i>	0,7733	0,6574	-
<i>B. frondosa</i>	0,2249	0,1089	-

3.5. Yöntem Validasyon Bulguları

Validasyon bulguları doğrusallık (Çizelge 3.17.) , kesinlik (Çizelge 3.18.) ve TS-LOD (Çizelge 3.19.), TAS-LOQ (Çizelge 3.20.) hesaplamaları şeklinde verilmiştir.

Çizelge 3.17. Doğrusallık sonuçları

Standart	λ	Kalibrasyon Denklemi	r^2	Eğim (%BSS)	Kesişim (%BSS)	LOQ ($\mu\text{g/ml}$)	LOD ($\mu\text{g/ml}$)
Klorojenik asit	210	$y=6892,2x-31,614$	0,9991	0,358	2,822	3,1158	1,0386
Sinarozit	210	$y=20236,62x-15,2951$	0,9999	0,057	1,249	2,7725	0,924
Luteolin	210	$y=28020x-46,072$	0,9998	0,218	6,177	3,072	1,024



Şekil 3.38. Referans maddeler için kalibrasyon denklemleri ve grafikleri

Çizelge 3.18. Yöntem validasyonu için kesinlik değerleri ve % Bağlı Standart Sapmaları (% BSS)

Standart	λ	Pik Alanı (Ortalama)	%BSS
Klorojenik asit	210	35,02857	3,421
Sinarozit	210	40,69286	0,585
Luteolin	210	39,73714	0,850

Çizelge 3.19. Tayin Edilebilir En Düşük Limit (Teşhis Sınırı-TS) (LOD)

Standart	λ	LOD ($\mu\text{g/ml}$)	%BSS
Klorojenik asit	210	1,0386	3,047
Sinarozit	210	0,924	3,003
Luteolin	210	1,024	1,858

Çizelge 3.20. Hesaplanabilir En Düşük Limit (Tayin Alt Sınırı-TAS) (LOQ)

Standart	λ	LOQ ($\mu\text{g/ml}$)	%BSS
Klorojenik asit	210	3,1158	3,421
Sinarozit	210	2,7725	0,585
Luteolin	210	3,072	0,849

4. TARTIŞMA

Diyabet dünyada her geçen gün daha fazla sayıda insanı olumsuz etkileyen, kalıtım ve çevresel faktörlere bağlı olarak ortaya çıkan bir hastalıktır. Diyabetik hastalarda hiperglisemi, karbonhidrat, lipit ve protein metabolizmasında bozukluklar meydana gelir. Diyabette oksidatif stres de birçok mekanizmaya bağlı olarak artar. Oksidatif stresin artışına neden olan mekanizmalar tam olarak aydınlatılamamıştır. Ancak diyabetik hastalardaki yüksek glukoz düzeyinin, oksidatif hasara neden olan süperoksit gibi serbest radikallerin oluşumunu arttırmada en etkili neden olduğu bilinmektedir

Bidens cinsi Asteraceae familyasına ait dünyada geniş yayılış gösteren tek (ya da çok) yıllık otsu bitkilerdir. Dünyanın birçok ülkesinde halk arasında farklı amaçlarla kullanılmaktadır. *Bidens* türleri geleneksel tıpta enflamasyon, romatizma, diyabet, enterit, faranjit gibi pek çok hastalıkta kullanılmaktadır. *Bidens* türlerinin diyabete karşı kullanımıyla ilgili halk ilacı kayıtlarına dayandırılarak yapılan araştırmalarda antidiyabetik etkileri bulunmuştur (Chang ve ark., 2001; Andrade-Cetto ve Heinrich, 2005; Hsu ve ark., 2009; Rybalchenko ve ark., 2010). Bazı *Bidens* türleri üzerinde kimyasal içerik ve biyolojik aktivite çalışmaları yapılmış olmasına rağmen, Türkiye’de yetişen *Bidens cernua* var. *radiata*, *B. tripartita* ve *B. frondosa* taksonları üzerinde bu konularla ilgili ülkemizde yapılmış herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır.

Araştırma planı yapılırken *Bidens* cinsine ait Türkiye’de 3 tür 4 takson bulunduğu biliniyordu. Çalışma yürütülürken ülkemizde yeni bir *Bidens* türünün varlığı Korkmaz ve arkadaşları (2011) tarafından tespit edilmiştir. Yeni bulunan *B. bipinnata* ile birlikte Türkiye’de yetişen tür sayısı 4 tür 5 taksona ulaşmıştır.

Çalışmamızda *B. cernua* var. *radiata*, *B. tripartita* ve *B. frondosa* taksonlarının kurutulmuş toprak üstü kısımlarından % 80’lik etanol ile hazırlanan ekstreler kullanılmıştır. Etanollü ekstrelerin ilk önce streptozotosin ile diyabet oluşturulmuş Wistar albino erkek sıçanlar üzerindeki akut antidiyabetik etkisi araştırılmış ve tüm taksonlar etkili bulunmuştur. Referans madde olarak kullanılan tolbutamid kan glukoz konsantrasyonları üzerinde % 20 civarında bir azalma sağlarken *Bidens* taksonlarının ekstreleri % 30 civarında azalma meydana getirmiştir (Çizelge 3.1.). Akut denemelerde elde edilen umut verici sonuçlar üzerine tüm ekstreler subakut olarak denenmiştir. Tüm dozlarda % 15 civarında bir etki tespit edilmiş iken *B. tripartita*’nın 500 mg/kg dozunda % 40 civarında bir etki bulunmuştur (Çizelge 3.2.). Ekstrelerin sıçanlara subakut uygulanması esnasında ise hayvanların vücut ağırlıklarında meydana gelen değişimler kayıt altına alınmıştır (Çizelge 3.3.). Ekstre verilen deney gruplarındaki hayvanların vücut ağırlıklarında % 10’a yakın bir artış görülürken kontrol grubundaki ağırlık artışı % 3’te kalmıştır. İlginç bir şekilde tolbutamid grubundaki hayvanlar 8. günün sonunda % 4 civarında kilo kaybına uğramıştır. Kan glukoz konsantrasyonları üzerindeki azaltıcı etkiye paralel olarak 500 mg/kg dozda *B. tripartita* uygulanan deney hayvanlarında görülen kilo artışı en yüksek oranda (% 14,5) bulunmuştur. Etanollü ekstrelerin normoglisemik hayvanlar üzerindeki çalışmaları incelendiğinde, 500 mg/kg dozları anlamlı hipoglisemik etki meydana getirmiştir. Bu ekstrelerden *B. tripartita* % 25,8 ile en yüksek hipoglisemik etkiyi ortaya çıkarmıştır. Bu etki deney süresince azalarak devam etmiştir. Dördüncü saatin sonunda

yapılan ölçümde % 15,4'lük hipoglisemik etki gözlenmiştir. Tolbutamitte etki zayıf başlamış, 4. saatin sonunda maksimum seviyeye ulaşmıştır. *B. tripartita* ekstresinde ise bunun aksine etki kuvvetli başlamış 4. saatin sonunda zayıflamıştır. Diğer *Bidens* ekstrelerinin % 11,5-17,5 arasında değişen zayıf hipoglisemik etkileri olduğu gözlenmiştir. *Bidens* türlerine ait etanollü ekstrelerin oral glukoz tolerans testi (OGTT) sonuçları (Çizelge 3.5.) incelendiğinde, normoglisemik sıçanlar üzerinde olduğu gibi tolbutamitin, burada da başlangıçtan itibaren artarak devam eden kuvvetli hipoglisemik etki meydana getirdiği görülmüş olup, *Bidens* ekstreleri glukoz yüklemesi yapıldıktan sonraki ilk ölçümde anlamlı hipoglisemik etki (% 11,5-23,1) ortaya çıkarmıştır. 60. dakikada ortaya çıkan hipoglisemik etki *B. cernua* ve *B. tripartita*'da 4. saatin sonunda da devam etmektedir. *B. frondosa*'da 120. dakikada gözlemlenen kuvvetli hipoglisemik etki daha sonra kaybolmuştur.

Üç taksonun antioksidan aktiviteleri toprak üstü kısımlarından hazırlanan etanollü ve sulu ekstrelerin DPPH radikali süpürme ve metal (demir) iyonu şelasyon gücü araştırılarak incelenmiştir. DPPH radikali süpürücü aktivite çalışmalarında test edilen ekstreler referans bileşikler olan kersetin ve EDTA'ya göre daha zayıf etki göstermiştir. Ekstreler içerisinde *B. tripartita* taksonuna ait etanollü ekstre (2000 µg/kg dozda % 66,51±4,84) en yüksek radikal süpürücü etkiyi meydana getirmiştir. Bu sonuç antidiyabetik aktivite bulgularıyla bir korelasyon göstermiştir. *B. tripartita* sulu ekstresi ise en yüksek metal iyonu şelasyon aktivitesi göstermiştir.

Sonuçların değerlendirilmesiyle *B. tripartita*'nın etanol ekstresi çözücü-çözücü ekstraksiyonu ile kloroform, etil asetat, *n*-butanol ve kalan-su fraksiyonlarına ayrılmış antidiyabetik ve antioksidan aktivite deneylerine fraksiyonlar üzerinde devam edilmiştir.

Elde edilen fraksiyonların normal hayvanların kan glukoz seviyeleri üzerinde herhangi bir hipoglisemik etkisi görülmemiştir. Ekstre halinde gözlemlenen etki ekstre fraksiyonlarına ayrılınca kaybolmuştur (Çizelge 3.6.).

