



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

FARMAKOGNOZİ ANABİLİM DALI

**İKİ *ALCHEMILLA* L. (ROSACEAE) TÜRÜ
ÜZERİNDE FİTOKİMYASAL
ARAŞTIRMALAR**

Mertcan ORTAHİSAR

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Dr. Öğr. Üyesi Nurdan YAZICI BEKTAŞ

TRABZON-2025

BEYAN

Yüksek Lisans Tezi olarak sunduğum “İki *Alchemilla* L. (Rosaceae) türü üzerinde fitokimyasal araştırmalar” başlıklı tez çalışmasının en başından beri tez danışmanım sayın Dr. Öğr. Üyesi Nurdan YAZICI BEKTAŞ’ın sorumluluğunda tamamladığımı ve tezimde yer alan ilgili verileri şahsımın topladığını ve analizleri ilgili laboratuvarında yaptığımı, Karadeniz Teknik Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Hazırlama ve Yazım Kılavuzu standartlarına uygun olarak yapıldığını ve yazıldığını, tezin akademik ve etik kurallara bağlı kalınarak gerçekleştirilmiş özgün bir bilimsel araştırma eserim olduğunu, tezde yer alan ve bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen tüm bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve kullanılan kaynakların kaynaklar listesinde yer aldığını, tezin çalışılması ve yazımı aşamalarda patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

13/02/2025

Mertcan ORTAHİSAR

İTHAF

Bu yüksek lisans tezimi, benim bu günlere gelmem için hiçbir fedakârlıktan kaçınmayan ve her zaman yanımda olan sevgili aileme, biricik eşime ve canım oğluma ithaf ediyorum.



TEŞEKKÜR

“İki *Alchemilla* L. (Rosaceae) Türü Üzerinde Fitokimyasal Araştırmalar” adlı bu çalışma Karadeniz Teknik Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Farmakognozi Anabilim Dalı’nda Yüksek Lisans Tezi olarak hazırlanmıştır.

Bu tezin hazırlanmasında katkıda bulunan herkese en içten teşekkürleri sunarım. Yüksek lisans eğitimimi en verimli şekilde sürdürebilmem adına tüm emekleri için Farmakognozi Anabilim Dalı başkanı ve öğretim üyelerine teşekkür ederim. Ayrıca tez çalışmamda danışmanlığımı üstlenen, çalışma süresi boyunca benden desteğini ve yardımını esirgemeyen kıymetli hocam sayın Dr. Öğr. Üyesi Nurdan YAZICI BEKTAŞ’a tüm içtenliğimle çok teşekkür ederim. Tezimde biyolojik aktivite çalışmalarında desteklerini ve olanaklarını paylaşan sayın Doç. Dr. Burak BARUT’a ve çalışmada kullanılan bitkilerin herbaryum örneklerinin hazırlanmasında desteklerini sunan sayın Doç. Dr. Yeter YEŞİL CANTÜRK’e teşekkür ederim.

Sevgisiyle, desteği ve fedakarlığı ile beni bugünlere getiren, maddi ve manevi destekleriyle her zaman yanımda olan sevgili aileme ve tezin her aşamasında bana moral motivasyon verip destek sağlayan sevgili eşim Ecz. İpek ORTAHİSAR’a sonsuz teşekkür ederim.

Bu çalışma Karadeniz Teknik Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: TYL-2023-10891

Ecz. Mertcan ORTAHİSAR

İÇİNDEKİLER

Sayfa

İÇ KAPAK

SAYFASI ONAY

BEYAN

İTHAF

TEŞEKKÜR

İÇİNDEKİLER

vi

TABLolar DİZİNİ

viii

ŞEKİLLER DİZİNİ

ix

KISALTMALAR, SİMGELER ve FORMÜLLER DİZİNİ

x

ÖZET

xi

ABSTRACT

xii

1. GİRİŞ ve AMAÇ

1

2. GENEL BİLGİLER

4

2.1. Botanik Özellikler

4

2.1.1. Rosaceae Familyasının Botanik Özellikleri

4

2.1.2. *Alchemilla* L. Cinsinin Genel Özellikleri

4

2.1.3. *Alchemilla daghestanica* Juz.