Fraksiyonların OGTT sonuçları Çizelge 3.7.'de gösterilmiştir. Tolbutamit 4. saatin sonuna kadar artan bir hipoglisemik etki göstermiş, kloroform, etil asetat ve kalan su fazlarının yüksek ve düşük dozları 120. ve 240. dakikada, *n*-butanol fraksiyonunun ise sadece yüksek dozu 240. dakikada anlamlı etki göstermiştir. Çizelgenin geneline bakıldığında ise tüm fraksiyonların yüksek dozlarının glukoz yüklenmiş sıçanlar üzerinde hipoglisemik etki gösterdiği görülmüştür. Bu etki etil asetat ve *n*-butanol fraksiyonlarında daha süreklidir (60., 120. ve 240. dakikalar). Ana ekstrede görülen hipoglisemik etkinin fraksiyonların tamamına dağıldığı tespit edilmiştir.

STZ ile diyabet yapılmış sıçanlar üzerinde fraksiyonların ortaya koyduğu antidiyabetik etki sonuçları incelendiğinde (Çizelge 3.8.), kalan-su fraksiyonu dışındaki fraksiyonların yüksek dozlarında anlamlı antihiperglisemik etki belirlenmiştir. *n*-Butanol fraksiyonu 166 mg/kg dozda en yüksek antidiyabetik etkiyi meydana getirmiştir. Bu etki 4. saatin sonunda en üst düzeye çıkmıştır (% 47,3). Etil asetat fraksiyonun yüksek dozu (204 mg/kg) % 10,6 ile başlayan ve 4. saatte % 29,1'e yükselen antidiyabetik etki göstermiştir. Kloroform

fraksiyonu ise zayıf hipoglisemik etki meydana getirmiştir (% 9,4-21,5).

Fraksiyonların antioksidan aktivite sonuçları değerlendirildiğinde, test edilen konsantrasyonlarda, *B. tripartita*'nın etil asetat (% 88,99±0,07) ve *n*-BuOH (% 85,25±0,55) fraksiyonları konsantrasyon-bağımlı olarak en yüksek radikal süpürücü etkiyi göstermiştir. Kalansu fraksiyonu da % 50'nin üzerinde olmak üzere (% 58,20±2,59) dikkate değer DPPH radikal süpürücü etkiye yol açmıştır (Çizelge 3.9.). Fraksiyonlar metal-şelasyon etkisi göstermemiştir.

Biyolojik aktivite çalışmalarından sonra, *B. tripartita* etanol ekstresi ve bu ekstreden hareketle hazırlanan fraksiyonlar başta olmak üzere *B. cernua* var. *radiata* ve *B. frondosa* etanol ekstralarının kimyasal içeriğini belirlemek amacıyla HPLC ve LC-MS analizleri yapılmıştır.

HPLC ve LC-MS analizleri sonucunda *B. tripartita* etanol ekstresinde klorojenik asit (% 0,8066), luteolin-7-O-glukozit (% 0,6363) ve luteolin (% 0,3267) varlığı tespit edilmiştir. *B. cernua* var. *radiata* ve *B. frondosa* etanol ekstralarının ise klorojenik asit ve luteolin-7-O-glikozit bileşiklerini içerdiği fakat luteolin içermediği görülmüştür. Klorojenik asit miktarının üç bitkide de tespit edilen diğer bileşiklerden yüksek olduğu, klorojenik asitin *B. tripartita* etanol ekstresinde, luteolin-7-O-glukozitin ise *B. cernua* var. *radiata* ekstresinde daha fazla bulunduğu görülmüştür.

Elde edilen sonuçlar literatür sonuçları ile kıyaslandığında, farklı araştırmacılar tarafından daha önce çeşitli *Bidens* türlerinin antidiyabetik etkisinin incelendiği görülmüştür.

Bu araştırmaların birinde Meksika'da yetişen *Bidens aurea* ve *B. odorata*'nın toprak üstü kısımlarından hazırlanan infüzyonların hipoglisemik olarak kullanıldığı, *B. leucantha* ve *B. pilosa*'nın toprak üstü kısımlarından hazırlanan infüzyonların ise alloksanla diyabet oluşturulmuş fareler üzerinde antidiyabetik etki gösterdiği bildirilmiştir (Andrade-Cetto ve Heinrich, 2005). Ayrıca Alarcon-Aguilar ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada, *B. pilosa*'nın da aralarında bulunduğu dört Meksika bitkisinin normal ve alloksanla diyabet oluşturulmuş fareler üzerinde hipoglisemik etkisi belirlenmiştir (Alarcon-Aguilar ve ark., 2002).

B. pilosa'nın Tip 2 diyabet üzerine etkisinin araştırıldığı bir çalışmada, bitkinin sulu ekstresinin insülin salınımını ayarlayıp, pankreas β hücrelerini onararak Tip 2 diyabeti iyileştirdiği belirlenmiştir (Hsu ve ark., 2009).

Chang ve arkadaşları tarafından *B. pilosa* var. *radiata* butanol fraksiyonunun obez olmayan farelerde kan şekeri ve insülin seviyesini düzenleyici etkisinin araştırıldığı bir çalışmada, kan şekeri ve insülin seviyesinin doza bağlı olarak düzenlendiği anlaşılmıştır (Chang ve ark., 2004). Daha sonra yapılan araştırmalarda, *B. pilosa* varyetelerinde bulunan poliasetilenik yapıdaki bileşiklerin insülin salınımını artırarak etki gösterdiği bildirilmiştir (Chien ve ark., 2009).

B. pilosa'nın antihiperglisemik aktivitesinin araştırıldığı bir başka çalışmada, bitkinin etanol:su (4:1) ekstresi 1000 mg/kg dozda, su ile hazırlanmış dekoksiyonu 1000 mg/kg dozda ve bitkiden izole edilmiş olan iki poliasetilenik yapıda bileşik farelere oral olarak uygulanmıştır. Sulu dekoksiyon etkisiz bulunmuştur. Etanol ekstresi ve poliasetilenik bileşiklerin karışımlarında ise kaydadeğer aktivite tespit edilmiştir. (Ubillas ve ark., 2000).

HPLC ve LC-MS çalışmamızda aktif ekstre ve fraksiyonlar içerisinde tespit edilen fenolik yapıdaki bileşiklerin [klorojenik asit, luteolin-7-O-glukozit (sinarozit) ve luteolin] diyabet üzerindeki etkileri ile ilgili literatürler incelendiğinde; Matsui ve arkadaşlarının (2002) ve Kim ve arkadaşlarının (2000) çalışmalarında luteolinin α -glukozidaz ve α -amilaz enzimlerini inhibe ederek antidiyabetik etki gösterdiği tespit edilmiştir. Bunun yanı sıra luteolinin diyabete bağlı nefropatiyi önlediği ve diyabetin neden olduğu kognitif bozuklukları düzeltebileceği gösterilmiştir (Wang ve ark., 2011; Liu ve ark., 2013). Luteolin-7-O-glukozit ile ilgili yapılmış bir araştırmada ise 4 mg/kg dozda 7 gün boyunca yapılan intraperitoneal uygulamada anlamlı bir antidiyabetik etki görülmüştür (Rauter ve ark., 2010).

Aktif ekstre ve fraksiyonlarımız içindeki ana maddelerden biri olan klorojenik asitin streptozotosin nedenli diyabette 10 mg/kg dozda oral uygulama sonucu anlamlı iyileşme gösterdiği bildirilmiştir (Andrade-Cetto ve Wiedenfeld., 2001). Diğer taraftan kuvvetli antidiyabetik etkisi tespit edilen *Morus alba* yapraklarından ana madde olarak izole edilen bileşiklerden birisinin klorojenik asit olduğu görülmüş ve antidiyabetik etkinin klorojenik asite bağlı olabileceği belirtilmiştir (Hunyadi ve ark., 2012).

Araştırmamızdan elde edilen sonuçlar ile daha önce farklı araştırmacılar tarafından elde edilen bulgular birbirini destekler niteliktedir. Özellikle önemli ölçüde antidiyabetik etki gösteren ekstre ve fraksiyonlardaki tespit edilen bazı ana maddelerin (klorojenik asit, luteolin-7-O-glukozit ve luteolin) kan glukozunu düşürücü etkilerinin daha önce belirlenmiş olması araştırmamızın sonuçlarını daha da değerli kılmaktadır.

Asetilkolinesteraz inhibitör ve antioksidan etki yönünden araştırılan ülkemizdeki *Bidens* türlerinin hiçbirisi asetilkolinesteraz enzimini inhibe etmemiştir. Antioksidan özellikleri incelendiğinde, çalışılan tüm türler referans bileşikler olan kersetin ve EDTA'dan daha zayıf etki göstermişlerdir.

Bidens türleri üzerinde yapılan antioksidan aktivite çalışmaları ile ilgili literatürler incelendiğinde, *B. pilosa*, *B. bipinnata* ve *B. tripartita*'nın antioksidan özelliklerinin daha önce farklı antioksidan mekanizmalar kullanılarak farklı araştırmacılar tarafından çalışıldığı görülmüştür. Araştırmamızda üzerinde detaylı çalışılmış olan *B. tripartita*'nın daha önceki çalışmalarda önemli ölçüde antioksidan etki ortaya çıkardığı bildirilmiştir (Chiang ve ark, 2004; Abajo ve ark., 2004; Awaad ve ark, 2005).

Wolniak ve arkadaşlarının 2007 yılında yayınladıkları çalışmada, *B. tripartita* çiçek ve herbasının ayrı ayrı su, metanol-su ve aseton-su ekstraları hazırlanmış, ekstralar dieteleter, etil asetat ve *n*-BuOH ile fraksiyonlara ayrılmış, bitkide bulunan luteolin, sinarozit ve flavanomarein bileşiklerinin DPPH radikali süpürücü aktivitesi araştırılmıştır. Sonuçlar incelendiğinde hem çiçek hem herbaya ait etil asetat fraksiyonunun en yüksek antioksidan aktiviteye sahip olduğu belirlenmiştir. Fenolik bileşik miktarının toprak üstü kısımda

Çiçeklerden fazla olmasına rağmen iek ekstrelerinin daha etkin olduğu görülmüştür. Bu nedenle antioksidan aktivitenin sadece polifenol miktarından değil ekstrenin bileşiminde bulunan diğer yapıdaki maddelerden ve antioksidatif sinerjizm gibi diğer faktörlerden de etkilendiği dşnlmştr. (Wolniak ve ark., 2007).

Bu bulgular çalışmamızdan elde edilen antioksidan aktivite sonuçlarını desteklemektedir.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

İlk kez 1753 yılında Linne'nin *Species Plantarum* isimli eserinde yer alan ve Asteraceae familyasında bulunan *Bidens* L. cinsi ülkemizde 4 tür, 5 takson ile temsil edilmektedir (Connelly, P., 2009; Korkmaz ve ark., 2011).

Ülkemizde yetişmekte olan *Bidens* taksonları üzerinde yapılmış herhangi bir biyolojik aktivite çalışması bulunmamaktadır. Bu araştırma Türkiye'de yetişen *Bidens* taksonları üzerinde yapılmış ilk çalışma olma özelliği taşımaktadır.

Çalışma kapsamında 2011 yılından önce ülkemizde varlığı tespit edilmiş olan *B. cernua* var. *radiata*, *B. tripartita* ve *B. frondosa* taksonlarının, toprak üstü kısımlarından hazırlanan etanollü ekstrelerin iki farklı dozda (250 ve 500 mg/kg) antidiyabetik, asetilkolinesteraz inhibitör ve antioksidan aktiviteleri incelenmiştir. Biyoaktivite ile yönlendirilen fraksiyonlama (BAYF) tekniği uygulanarak yüksek aktivite gösteren *B. tripartita* ekstresi çözücü-çözücü ekstraksiyonu ile kloroform, etil asetat, *n*-butanol ve su fraksiyonlarına ayrılmıştır. Elde edilen bu dört farklı fraksiyonun da aktivite çalışmaları iki farklı dozda ayrı ayrı yürütülmüştür. Etanollü ekstreler üzerinde yapılmış olan asetilkolinesteraz inhibitör aktivitesinin bulunmadığı görüldüğünden, fraksiyonlar üzerinde sadece antidiyabetik ve antioksidan aktivite çalışmaları gerçekleştirilmiştir.

Antidiyabetik aktivite çalışmaları 3 farklı deney modeli üzerinde yürütülmüştür. Normoglisemik sıçanlar, glukoz hiperglisemik

sıçanlar ve streptozotosin ile deneysel diyabet oluşturulmuş sıçanlar kullanılarak test edilen ekstre ve fraksiyonların antidiyabetik etkileri aynı şartlarda kontrol grubu ve referans madde (tolbutamid 100 mg/kg) grubu ile karşılaştırılmıştır.

Antidiyabetik etkileri karşılaştırıldığında *B. tripartita* etanol ekstresi diğer ekstrele göre daha yüksek akut ve subakut aktivite göstermiştir. Özellikle subakut deney modelinde 500 mg/kg dozda uygulanan *B. tripartita* etanollü ekstresinin % 40 civarında aktivite göstermesi istatistiksel olarak çok anlamlı bulunmuştur. Normoglisemik ve glukoz hiperglisemik (OGTT) sıçanlar üzerindeki etkileri incelendiğinde, *B. tripartita* etanol ekstresi her iki dozda (250 ve 500 mg/kg) anlamlı bir hipoglisemi meydana getirmiştir.

Antioksidan aktivite sonuçları incelendiğinde, *B. tripartita*'dan hazırlanan etanollü ekstre 2000 µg/kg dozda, en yüksek radikal süpürücü etkiye yol açmıştır. Bu sonuç antidiyabetik aktivite bulgularıyla bir korelasyon göstermektedir.

Bu sonuçlar ışığında, *B. tripartita* etanol ekstresi içerisindeki aktif bileşenleri tespit etmek amacıyla çözücü-çözücü fraksiyonlanma işlemleri yapılmıştır. Elde edilen fraksiyonlar üzerinde yürütülen antidiyabetik aktivite çalışmalarında ise *n*-buOH ve etil asetat fraksiyonlarının yüksek oranda hipoglisemik etki gösterdiği belirlenmiştir. Diğer taraftan *B. tripartita*'nın etilasetat ve *n*-BuOH alt fraksiyonları konsantrasyon-bağımlı olarak en yüksek radikal süpürücü etkiyi göstermiştir.

Etki gösteren ekstre ve fraksiyonlar üzerinde yapılan kromatografik çalışmalarda (HPLC, LC-MS), test edilen örneklerin içerisindeki ana maddelerin teşhis ve miktar tayinleri yapılmıştır. Aktif ekstre ve fraksiyonlar içerisinde yüksek oranda klorojenik asit, luteolin-7-O-

glukozit (sinarozit) ve luteolin varlığı belirlenmiş ve miktarları tayin edilmiştir.

Literatür araştırmalarından da görüleceği üzere; dünyada *Bidens* türleri üzerinde antidiyabetik aktivite açısından birçok araştırma yapılmış olmasına rağmen, ülkemizde yetişen *Bidens* türlerinin antidiyabetik etkileri ile ilgili herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu araştırma bu konuda yapılmış ilk kapsamlı çalışmadır. *B. cernua* var. *radiata*, *B. frondosa* ve *B. tripartita* taksonlarının antidiyabetik etkisi ilk kez bu araştırmayla ortaya konmuştur.

Dünyanın çeşitli bölgelerinde yetişen *B. tripartita* ve *B. bipinnata* üzerinde daha önce yapılan çalışmalar incelendiğinde, *B. tripartita*'nın toprak üstü kısımlarının sulu infüzyonunun antienflamatuvar, analjezik ve antipiretik, köklerinden elde edilen uçucu yağın ise antifungal etki gösterdiği; *B. bipinnata* toprak üstü kısımlarının etanol ekstresinin ve bu ekstreden hazırlanan etil asetat ve *n*-buOH fraksiyonlarının ise kuvvetli antioksidan etki gösterdiği saptanmıştır (Pozharitskaya ve ark., 2010; Tomczykowa ve ark., 2011; Awaad ve ark., 2005). Bu çalışmalar göz önüne alındığında, *B. tripartita* başta olmak üzere yeni tespit edilen *B. bipinnata* ve Türkiye'de yetişen diğer türlerin de söz konusu aktivitelerinin araştırılması anlamlı olacaktır.

Tez kapsamında yürütülen aktivite ve kromatografik çalışmalardan elde edilen tüm bulgular bir bütün olarak incelendiğinde dünyanın farklı ülkelerinde yaygın kullanımı olan, Türkiye'de ilk kez tarafımızca çalışılan *Bidens* taksonlarının halk ilacı kayıtlarında bulunmamasına rağmen diyabet araştırmaları için önemli bir doğal kaynak olabileceği anlaşılmıştır. Diyabetik kişilerde görülen oksidatif strese bağlı ortaya çıkan doku hasarlarının önlenmesi hem antidiyabetik hem de antioksidan etki gösteren madde/maddeler ile mümkündür. *B.*

tripartita kuvvetli antidiyabetik etkisinin yanında antioksidan aktivite de göstermiş, diyabet tedavisinde ve diyabetin komplikasyonlarının önlenmesinde önemli bir araştırma konusu haline gelmiştir. *B. tripartita* içeriğinin daha detaylı çalışmalarla açıklığa kavuşturulması büyük önem arz etmektedir. Bu çalışmada yer almayan fakat ülkemizde yetiştiği yeni tespit edilen *B. bipinnata*'nın da doğadan toplanıp aktivite ve kromatografik çalışmalarının yapılması yeni ve önemli bulguların elde edilmesini sağlayacaktır. Bu sayede ülkemizde yetişen tüm *Bidens* türlerinin antidiyabetik ve antioksidan etkileri araştırılmış olacaktır.

Bu türlere ait ekstrelerin hem akut hem de subakut toksisite testlerinin yapılması ve fitoterapide kullanılacak standart ekstre haline getirilmesi ekonomik değeri olan yan etkileri az yeni doğal tedavi kaynaklarının ortaya çıkması açısından önemlidir.

ÖZET

Türkiye’de Yetişen Bazı *Bidens* L. Taksonları Üzerinde Farmakognozık Araştırmalar

Asteraceae familyasında yer alan *Bidens* L. cinsinin dünyada yaklaşık olarak 280 türü bulunmaktadır. Ülkemizde ise 4 tür, 5 takson yetişmektedir. *Bidens* türleri dünyada halk arasında diyabet, enflamasyon, romatizma, enterit, faranjit, malarya, metabolik hastalıklar, zayıflık, cilt hastalıkları, sebore, psöriasis, yara, tümör tedavisinde, ayrıca diüretik ve sudorifik (terletici) olarak kullanılmaktadır. Bu çalışmada Türkiye’de yetişmekte olan bazı *Bidens* taksonlarından (*B. cernua* var. *radiata*, *B. tripartita*, *B. frondosa*) hazırlanan etanollü (% 80) ekstrelerin Tip 2 diyabet üzerindeki etkisi, antioksidan özellikleri ve Alzheimer hastalığının tedavisinde önemli bir enzim olan asetilkolinesteraz üzerindeki etkileri *in vivo* ve *in vitro* yöntemler kullanılarak araştırılmıştır.