8

2.1.4. *Alchemilla minusculiflora* Buser

10

2.2. *Alchemilla* Türleri Üzerinde Yapılan Kimyasal Çalışmalar

12

2.3. *Alchemilla* Türleri Üzerinde Yapılan Farmakolojik Çalışmalar

14

2.3.1. Geleneksel Kullanım

14

2.3.2. Antioksidan Aktivite

15

2.3.3. Antiinflamatuvar Aktivite

16

2.3.4. Antimikrobiyal Aktivite

16

2.3.5. Yara İyileştirici Aktivite

17

2.3.6. Enzim İnhibisyonu Aktivitesi

19

2.3.7. Kardiyovasküler Aktivite

20

2.3.8. Sitotoksik Aktivite

20

3. GEREÇ ve YÖNTEM

22

3.1. Gereç

22

3.1.1. Kullanılan Cihazlar	22
3.1.2. Kimyasal Maddeler ve Ekipmanlar	23
3.1.3. Kullanılan Çözeltiler	23
3.2. Yöntem	24
3.2.1. Bitki Materyalleri	24
3.2.2. Ekstraksiyon İşlemleri	24
3.2.3. Toplam Fenolik ve Flavonoit Madde Miktarı Tayini	25
3.2.3.1. Toplam Fenolik Madde Miktarı Tayini	25
3.2.3.2. Toplam Flavonoit Madde Miktarı Tayini	25
3.2.4. Antioksidan Aktivitelerin İncelenmesi	26
3.2.4.1. DPPH Radikal Süpürme Aktivitesinin Belirlenmesi	26
3.2.5. Enzim İnhibisyon Çalışmaları	26
3.2.5.1. COX 1/2 Enzim İnhibisyonu	26
3.2.5.2. Elastaz Enzim İnhibisyonu	27
3.2.5.3. Kollajenaz Enzim İnhibisyonu	27
3.2.5.4. İstatiksel Analiz	27
3.2.5.5. LC-MS/MS Analizinin Gerçekleştirilmesi	27
4. BULGULAR	29
4.1. Ekstraksiyon Bulguları	29
4.2. Toplam Fenolik Madde Miktarı Tayini	29
4.3. Toplam Flavonoit Madde Miktarı Tayini	29
4.4. Antioksidan Aktivitenin İncelenmesi	30
4.4.1. DPPH Radikal Süpürme Aktivitesinin Belirlenmesi	30
4.5. Enzim İnhibisyonu İncelenmesi	31
4.5.1. COX 1/ 2 Enzim İnhibisyonu Etkinliğinin Belirlenmesi	31
4.5.2. Elastaz Enzim İnhibisyon Etkinliğinin Belirlenmesi	32
4.5.3. Kollajenaz Enzim İnhibisyon Etkinliğinin Belirlenmesi	33
4.6. LC- MS/MS Analiz Sonuçları	33
5. TARTIŞMA ve SONUÇ	38
6. KAYNAKLAR	44
7. ÖZGEÇMİŞ	51

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo No	Sayfa
Tablo 1. <i>Alchemilla</i> türlerinden izole edilen bileşikler	12
Tablo 2. Kullanılan cihazlar ve markaları	22
Tablo 3. Kullanılan kimyasallar, marka ve kodları	23
Tablo 4. Ekstrelerin toplam fenolik madde miktarı	29
Tablo 5. Ekstrelerin toplam flavonoid madde miktarı	30
Tablo 6. Ekstrelerin DPPH aktivitesi (%)	30
Tablo 7. Ekstrelerin COX-1 etkinliği (%)	31
Tablo 8. Ekstrelerin COX-2 etkinliği (%)	32
Tablo 9. Ekstrelerin COX-1/COX-2 oranı	32
Tablo 10. Ekstrelerin elastaz inhibisyon etkinliği (%)	33
Tablo 11. Ekstrelerin kollajenaz inhibisyon etkinliği (%)	33
Tablo 12. Almin Kök ve Alda Kök Ekstrelerinin LC-MS/MS Analiz Sonuçları	36