Antidiyabetik aktivite normoglisemik sıçanlar, glikoz hiperglisemik sıçanlar ve streptozotosin ile deneysel diyabet oluşturulmuş sıçanlar kullanılarak ölçülmüştür. *B. tripartita* ekstresi diğer ekstrelere göre daha yüksek akut ve subakut aktivite göstermiştir. Özellikle subakut deney modelinde 500 mg/kg dozda uygulanan *B. tripartita* ekstresinin %40 civarında aktivite göstermesi istatistiksel olarak çok anlamlı bulunmuştur. Normoglisemik ve glikoz hiperglisemik (OGTT) sıçanlar üzerindeki etkileri incelendiğinde, *B. tripartita* ekstresi her iki dozda (250 ve 500 mg/kg) anlamlı bir hipoglisemi meydana getirmiştir ve alt fraksiyonlarına ayrılmıştır. Etil asetat ve *n*-butanol fraksiyonları yüksek aktivite göstermiştir.

Asetilkolinesteraz inhibitör etki yönünden araştırılan ülkemizdeki *Bidens* türlerinin hiçbirisi asetilkolinesteraz enziminin çalışmasını durdurmamıştır.

Antioksidan aktivite deneyleri ekstrelerin DPPH radikali süpürücü ve metal (demir) iyonu şelasyon etkisi ölçülerek belirlenmiş, *B. tripartita* ekstresi ve

bu ekstreye ait etil asetat ve *n*-butanol fraksiyonları yüksek antioksidan etki göstermiştir.

Etki gösteren ekstre ve fraksiyonlar üzerinde yapılan kromatografik çalışmalarda klorojenik asit, luteolin-7-O-glukozit (sinarozit) ve luteolin varlığı belirlenmiş ve miktarları tayin edilmiştir.

Bu araştırma ülkemizde yetişmekte olan *B. cernua* var. *radiata*, *B. tripartita* ve *B. frondosa* taksonları üzerinde yürütülen ilk ve tek kapsamlı çalışmadır.

Anahtar Sözcükler: Antidiyabetik, Antioksidan, Asetilkolinesteraz, Asteraceae, *Bidens*, *Bidens tripartita*

SUMMARY

Pharmacognostical Investigations on Some *Bidens* L. Taxons Growing in Turkey

The genus *Bidens* L. belonging to the Asteraceae family comprises approximately 280 species spread over the whole world. In the flora of Turkey, 4 species and 5 taxas are growing. Several *Bidens* species are used as folk remedy by people in the treatment of diabetes, inflammation, arthritis, pharyngitis, malaria, enteritis, metabolic disorders, dermal diseases, seborrhea, psoriasis, wound and tumors. Moreover, they are used as diuretic and sudorific. In this study, antidiabetic, antioxidant and acetylcholinesterase, an important enzyme in the treatment of Alzheimer disease, inhibitory effect of the ethanol (% 80) extracts of some *Bidens* taxa (*B. cernua* var. *radiata*, *B. tripartita*, *B. frondosa*) growing in Turkey were investigated using *in vivo* and *in vitro* methods.

B. tripartita extract (500 mg/kg) showed a significant inhibition (40 %) on blood glucose at the subacute experiments. Data obtained from normoglisemic and glucose loaded animals indicated that *B. tripartita* extract revealed significant hypoglycaemic effect at the dose of 250 and 500 mg/kg. Then, it was fractioned by the solvent-solvent extraction. Ethyl acetate and *n*-buthanol fractions showed potent hypoglycaemic activity.

None of the *Bidens* species investigated in this project showed acethylcholinesterase inhibitory effect.

Antioxidant activities of the extracts were tested by 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) and ferrous ion-chelating methods. *B. tripartita* ethanol extract, ethyl acetate and *n*-butanol fractions showed high antioxidant activity.

Chemical characterization of the active extracts was determined using chromatographic techniques. Chlorogenic acid, luteoline and luteolin-7-O-glycoside were detected as the main compounds and their quantitative analyses were also performed in the active extract.

This is the first and unique comprehensive study conducted on *Bidens* species (*B. cernua* var. *radiata*, *B. tripartita*, *B. frondosa*) growing in Turkey.

Key Words: Acetylcholinesterase, Antidiabetic, Antioxidant, Asteraceae, *Bidens*, *Bidens tripartita*

KAYNAKLAR

- ABAJO, C., BOFFILL, M. A., DEL CAMPO, J., MENDEZ, M. A., GONZALEZ, Y., MITJANS, M., VINARDELL, M.P. (2004). *In vitro* Study of the Antioxidant and Immunomodulatory Activity of Aqueous Infusion of *Bidens pilosa*, *Journal of Ethnopharmacology*, **93**: 319-323
- ABDOU, R., SCHERLACH, K., DAHSE, H-M., SATTLER, I., HERTWECK, C. (2010). Botryorhodines A-D, Antifungal and Cytotoxic Depsidones from *Botryosphaeria rhodina*, an Endophyte of the Medicinal Plant *Bidens pilosa*, *Phytochemistry*, **71**: 110-116
- ADEDAPO, A., JIMOH, F., AFOLAYAN, A. (2011). Comparison of the Nutritive Value and Biological Activities of the Acetone, Methanol and Water Extracts of the Leaves of *Bidens pilosa* and *Chenopodium album*, *Acta Poloniae Pharmaceutica-Drug Research*, **68(1)**: 83-92
- AKÇİÇEK, E. (2003). Flora of Kumalar Mountain (Afyon), *Turk j Bot*, **27**: s.:383-427
- AKSOY, N. (2006). Elmacık Dağı Düzce Vegetasyonu, İstanbul Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Doktora Tezi
- ALARCON de la LASTRA, C., MARTIN, M.J., LA CASA, C., MOTILVA, V. (1994). Antiulcerogenicity of the Flavonoid Fraction from *Bidens aurea*: Comparision with Ranitidine and Omeprazole, *Journal of Ethnopharmacology*, **42**: 161-168
- ALVAREZ, A., POMAR, F., SEVILLA, M.A., MONTERO, M.J. (1999). Gastric Antisecretory and Antiulcer Activities of an Ethanolic Extract of *Bidens pilosa* L. var. *radiata* Schult. Bip., *Journal of Ethnopharmacology*, **67**: 333-340
- ALARCON-AGUILARA, F.J., ROMAN-RAMOS, R., PEREZ-GUTIERREZ, S., AGUILAR-CONTRERAS, A., CONTRERAS-WEBER, C.C., FLORES-SAENZ, J.L. (1998). Study of the Anti-Hyperglycemic Effect of Plants Used as Antidiabetics, *Journal of Ethnopharmacology*, **61**: 101-110
- ALARCON-AGUILAR, F.J., ROMAN-RAMOS, R., FLORES-SAENZ, J.L., AGUIRRE-GARCIA, F. (2002). Investigation on the Hypoglycaemic Effects Extracts of Four Mexican Medicinal Plants in Normal and Alloxan-diabetic Mice, *Phytotherapy Research*, **16**: 383-386
- ANDRADE-CETTO, A., HEINRICH, M., (2005). Mexican Plants with Hypoglycaemic Effect Used in the Treatment of Diabetes, *Journal of Ethnopharmacology*, **99**: 325-348
- ANDRADE-CETTO A., WIEDENFELD H. (2001). Hypoglycemic Effect of *Cecropia obtusifolia* on Streptozotocin Diabetic Rats, *Journal of Ethnopharmacology*, **78**: 145-149

- ANDRADE-NETO, V.F., BRANDAO, M.G.L., OLIVEIRA, F.Q., CASALI, V.W.D., NJAINE, B., ZALIS, M.G., OLIVEIRA, L.A., KRETTLI, A.U. (2004). Antimalarial Activity of *Bidens pilosa* L. (Asteraceae) Ethanol Extracts From Wild Plants Collected in Various Localities or Plants Cultivated in Humus Soil, *Phytotherapy Research*, **18**: 634-639
- APAK, R., GUÇLU, K., OZYUREK, M., KARADEMİR, S.E. (2004). Novel Total Antioxidant Capacity Index for Dietary Polyphenols and Vitamins C and E, Using their Cupric Ion Reducing Capability in the Presence of Neocuproin: CUPRAC Method, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **52**: 7970-7981
- ASHAFA, A.O.T., AFOLAYAN, A.J., (2009). Screening the Root Extracts from *Bidens pilosa* var. *radiata* (Asteraceae) for Antimicrobial Potentials, *Journal of Medicinal Plants Research*, **3(8)**: 568-572
- ASTUDILLO-VAZQUEZ, A., VALLE, H.D., DE JESUS, L., HERRERA, G., NAVARRETE, A. (2008). Investigation of *Alternanthera repens* and *Bidens odorata* on Gastrointestinal Disease, *Fitoterapia*, **79**: 577-580
- AYVAZ, G., KAN, E. (2010). Tip 2 Diabetes Mellitus Tedavisinde Oral Antidiyabetik İlaçlar Tip 2 Diabetes Mellitus Tedavisi, *Meslek İçi Sürekli Eğitim Dergisi*, **(23-24)**: 8-13
- AWAAD, A.S., OSMAN, Y.A.H., MAITLAND, D.J., SOLIMAN, G.A. (2005). Comparative Study On Antioxidant Activity of Cultivated And Wild *Bidens bipinnata* Linne Plant, *Az. J. Nat. Prod.*, **9**: 1-8
- AWAAD, A.S. (2009). Flavonoids of *Bidens bipinnata* Linnie and Their Antioxidant Activity, *Journal of King Saud University*, **21**: 183-189
- BADARINATH, A.V., MALLIKARJUNA RAO, K., MADHU SUDHANA CHETTY, C., RAMNKANTH, S., RAJAN, T.V.S., GNANAPRAKASH, K. (2010). A Review on *In vitro* Antioxidant Methods: Comparisons, Correlations and Considerations, *International Journal of PharmTech Research*, **2(2)**: 1276-1285
- BAIRWA, K., KUMAR, R., SHARMA, R.J., ROY, R.K. (2010). An Updated Review on *Bidens pilosa* L., *Der Pharma Chemica*, **2(3)**: 325-337
- BAYTOP A., (1996). *Farmasötik Botanik Ders Kitabı*, İstanbul Üniversitesi Basımevi, İstanbul, S.:236-237
- BENZIE, I.F., STRAIN, J.J. (1996). The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of "Antioxidant Power": The FRAP Assay, *Analytical Biochemistry*, **239**: 70-76
- BAUER, R., REDL, K., DAVIS, B. (1992). Four Polyacetylene Glucosides from *Bidens campylothea*, *Phytochemistry*, **31(6)**: 2035-2037
- BORS, W., MICHEL, C., SARAN, M. (1984) Inhibition of Bleaching of the Carotenoid Crocin, a Rapid test for Quantifying Antioxidant Activity *Biochimica et Biophysica Acta*, **796**: 312-319

- BRANDAO, M.G.L., KRETTLI, A.U., SOARES, L.S.R., NERY, C.G.C., MARINUZZI, H.C. (1997). Antimalarial Activity of Extracts and Fractions from *Bidens pilosa* and Other *Bidens* Species (Asteraceae) Correlated with the Presence of Acetylene and Flavonoid Compounds, *Journal of Ethnopharmacology*, **57**: 131-138
- BREMER K., HUMPHRIES, C.J. (1993). Generic Monograph of the Asteraceae-Anthemideae, *Bulletin of the British Museum (Natural History) Botany*, 23 (2): 71-177
- BÜYÜKTUNCEL, E. (2013). Toplam Fenolik İçerik ve Antioksidan Kapasite Tayininde Kullanılan Başlıca Spektrofotometrik Yöntemler, *Marmara Pharmaceutical Journal*, **17**: 93-103
- CAMARGO, M.E.M., BERDEJA, B., MIRANDA, G. (2004). Diuretic Effect of the Aqueous Extract of *Bidens odorata* in the Rat, *Journal of Ethnopharmacology*, **95**: 363-366
- CAO, G.H., ALESSIO, H.M., CUTLER, R.G. (1993). Oxygen-Radical Absorbency Capacity Assay for Antioxidants, *Free Radical Biology and Medicine*, **14**: 303-311
- CARREIRAS M., MARCO J. (2004). Recent Approaches to Novel Anti-Alzheimer Therapy, *Current Pharmaceutical Design*, **10**: 25, 3167-75
- CHALCHAT, J-C., PETROVIC, S., MAKSIMOVIC, Z., GORUNOVIC, M., (2009). Composition of Essential Oil of *Bidens cernua* L., Asteraceae from Serbia, *Journal of Essential Oil Research*, **21**: 41-42
- CHANG, J-S., CHIANG, L-C., CHEN, C-C., LIU, L-T., WANG, K-C., LIN, C-C. (2001). Antileukemic Activity of *Bidens pilosa* L. var. *minor* (Blume) Sherff and *Houttuynia cordata* Thunb., *American Journal of Chinese Medicine*, **29(2)**: 303-312
- CHANG, S-L., CHANG, C.L-T., CHIANG, Y-M., HSIEH, R-H., TZENG, C-R., WU, T-K., SYTWU, H-K., SHYUR, L-F., YANG, W-C. (2004). Polyacetylenic Compounds and Butanol Fraction from *Bidens pilosa* can Modulate the Differentiation of Helper T Cells and Prevent Autoimmune Diabetes in Non-Obese Diabetic Mice, *Planta Medica*, **70**: 1045-1051
- CHANG, S-L., CHIANG, Y-M., CHANG, C.L-T., YEH, H-H., SHYUR, L-F., KUO, Y-H., WU, T-K., YANG, W-C. (2007). Flavonoids Centaurein and Centaureidin, from *Bidens pilosa*, stimulate IFN- γ expression, *Journal of Ethnopharmacology*, **112**: 232-236
- CHAUHAN V., CHAUHAN A. (2006). Oxidative stress in Alzheimer disease, *Pathophysiology*, **13(3)**: 195-208
- CHAUHAN, P.S., SHARMA, V.K., SATTI, N.K., DUTT, P., SURI, K.A., SHARMA, S.N., BANI, S., (2011). Ameliorating Effects of Aqueous Fraction of *Bidens pilosa* against Acute and Chronic Inflammation with Reference to Changes in Proinflammatory Mediators and T cells, *Journal of Pharmacy Research*, **4(3)**: 917-921

- CHIANG, Y-M., CHUANG, D-Y., WANG, S-Y., KUO, Y-H., TSAI, P-W., S, L-F. (2004). Metabolite Profiling and Chemopreventive Bioactivity of Plant Extracts from *Bidens pilosa*, *Journal of Ethnopharmacology*, **95**: 409-419
- CHIANG, Y-M., CHANG, C. L-T., CHANG, S-L., YANG, W-C., SHYUR, L-F. (2007). Cytopyloine, a Novel Polyacetylenic glucoside from *Bidens pilosa*, Functions as a T Helper Cell Modulator, *Journal of Ethnopharmacology*, **110**: 532-538
- CHIEN, S-C., YOUNG, P. H., HSU, Y-J., CHEN, C-H., TIEN, Y-J., SHIU, S-Y., LI, T-H., YANG, C-W., MARIMUTHU, P., TSAI, L. F-L., YANG, W-C. (2009). Antidiabetic Properties of Three Common *Bidens pilosa* Variants in Taiwan, *Phytochemistry*, **70**: 1246-1254
- CONNELLY, P., (2009). Horrible Weed or Miracle Herb? A Review of *Bidens pilosa*, *Journal of the Australian Traditional-Medicine Society*, **15 (2)**: 77-79
- CORTES-ROJAS, D.F., CHAGAS-PAULA, D.A., DA COSTA, F.B., SOUZA, C.R.F., OLIVEIRA, W.P. (2012). Bioactive Compounds in *Bidens pilosa* L. populations: A Key Step in the Standardization of Phytopharmaceutical Preparations, *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, **Aop09412**
- COŞKUNÇELEBİ, K., TERZİOĞLU, S., VLADIMIROV, V., (2007). A New Alien Species for the Flora of Turkey : *Bidens frondosa* L. (Asteraceae), *Turkish Journal of Botany*, **31**: 477-479
- DAVIS, P. H. (1975). Flora of Turkey and the East Aegean Islands, Vol.5, Edinburg: Edinburg University Press, s.: 62
- DAVIS, P. H. (1982). Flora of Turkey and the East Aegean Islands, Vol.5, Edinburg: Edinburg University Press, s.: 46-47
- DAVIS, P. H. (2000). Flora of Turkey and the East Aegean Islands, Vol.11, Edinburg: Edinburg University Press, s.: 150
- DEBA, F., XUAN, T.D., YASUDA, M., TAWATA, S. (2007). Herbicidal and Fungicidal Activities and Identification of Potential Phytotoxins from *Bidens pilosa* var. *radiata* Scherff, *Weed Biology and Management*, **7**: 77-83
- DEBA, F., XUAN, T.D., YASUDA, M., TAWATA, S. (2008). Chemical Composition and Antioxidant, Antibacterial and Antifungal Activities of the Essential Oils from *Bidens pilosa* Linn. var. *radiata*, *Food Control*, **19**: 346-352
- DIMO, T., RAKOTONIRINA, S., KAMGANG, R., TAN, P.V., KAMANYI, A., BOPELET, M. (1998). Effects of Leaf Aqueous Extract of *Bidens pilosa* (Asteraceae) on KCl- and Norepinephrine-Induced Contractions of Rat Aorta, *Journal of Ethnopharmacology*, **60**: 179-182