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil No		Sayfa
Şekil 1.	<i>Alchemilla</i> L. türlerinin dünyadaki yayılışı	5
Şekil 2.	<i>Alchemilla daghestanica</i> çiçeğin üstten ve yandan görünüşü	8
Şekil 3.	<i>Alchemilla daghestanica</i> türünün Türkiye’deki yayılışı	9
Şekil 4.	<i>Alchemilla daghestanica</i>	9
Şekil 5.	<i>Alchemilla minusculiflora</i> türünün Türkiye’deki yayılışı	11
Şekil 6.	<i>Alchemilla minusculiflora</i>	11
Şekil 7.	Standart bileşiklerin LC-MS/MS analizine ait kromatogram	34
Şekil 8.	Almin Kök ekstresi LC-MS/MS analizine ait kromatogram	34
Şekil 9.	Alda Kök ekstresi LC-MS/MS analizine ait kromatogram	35

KISALTMALAR, SİMGELER ve FORMÜLLER DİZİNİ

Kısaltmalar

ABTS	2,2-azino-bis-(3-etil-benzia-6-sulfonik asit)
COX-1	Siklooksijenaz-1
COX-2	Siklooksijenaz-2
DPPH	2,2-Difenil-1-Pikrilhidrazil
EPG	Epigallokateşin Gallat
ESCAP	European Scientific Cooperative on Phytotherapy
HRBC	Kırmızı Kan Hücresi
ISTE	İstanbul Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Herbaryumu
LC -HR/MS	Yüksek Çözünürlüklü Kütle Spektrometresi
UHPLC	Ultra Performans Sıvı Kromatografisi

Simgeler

°C	Celsius Derece
cm	Santimetre
kg	Kilogram
µg	Mikrogram
µL	Mikrolitre
m	Metre
mg	Miligram
mL	Mililitre
mM	Milimol
±	Standart Hata Payı
%	Yüzde

ÖZET

İki *Alchemilla* L. (Rosaceae) Türü Üzerinde Fitokimyasal Araştırmalar

Alchemilla cinsi, Rosaceae familyasına ait olup Türkiye’de 35’i endemik olmak üzere 82 tür ile temsil edilmektedir. Bitkinin çeşitli türleri Avrupa’da ve Anadolu’da halk arasında jinekolojik rahatsızlıklarda, menopoz sıkıntılarında, gastrointestinal hastalıklarda dahilen; egzama, yara, çıban, kaşıntı ve kızarıklık tedavisinde haricen yaygın şekilde kullanılmaktadır. *Alchemilla* cinsi üzerinde yapılan çalışmalarda türlerin fenolik içerik bakımından zengin olduğu; tanenler, proantosiyanidinler, flavonoidler, fenolik asitler ve triterpenleri ihtiva ettikleri raporlanmıştır. Derinin ana yapısal proteinlerinden biri olan kollajen cildin elastikiyetinde; elastin ise yaralanmalarda cildin onarımında etkin rol oynar. Ayrıca yaralanmalarda siklooksijenaz aktivitesi artarak inflamasyon yanıtın oluşması sağlanır. Tasarlanan bu çalışmada Türkiye’de doğal olarak yetişen *Alchemilla daghestanica* Juz. ve *Alchemilla minusculiflora* Buser bitkilerinin kök ve toprak üstü kısımlarından metanol ekstraktları hazırlanmış (Alda herba, Alda kök, Almin herba, Almin kök), ekstraktların yara iyileşmesi ile bağlantılı olabilecek siklooksijenaz 2 (200 µg/mL konsantrasyonda; Alda kök % 91.89 ± 1.27, Almin kök % 91.82 ± 0.56 ve pozitif standart diklofenak % 73.87 ± 1.93 inhibisyon), elastaz (Alda herba IC₅₀ 72.22 µg/mL, Almin kök IC₅₀ 40.35 µg/mL, pozitif standart epigallokateşin gallat IC₅₀ 9.35 µg/mL), kollajenaz enzimlerini inhibe etme kapasiteleri incelenmiştir. Yapılan aktivite çalışmalarında bitki kök ekstraktlarının daha kuvvetli biyolojik aktivite gösterdikleri; bu ekstraktların kateşin (Alda kök 50,433 µg/g, Almin kök 65,806 µg/g) ve ellajik asit (Alda kök 2,799 µg/g, Almin kök 6,725 µg/g) bileşiklerince zengin oldukları tespit edilmiştir. *Alchemilla* türlerinin genellikle toprak üstü kısımlarının geleneksel kullanımda yer aldığı bilinmektedir. Kök kısımların da eczacılıkta kullanım açısından potansiyel etkilere sahip olduğu bu çalışma ile ortaya konmuştur.