- DIMO, T., AZAY, J., TAN, P.V., PELLECUER, J., CROS, G., BOPELET, M., SERRANO, J.J. (2001). Effects of the Aqueous and Methylene Chloride Extracts of *Bidens pilosa* Leaf on Fructose-Hypertensive Rats, *Journal of Ethnopharmacology*, **76**: 215-221
- DIMO, T., RAKOTONIRINA, S.V., TAN, P.V., AZAY, J., DONGO, E., CROS, G. (2002). Leaf Methanol Extract of *Bidens pilosa* Prevents and Attenuates the Hypertension Induced by High-fructose Diet in Wistar rats, *Journal of Ethnopharmacology*, **83**: 183-191
- DIMO, T., NGUELEFACK, T.B., TAN, P.V., YEWAH, M.P., DONGO, E., RAKOTONIRINA, S.V., KAMANYI, A., BOPELET, M. (2003). Possible Mechanisms of Action of the Neutral Extract from *Bidens pilosa* L. Leaves on the Cardiovascular System of Anaesthetized Rats, *Phytotherapy Research*, **17**: 1135-1139
- DINISH T.C.P., MADIERA, V.M.C., ALMEDIA, M.L.M. (1994). Action of Phenolic Derivatives (Acitoaminophem Salycilate and 5-aminosalycilate) as Inhibitors of Membrane Lipid Peroxidation and Peroxyl Radical Scavengers, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **315**: 161-9
- DÖNMEZ, A.A. (2002). Flora of Karagüney Mountain (Kırıkkale), *Turkish Journal of Botany*, **26**: 417-451
- ELLMAN G.L., COURTNEY K.D., ANDRES V., FEATHERSTONE R.M. (1961). A New and Rapid Colorimetric Determination of Acetylcholinesterase Activity, *Biochemical Pharmacology*, **7**: 88-95
- EXPERT COMMITTEE, (1997). Report of the Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus, *Diabetes Care*, **20(7)**: 1183-1197
- EZEONWUMELU, J.O.C., JULIUS, A.K., MUHOHO, C.N., AJAYI, A.M., OYEWALE, A.A., TANAYEN, J.K., BALOGUN, S.O., IBRAHIM, A., ADZU, B., ADIUKWU, C.P., OOLORO, J., KIPLAGAT, D.M., GOJI, A.D.T., OKORUWA, A.G., ONCHWERI, A.N., REDDY, P.M.K. (2011). Biochemical and Histological Studies of Aqueous Extract of *Bidens pilosa* Leaves from Ugandan Rift Valley in Rats, *British Journal of Pharmacology and Toxicology*, **2(6)**: 302-309
- FRIDA, L., RAKOTONIRINA, S., RAKOTONIRINA, A., SAVINEAU, J-P. (2008). *In vivo* and *In vitro* Effects of *Bidens pilosa* L. (Asteraceae) Leaf Aqueous and Ethanol Extracts on Primed-Oestrogenized Rat Uterine Muscle, *African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines*, **5(1)**: 79-91
- FRÖDE, T.S., MEDEIROS, Y.S. (2008). Animal Models to Test Drugs With Potential Antidiabetic Activity, *Journal of Ethnopharmacology*, **115**: 173-183

- GHISELLI, A., SERAFINI, M., MAIANI, G., AZZINI, E., FERROLUZZI, A. (1995). A Fluorescence-Based Method for Measuring Total Plasma Antioxidant Capability, *Free Radical Biology and Medicine*, **18**: 29-36
- GLAZER, A.N. (1990). Phycoerythrin Fluorescence-Based Assay for Reactive Oxygen Species, *Methods in Enzymology*, **186**: 161-168
- GÜR, S. (2010). Antidiyabetik Aktivite Araştırma Yöntemleri, *Meslek İçi Sürekli Eğitim Dergisi*, **(23-24)**: 49-52
- HASSAN, K.A., DEOGRATIUS, O., F. NYAFUONO, J., FRANCIS, O., P. ENGEU, O. (2011). Wound Healing Potential of the Ethanolic Extracts of *Bidens pilosa* and *Ocimum suave*, *African Journal of Pharmacy and Pharmacology*, **5(2)**:132-136
- HORIUCHI, M., SEYAMA, Y. (2006). Antiinflammatory and Antiallergic Activity of *Bidens pilosa* L. var. *radiata* SCHERFF, *Journal of Health Science*, **52(6)**: 711-717
- HORIUCHI, M., SEYAMA, Y. (2008). Improvement of the Antiinflammatory and Antiallergic Activity of *Bidens pilosa* L. var. *radiata* SCHERFF Treated with Enzyme (Cellulosine), *Journal of Health Science*, **54(3)**: 294-301
- HORIUCHI, M., WACHI, H., SEYAMA, Y. (2010). Effects of *Bidens pilosa* L. var. *radiata* SCHERFF on Experimental Gastric Lesion, *Journal of Natural Medicine*, **64**: 430-435
- HSU, Y-J., LEE, T-H., CHANG, C.L-T., HUANG, Y-T., YANG, W-C. (2009). Antihyperglycemic Effects and Mechanism of *Bidens pilosa* Water Extract, *Journal of Ethnopharmacology*, **122**: 379-383
- HUANG, D.J., OU, B.X., PRIOR, R.L. (2005). The Chemistry Behind Antioxidant Capacity Assays, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **53**: 1841-1856
- HUNYADI, A., MARTINS, A., HSIEH, T-J., SERES, A., ZUPKO, I. (2012). Chlorogenic Acid and Rutin Play a Major Role in the *In vivo* Anti-Diabetic Activity of *Morus alba* Leaf Extract on Type II Diabetic Rats, *Plos One*, **7 (11)**: 1-6
- İRER, S.V., ALPER, G. (2004). Deneysel Diyabet Modelleri, *Türk Klinik Biyokimya Dergisi*, **2(3)**: 127-136
- JAGER, A.K., HUTCHINGS, A., Van STADEN, J. (1996). Screening of Zulu Medicinal Plants for Prostaglandin-Synthesis Inhibitors, *Journal of Ethnopharmacology*, **52**: 95-100
- KHAN, M.R., KIHARA, M., OMOLOSO, A.D. (2001). Antimicrobial Activity of *Bidens pilosa*, *Bischofia javanica*, *Elmerillia papuana* and *Sigesbekia orientalis*, *Fitoterapia*, **72**: 662-665

- KIM J-S., KWON C-S., SON K.H. (2000). Inhibition of Alpha-Glucosidase and Amylase by Luteolin, a Flavonoid, *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, **64(11)**: 2458-2461
- KOCA, N., KARADENİZ, F., (2003). Serbest Radikal Oluşum Mekanizmaları ve Vücuttaki Antioksidan Savunma Sistemleri, *Gıda Mühendisliği Dergisi*, **16**: 32-37
- KORKMAZ H., MUMCU Ü., ALKAN S. (2011). A New Alien Species Record for the Flora of Turkey: *Bidens bipinnata* (Asteraceae), *Biological Diversity and Conservation*, **4(2)**: 49-54
- KUMARI, P., MISRA, K., SISODIA, B.S., FARIDI, U., SRIVASTAVA, S., LUQMAN, S., DAROKAR, M.P., NEGI, A.S., GUPTA, M.M., SINGH, S.C., KUMAR, J.K. (2009). A Promising Anticancer and Antimalarial Component from the Leaves of *Bidens pilosa*, *Planta Medica*, **75**: 59-61
- KÜRŞAT, M., CİVELEK, S. (2011). Türkiye’de Doğal Olarak Yetişen *Artemisia* L. (Asteraceae) Cinsine Ait Üç Türün Morfolojik Özellikleri Bakımından İncelenmesi, *Artvin Çoruh Üniversitesi Orman Fakültesi Dergisi*, **12 (19)**: 15-25
- KVIECINSKI, M.R., FELIPE, K.B., SCHOENFELDER, T., WIESE, L.P de L., ROSSI, M.H., GONÇALEZ, E., FELICIO, J.D., FILHO, D.W., PEDROSA, R.C. (2008). Study of the Antitumor Potential of *Bidens pilosa* (Asteraceae) Used in Brazilian Folk Medicine, *Journal of Ethnopharmacology*, **117**: 69-75
- KVIECINSKI, M.R., BENELLI, P., FELIPE, K.B., CORREIA, J.F.G., PICH, C.T., FERREIRA, S.R.S., PEDROSA, R.C. (2011a). SFE from *Bidens pilosa* Linne to Obtain Extracts Rich in Cytotoxic Polyacetylenes with Antitumor Activity, *Journal of Supercritical Fluids*, **56**: 243-248
- KVIECINSKI, M.R., FELIPE, K.B., CORREIA, J.F.G., FERREIRA, E.A., ROSSI, M.H., GATTI, F.M., FILHO, D.W., PEDROSA, R.C. (2011b). Brazilian *Bidens pilosa* Linne Yields Fraction Containing Quercetin-derived Flavonoid with Free Radical Scavenger Activity and Hepatoprotective Effects, *Libyan Journal of Medicine*, **6**: 5651-5658
- LERMEN, J. H., BORSOI, M., KOBAYASHI, C., MALUF, R., ARDENGHI, P., SUYENAGA, E. S. (2012). Effect of the Hydroalcoholic Extract of *Bidens pilosa* L. on Leukocytes Mobilization, *Pharmacologia*, **3(9)**: 472-476
- LIU, Y., TIAN, X., GOU, L., SUN, L., LING, X., YIN, X. (2013). Luteolin Attenuates Diabetes-Associated Cognitive Decline in Rats, *Brain Research Bulletin*, **94**: 23-29
- LI, Y-L., LI, J., WANG, N-L., YAO, X-S. (2008). Flavonoids and New Polyacetylene from *Bidens parviflora* Willd., *Molecules*, **13**:1931-1941

- LV, L-J., ZHANG, L-B. (2013). Flavonoids and Polyacetylenes from the Aerial Parts of *Bidens tripartita*, *Biochemical Systematics and Ecology*, **48**: 42-44
- MATSUI, T., KOBAYASHI, M., HAYASHIDA, S., MATSUMOTO, K. (2002). Luteolin, a Flavone, Does Not Suppress Postprandial Glucose Absorption Through an Inhibition of α -Glucosidase Action, *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, **66(3)**: 689-692
- MEDICINAL PLANTS OF JAMAICA. PARTS 1&11. Reprinted from the West Indian Medical Journal Part 1, Vol: 2. No: 4, Vol: 3. No: 1
- MILIAUSKAS, G., VENSKUTONIS, P.R., VAN BEEK, T.A. (2004). Screening of Radical Scavenging Activity of Some Medicinal and Aromatic Plant Extracts, *Food Chemistry*, **85**: 231-237
- MILLER N.J., RICE-EVANS C.A., DAVIES M.J., GOPINATHAN V., MILNER A. (1993). A Novel Method for Measuring Antioxidant Capacity and Its Application to Monitoring the Antioxidant Status in Premature Neonates, *Clinical Science*, **84**: 407-412
- MYCEK, M.J., HARVEY, R. A., CHAMPE, P.C. (1997). İnsülin ve Oral Hipoglisemik İlaçlar, In: *Lippincott's Illustrated Review: Pharmacology 2nd Ed*, Çeviri Ed.: Ş. Okay, K. Berkman, F. Onat, Z. Gören, Çeviren: P. Atagündüz Nobel Tıp Kitabevleri, 2. Baskı, S: 255
- NAKAMA, S., TAMAKI, K., ISHIKAWA, C., TADANO, M., MORI, NAOKI. (2012). Efficacy of *Bidens pilosa* Extract against *Herpes Simplex Virus* Infection *In Vitro* and *In vivo*, *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* **2012**: 10 pages
- NGUELEFACK, T.B., DIMO, T., NGUELEFACK MBUYO, E.P., TAN, P.V., RAKOTONIRINA, S.V., KAMANYI, A. (2005). Relaxant Effects of the Neutral Extract of the Leaves of *Bidens pilosa* Linn on Isolated Rat Vascular Smooth Muscle, *Phytotherapy Research*, **19**: 207-210
- ORTEGA, C.A., MARIA, A.O.M., GIANELLO, J.C. (2000). Chemical Components and Biological Activity of *Bidens subalternans*, *B. aurea* (Asteraceae) and *Zuccagnia punctata* (Fabaceae), *Molecules*, **5**: 465-467
- OLIVEIRA, F.Q., ANDRADE-NETO, V., KRETTLI, A.U., BRANDAO, M.G.L. (2004). New Evidences of Antimalarial Activity of *Bidens pilosa* roots Extract Correlated with Polyacetylene and Flavonoids, *Journal of Ethnopharmacology*, **93**: 39-42
- ÖNTÜRK, H., ÖZBEK, H. (2007). Deneysel Diyabet Oluşturulması ve Kan Şeker Seviyesinin Ölçülmesi, *Genel Tıp Dergisi*, **17(4)**: 231-236
- ÖZUSLU, E., TEL, A.Z., (2008). Türkiye Florasında (Flora of Turkey) Gaziantep'ten Bildirilen Lokalitelerin Güncellenmesi ve Yapılan Bazı Değişiklikler, *Biyolojik Çeşitlilik ve Koruma*, **1 (1)**: 99-107

- PAGANI, F., ROMUSSI, G. (1971). A New Polyinic D-Glucoside From *Bidens frondosa* Flowers, *Phytochemistry*, **10**: 2233
- PEREIRA, R.L.C., IBRAHIM, T., LUCCHETTI, L., R. da SILVA, A.J., G. de MORAES, V.L. (1999). Immunosuppressive and Anti-inflammatory Effects of Methanolic Extract and Polyacetylene Isolated from *Bidens pilosa* L., *Immunopharmacology*, **43**: 31-37
- PERRY G., CASH, A.D., SMITH, M.A. (2002). Alzheimer Disease and Oksidative Stress, *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, **2(3)**: 120-123
- PEREZ-AMADOR, M.C., OCOTERO, V.M., JIMENEZ, F.G. (2008). Biological Activity of Phototoxic Compounds in *Bidens squarrosa* H.B.K. (Asteraceae), *International Journal of Experimental Botany*, **77**: 103-111
- POWERS, A.C. (2012). Diabetes Mellitus, In: *Harrison's Principles of Internal Medicine Vol II 18th Edition*, Ed.: D. L. Long, D. L. Kasper, J. L. Jamesson, A. S. Fauci, S. L. Hauser, J. Loscalzo, Chapter: 344, p.:2968-3002
- POZHARITSKAYA, O.N., SHIKOV, A.N., MAKAROVA, M.N., KOSMAN, V.M., FAUSTOVA, N.M., TESAKOVA, S.V., MAKAROV, V.G., GALAMBOSI, B. (2010). Anti-inflammatory Activity of a HPLC-Fingerprinted Aqueous Infusion of Aerial Part of *Bidens tripartita* L., *Phytomedicine*, **17**: 463-468
- PRIESTAP, H.A., BENNETT, B.C., QUIRKE, J.M.E. (2008). Investigation of the Essential Oils of *Bidens pilosa* var. *minor*, *Journal of Essential Oil Research*, **20**: 396-402
- PRIOR, R.L., WU, X., SCHAICH, K. (2005). Standardized Methods for the Determination of Antioxidant Capacity and Phenolics in Foods and Dietary Supplements, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **53**: 4290-4302
- PULIDO, R., BRAVO, L., SAURA-CALIXTO F. (2000). Antioxidant Activity of Dietary Polyphenols as Determined by a Modified Ferric Reducing/Antioxidant Power Assay, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **48 (8)**: 3396-3402
- PISOSCHI, A.M., NEGULESCU, G.P. (2011). Methods for Total Antioxidant Activity Determination: A Review, *Biochemistry and Analytical Biochemistry*, **1 (1)**: 1000106
- RAUTER, A.P., MARTINS, A., BORGES, C., MOTA-FILIPE, H., PINTO, R., SEPODES, B., JUSTINO, J. (2010). Antihyperglycaemic and Protective Effects of Flavonoids on Streptozotocin-Induced Diabetic Rats, *Phytotherapy Research*, **24**: 133-138

- RE, R., PELLEGRINI, N., PROTEGGENTE, A., PANNALA, A., YANG, M., & RICE-EVANS, C. (1999). Antioxidant Activity Applying an Improved ABTS Radical Cation Decolorization Assay, *Free Radical Biology and Medicine*, **26(9/10)**: 1231–1237
- RODRIGUES, E.D., SILVA, D.B., OLIVEIRA, D.C.R., SILVA, G.V.J., (2009). DOSY NMR Applied to Analysis of Flavonoid Glycosides from *Bidens sulphurea*, *Magnetic Resonance in Chemistry*, **47**: 1095-1100
- RYBALCHENKO, N.P., PRYKHODKO, V.A., NAGORNA, S.S., VOLYNETS, N.N., OSTAPCHUK, A.N., KLOCHKO, V.V., RYBALCHENKO, T.V., AVDEEVA, L.V., (2010). *In vitro* Antifungal Activity of Phenylheptatriyne from *Bidens cernua* L. against Yeasts, *Fitoterapia*, **81**: 336-338
- SELEKLER, K. (2009). Diabet ve Demans, *Alzheimer Haber*, İlkbahar, **3**
- SILVA, F.L., FISCHER, D.C.H., TAVARES, J.F., SILVA, M.S., ATHAYDE-FILHO, P.F., BARBASO-FILHO, J.M. (2011). Compilation of Secondary Metabolites from *Bidens pilosa* L., *Molecules*, **16**: 1070-1102
- SUNDARARAJAN, P., DEY, A., SMITH, A., DOSS, A.G., RAJAPPAN, M., NATARAJAN, S. (2006). Studies of Anticancer and Antipyretic Activity of *Bidens pilosa* Whole Plant, *African Health Sciences*, **6 (1)**: 27-30
- SUZIGAN, M.I., BATTOCHIO, A.P.R., COELHO, K.L.R., COELHO, C.A.R. (2009). An Aqueous Extract of *Bidens pilosa* L. Protects Liver from Cholestatic Disease. Experimental Study in Young Rats, *Acta Cirurgica Brasileira*, **24(5)**: 347-352
- ŞAHİN, H.A. (2002). Asetilkolin, Kolinesterazlar ve Alzheimer Hastalığı, *Demans Dergisi*, **2**: 69-73
- ŞENDOĞDU, N. (2004). *Vitis vinifera* L. Yapraklarının Şeker Hastalığı Üzerindeki Etkilerinin Araştırılması, (Yüksek Lisans Tezi), Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Farmakognozi Anabilim Dalı
- TALESA, V.N. (2001). Acetylcholinesterase in Alzheimer's Disease, *Mechanisms of Ageing and Development*, **122**: 1961-1969
- TAN, P.V., DIMO, T., DONGO, E. (2000). Effects of Methanol, Cyclohexane and Methylene Chloride Extracts of *Bidens pilosa* on Various Gastric Ulcer Models in Rats, *Journal of Ethnopharmacology*, **73**: 415-421
- TANKER N., KOYUNCU M., COŞKUN M. (1998). *Farmasötik Botanik*, Ankara Üniversitesi Basımevi, Ankara, s.:359-366
- TIAN, X., ZHOU, S-X., WEI, H-L., HU, N., DAI, Z., LIU, Z-G., HAN. Z-Z., (2011). Flavonoids from the Herb of *Bidens pilosa* L., *Journal of Chinese Pharmaceuticals Sciences*, **20**: 518-522