Anahtar Kelimeler: *Alchemilla daghestanica* Juz., *Alchemilla minusculiflora* Buser, enzim inhibisyonu, fenolik bileşikler, LC-MS/MS, yara iyileştirici

ABSTRACT

Phytochemical Investigation on Two *Alchemilla* L. (Rosaceae) Species

The genus *Alchemilla*, belonging of Rosaceae family, comprises 82 species in Türkiye, 35 of which are endemic. Various species of the genus are extensively utilized by the public in Europe and Anatolia for the treatment of gynecological illnesses, menopausal issues, gastrointestinal ailments, eczema, wounds, boils, pruritus, and erythema. Research on the *Alchemilla* genus indicates that species are abundant in phenolic compounds, including tannins, proanthocyanidins, flavonoids, phenolic acids, and triterpenes. Collagen, one of the main structural proteins of the skin, plays a role in skin elasticity; elastin, on the other hand, plays an active role in skin repair during injuries. Additionally, in injuries, cyclooxygenase activity increases, leading to the formation of an inflammatory response. In this designed study, methanol extracts (Alda herba, Alda root, Almin herba, Almin root) were prepared from the roots and aerial parts of *Alchemilla daghestanica* Juz. and *Alchemilla minusculiflora* Buser, which naturally grow in Turkey. The capacities of these extracts to inhibit cyclooxygenase 2 (at a concentration of 200 µg/mL; Alda root $91.89 \pm 1.27\%$, Almin root $91.82 \pm 0.56\%$, and positive standard diclofenac $73.87 \pm 1.93\%$ inhibition), elastase (Alda herba IC_{50} 72.22 µg/mL, Almin root IC_{50} 40.35 µg/mL, positive standard epigallocatechin gallate IC_{50} 9.35 µg/mL), and collagenase enzymes were investigated. In the conducted activity studies, it was determined that the root extracts exhibited stronger biological activity; these extracts were found to be rich in catechin (Alda root 50.433 µg/g, Almin root 65.806 µg/g) and ellagic acid (Alda root 2.799 µg/g, Almin root 6.725 µg/g) compounds. The aerial components of *Alchemilla* species are commonly utilized in ethnobotanical applications. The research has shown that the root components has potential use in pharmacology.

Keywords: *Alchemilla daghestanica* Juz., *Alchemilla minusculiflora* Buser. Enzyme inhibitor, LC-MS/MS, phenolic compounds, wound healing

1. GİRİŞ ve AMAÇ

Dünyada yaklaşık olarak 425 bin bitki çeşidi olduğu bilinmektedir. Bu bitkilerin 50 bin ile 70 bin kadarı ise tıbbi bitki türü olarak tanımlanmıştır. Dünya Sağlık Örgütü (WHO) verilerine göre ise günümüzde tedavi edici amacıyla kullanılan tıbbi bitki sayısının 20 bin civarında olduğu bilinmektedir. Ülkemiz, bitki biyolojik çeşitliliği açısından dünyada zengin ülkeler arasında yer almaktadır. Dünyanın diğer ülkelerinde olduğu gibi Türkiye’de de tıbbi bitkilerin büyük bir kısmı doğadan doğal yollarla elde edilmektedir (1).

Türkiye’de yetişen önemli tıbbi bitkiler arasında yer alan Rosaceae familyasının en geniş yayılım gösteren cinslerinden biri *Alchemilla* L. dir. Bu bitki cinsi dünyada yaklaşık olarak 1000’in üzerinde tür ile temsil edilirken ülkemizde 35 tanesi endemik olmak üzere son yıllarda yapılan kapsamlı çalışmalar sonucunda 82 tür tespit edilmiştir (2, 3). Türkiye’de yetişmekte olan *Alchemilla* türleri çoğunlukla Türkiye’nin kuzey bölgesinde yer almaktadır. Ayrıca Avrupa ve Asya’da geniş yayılışa sahiptir. Birçok bölgede peyzaj amaçlı kullanıldığı görülebilmektedir (4).

Alchemilla türleri Avrupa ülkelerinde Lady's mantle, Bear's foot, Lions's foot gibi isimlerle bilinmekte ve halk arasında yaygın şekilde tıbbi amaçlı olarak kullanılmaktadır. *Alchemilla* türlerinin toprak üstü kısımları dahilen menopozal rahatsızlıkların tedavisinde, dismenore, menoraji ve menstrüal ağrı gibi jinekolojik rahatsızlıklarda, gastrointestinal sistem rahatsızlıklarında, iltihabi rahatsızlıklarda kullanılmaktadır. Yaralarda, egzama, kaşıntı ve kızarıklık gibi hassas cilt problemlerinde ise tedavi edici olarak haricen kullanılmaktadır. Ayrıca yine halk arasında diüretik, astrenjan, antispazmodik ve yara iyileştirici etki için kullanıldığı bilinmektedir (5-7). Avrupa Fitoterapi Bilimsel Kooperatifi (European Scientific Cooperative on Phytotherapy – ESCOP) *Alchemilla vulgaris* L. türünün dismonere, diyare ve gastrointestinal bozukluklarda tedavi edici olarak kullanımını tanımlanmıştır. Bitkinin bu tür bozukluklarda etkili olabilmesi için tanen içeriğinin pirogallol türevli olması gerektiği bildirilmiştir (8).

Alchemilla türlerinin toprak üstü kısımları ülkemizde de halk arasında yara iyileştirici, astrenjan, antidiyareik, diüretik etkili olarak ve ayrıca menstrüasyon problemlerinde, jinekolojik rahatsızlıklarda, astım, bronşit, öksürük, diyabet, böbrek ve mide rahatsızlıklarının tedavisinde iyileştirici ve tedavi edici olarak kullanılır. Halk arasında çoğunlukla “fındık otu”, “keltat” veya “aslan pençesi” adıyla bilinmektedir (6, 9). Çalışmaya konu olan *Alchemilla minusculiflora* Buser türü Avrupa-Sibiry elementleri bir

bitkidir ve ülkemizde çiçek ve yapraklarından çeşitli yemekler yapılmaktadır (10), ayrıca bitkinin yaprak ve çiçeklerinden hazırlanan infüzyonunun çıban tedavisinde kullanımı olduğu bilinmektedir (11).

Literatürde çeşitli *Alchemilla* türleri üzerinde yapılan çalışmalarda cinsin tanenler, flavonoidler, proantosyanidinler, triterpenler ve fenolik asitlerce zengin olduğu saptanmıştır (9, 12). Yapılan literatür incelemelerinde tespit edilen fitokimyasal çalışmalar Bölüm 2.2. *Alchemilla* Türleri Üzerine Yapılan Kimyasal Çalışmalar kısmında listelenmiştir.