- TOMCZYKOWA, M., TOMCZYK, M., JAKONIUK, P., TRYNISZEWSKA, E. (2008). Antimicrobial and Antifungal Activities of the Extracts and the Essential Oils of *Bidens tripartita*, *Folia Histochemica Et Cytobiologica*, **46(3)**: 389-393
- TOMCZYKOWA, M., LESZCZYNSKA, K., TOMCZYK, M., TRYNISZEWSKA, E., KALEMBA, D. (2011). Composition of the Essential Oil of *Bidens tripartita* L. Roots and Its Antibacterial and Antifungal Activities, *Journal of Medicinal Food*, **14(4)**: 428-433
- TUZLACI, E. (2006). *Şifa Niyetine Türkiye'nin Halk İlaçları*, Alfa Basım Yayın ve Dağıtım Ltd. Şti., İstanbul
- UBILLAS, R.P., MENDEZ, C.D., JOLAD, S.D., LUO, J., KING, S.R., CARLSON, T.J., FORT, D.M. (2000). Antihyperglycemic Acetylenic Glucosides from *Bidens pilosa*, *Planta Medica*, **66**: 82-83
- USDA Plants Database Erişim tarihi: 20.05.2011
Erişim:[<http://plants.usda.gov/java/reference?symbol=BIDEN>]
- WANG, N., YAO, X., ISHII, R., KITANAKA, S. (2001). Antiallergic Agents from Natural Sources. 3.¹) Structures and Inhibitory Effects on Nitric Oxide Production and Histamine Release of Five Novel Polyacetylene Glucosides from *Bidens parviflora* WILLD., *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, **49(8)**: 938-942
- WANG, N., YAO, X., ISHII, R., KITANAKA, S. (2003). Bioactive Sucrose Esters from *Bidens parviflora*, *Phytochemistry*, **62**: 741-746
- WANG, N.L., WANG, J., YAO, X.S., KITANAKA, S. (2006). Two Neolignan Glucosides and Antihistamine Release Activities from *Bidens parviflora* WILLD., *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, **54(8)**: 1190-1192
- WANG, N.L., WANG, J., YAO, X-S., KITANAKA, S. (2007). Two Monoterpene Glycosides and a New (+) – Jasmololone Glucoside from *Bidens parviflora* Willd., *Journal of Asian Natural Products Research*, **9(5)**: 449-455
- WANG, J., WANG, N., YAO, X., KITANAKA, S. (2007). Structures and Anti-histamin Activity of Chalcones & Aurones Compounds from *Bidens parviflora* Willd., *Journal of Traditional Medicines*, **2(1)**: 23-29
- WANG, G.G., LU X.H., WEI, L., ZHAO, X., ZHANG, C. (2011). Protective Effects of Luteolin on Diabetic Nephropathy in STZ-Induced Diabetic Rats, *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, Article ID 323171
- WAT, C-K., JOHNS, T., TOWERS, G.H.N. (1980). Phototoxic and Antibiotic Activities of Plants of the Asteraceae Used in Folk Medicine, *Journal of Ethnopharmacology*, **2**: 279-290

- WAYNER, D.D., BURTON, G.W., INGOLD, K.U., LOCKE, S. (1985). Quantitative Measurement of the Total, Peroxyl Radical-Trapping Antioxidant Capability of Human-Blood Plasma by Controlled Peroxidation-the Important Contribution Made by Plasma, *FEBS Letters*, **187**: 33-37
- WIKIPEDIA, Asteraceae, Erişim: [<http://en.wikipedia.org/wiki/Asteraceae>], Erişim Tarihi: 17.04.2013
- WOLNIAK, M., TOMCZYKOWA, M., TOMCZYK, M., GUDEJ, J., WAWER, I. (2007). Antioxidant Activity of Extracts and Flavonoids from *Bidens tripartita*, *Acta Poloniae Pharmaceutica-Drug Research* **63(5)**: 441-447
- WHO Monographs on Medicinal Plants Commonly Used in the Newly Independent States (NIS),(2010). *World Health Organization Press*
- WU, L-W., CHIANG, Y-M., CHUANG, H-C., WANG, S-Y., YANG, G-W., CHEN, Y-H., LAI, L-Y., SHYUR, L-F. (2004). Polyacetylenes Function as Anti-angiogenic Agents, *Pharmaceutical Research*, **21(11)**: 2112-2119
- YANG, H-L., CHEN, S-C., CHANG, N-W., CHANG, J-M., LEE, M-L., TSAI, P-C., FU, H-H., KAO, W-W., CHIANG, H-C., WANG, H-H., HSEU, Y-C. (2006). Protection from Oxidative Damage Using *Bidens pilosa* Extracts in Normal Human Erythrocytes, *Food and Chemical Toxicology*, **44**: 1513-1521
- YENİGÜN, M. (1995). *Her Yönü ile Diabetes Mellitus*, 1. Baskı, Taft Ofset, İstanbul
- YILDIZTUGAY, E., KÜÇÜKÖDÜK, M., (2010). The Flora of Kas Plateau and Its Surroundings (Anamur – Mersin/Turkey), *Biological Diversity and Conservation*, **3(2)**: 170-184
- ZHONG, M-M., CHEN, F-H., YUAN, L-P., WANG, X-H., WU, F-R., YUAN, F-L., CHENG, W-M. (2007). Protective Effect of Total Flavonoids from *Bidens bipinnata* L. Against Carbon Tetrachloride-Induced Liver Injury in Mice, *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, **59**: 1017-1025

EKLER



T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
REKTÖRLÜĞÜ
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Başkanlığı

SAYI : B.30.2.GÜN.0.05.06.00/142-12283
KONU :

22/06/2011

Sayın

Doç.Dr.Mustafa ASLAN
Gazi Üniversitesi Eczacılık Fakültesi
Farmakognozi Anabilim Dalı
Öğretim Üyesi

Araştırmacı grubu Mustafa ASLAN, Levent ALTUN, Ülkü Gökçen İÇÖZ ve Nilüfer ORHAN'dan oluşan, G.Ü.ET-11.064 kod numaralı ve "*Türkiye'de Yetişen Bazı Bidens L.Taksonları Üzerinde Farmakognozik Araştırmalar*" başlıklı araştırma öneriniz incelenmiş ve Gazi Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Yönergesindeki ilkelere uygun olduğu saptanarak onaylanmasına oybirliği ile karar verilmiştir.

Bilgilerinizi saygılarımla rica ederim.

It is unanimously approved that the research project numbered G.Ü.ET-11.064 and entitled "*Pharmacognostical Investigations on Some Bidens L.Taxons Growing in Turkey*" is in compliance with Gazi University Animal Experiments Local Ethics Committee regulations.

With my best regards.

EK : 1 Liste

Prof.Dr.Gökhan ALPASLAN
Gazi Üniversitesi
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Başkanı

ÖZGEÇMİŞ

I- Bireysel Bilgiler

Adı : Ülkü Gökçen
 Soyadı : İÇÖZ
 Doğum yeri ve tarihi : Erzincan-12.08.1981
 Uyruğu : T.C.
 Medeni Durumu : Evli
 İletişim Adresi : Sosyal Güvenlik Kurumu Genel Sağlık
 Sigortası Genel Müdürlüğü
 Telefonu : 0 543 870 81 81

II- Eğitimi

2008-2005 A.Ü. Eczacılık Fakültesi Farmakognozi A.B.D Tezli
 Yüksek Lisans (Tez Konusu: Deniz Süngeri *Agelas oroides*'in Etkili
 Bileşiklerinin İzolasyonu ve Yapı Tayini, 21.07.2008 tarihinde
 tamamlanmıştır)
 2004-2000 Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi
 1999-1992 Erzincan Anadolu Lisesi
 1992-1991 Samsun İstiklal İlkokulu
 1991-1989 Erzincan Atatürk İlkokulu
 1989-1987 Erzincan Merkez İlkokulu

Yabancı Dili : İngilizce

III- Ünvanları

2004-Eczacı
 2008-Bilim Uzmanı

IV- Mesleki Deneyimleri

2013-Halen Uzman Eczacı
 Sosyal Güvenlik Kurumu Genel Sağlık Sigortası Genel Müdürlüğü,
 İlaç Uygulama Şube Müdürlüğü

2011-2013 Uzman Eczacı

Sağlık Bakanlığı Türkiye İlaç ve Tıbbi Cihaz Kurumu Eşdeğer
(Jenerik) İlaçlar Birimi,

2011-2009 Uzman Eczacı

Sağlık Bakanlığı İlaç ve Eczacılık Genel Müdürlüğü
Ara Ürün Şubesi

2009-2007 Araştırma Görevlisi

Ankara Üniversitesi Eczacılık Fak. Farmakognozi ABD

2006-2004 Eczacı

Kavaklıdere Gökçen Eczanesi

V-Yayınları

ORHAN, İ.E., ÖZÇELİK, B., KONUKLUGİL, B., PUTZ, A., KABAN, Ü.G., PROKSCH, P. (2012). Bioactivity Screening of the Selected Turkish Marine Sponges and Three Compounds from *Agelas oroides*, *Records of Natural Products*, **6 (4)** : 356-367

VI- Bilimsel Etkinlikleri

- Almanya Duesseldorf'ta 3 ay (Eylül-Kasım, 2007) süre ile (Erasmus bursu ile) süngerlerden etkili bileşik izolasyonu, tez konusu (*Agelas oroides*'in Etkili Bileşiklerinin İzolasyonu ve Yapı Tayini) ve bitkisel materyallerden mantar izolasyonu üzerinde çalışmalar
- Mısır Sharm El Sheikh de düzenlenen “ 1st Euro-Mediterranean Conference on Marine Natural Products” kongresinde poster sunumu
- *Centella asiatica* (L.) Bitkisinin Biyolojik Aktiviteleri (Doktora Semineri I)
- Altın Çilek ve Önemi (Doktora Semineri II)
- 2008 Bitkisel İlaç Hammaddeleri Toplantısına (BİHAT) katılım
- Deniz Ürünlerinden Elde Edilen Antikanser Etkili Bileşikler (Yüksek Lisans Semineri)
- Almanya Duesseldorf'ta Deniz ürünleri ile ilgili seminerlere katılım