Ayrıca literatür taramasında, hazırlanan farklı polaritelerdeki ekstraktların ve bitkilerden izole edilen saf bileşiklerin üzerinde hepatoprotektif, antidiyabetik (6), antimikrobiyal, antiinflamatuvar (9, 13), gastroprotektif (14), antioksidan (7, 15, 16), nöroprotektif (17), asetilkolinesteraz ve α -glukozidaz enzim inhibisyonu (7), dismenore üzerine etki (17), sitotoksik etkiler (13) gibi çeşitli biyolojik aktivite çalışmalarına rastlanmaktadır. Literatürde tespit edilen detaylı biyolojik aktivite çalışmaları Bölüm 2.3. *Alchemilla* Türleri Üzerine Yapılan Farmakolojik Çalışmalar başlığı altında özetlenmiştir.

Kollajen cildimizin ana yapısal proteinidir ve cildin güç, esneklik ve sağlamlığından sorumludur. Kollajenaz enzimi kollajen proteinini parçalayan enzimdir ve inhibisyonu dokunun yeniden yapılanması, dokuların ve sistemlerin normal işleyişi ve gelişimsel süreçleri yara iyileşmesinde önemli bir görev üstlenmektedir (18). Cildin ve bağ dokunun elastikiyeti elastik liflerle birlikte sağlanmaktadır. Elastin proteini ise hücre dışı bir matris proteinidir ve cilt elastikiyetini oluşturan yapılardan biridir. Elastaz enzimi heliks yapıda olan elastinin ayrılmasına ve bu şekilde cildin elastik lifinin bozulmasında ve sarkmasında görev alır. Bu nedenle elastaz enziminin inhibisyonu cildin elastikiyet yapısının bozulmasında ve cildin yaşlanmasının önüne geçilmesinde etkili bir yöntemdir (19,20). Ciltteki yaralanmaların iyileşme sürecinde siklooksijenaz-2 (COX-2) aktivitesinin artması, inflamasyon cevabının artmasıyla ve deride yara izi oluşumuna sebep olduğu; COX-2'nin selektif inhibisyonunu hedeflemenin yetişkin cildinde yara izi oluşumunu sınırlamak için kullanılabilecek bir yöntem olduğu bilinmektedir (21).

Bitkiler içerdikleri aktif sekonder metabolitler ile antiinflamatuvar, antimikrobiyal, antioksidan ve hücre stimüle edici özellikler gibi biyolojik etkinlikler göstererek yara iyileşmesini hızlandırabilirler. *Alchemilla* türlerinin yaralarda ve enfeksiyöz durumlarda geleneksel olarak kullanımına dayanarak yara ile ilişkili olabilecek bilimsel çalışmalar

planlanmaktadır (17). *Alchemilla mollis* (Buser) Rothm. ve *Alchemilla persica* Rothm. türlerinin kök ve toprak üstü kısımlarından hazırlanan metanol: su (80:20) ekstralarının biyolojik etkinlikleri; *in vivo* hayvan deneyi ile lineer insizyon ve sirkular eksizyon yara modellerinde, *in vitro* deneyler ile antiinflamatuvar ve antioksidan modellerde test edilmiş ve toprak üstü kısımların pozitif standart ile benzer etkinlikte olduğu belirlenmiştir (3). Ellajik asidin kutanöz lipid peroksidasyonunu önleyebildiği, UV-B ışınlarının neden olduğu kolajen yıkımını ve inflamasyon tepkilerini önleyebildiği; kersetin glikozitinin ve ellajik asitin kolajen üretimini iyileştirerek yara iyileşme hızını arttırabildiği gösterilmiştir (17). Sodyum lauril sülfat le tahriş edilmiş cilt üzerine uygulanan *Alchemilla* ekstresi içerikli kremin doza bağımlı olarak antiinflamatuvar etki gösterdiği raporlanmıştır (22). *A. vulgaris* kök ve toprak üstü kısımlarından hazırlanan metanollü ekstraların yüksek fenolik madde içeriğine sahip olduğu, antimikrobiyal ve antioksidan etkinliklerinin yanında siklooksijenaz-1 (COX-1) ve COX-2 üzerinde inhibisyon etki gösterdikleri saptanmıştır (23). *A. vulgaris* toprak üstü kısımlarından hazırlanan farklı karakterdeki ekstraların yara iyileştirici etki potansiyellerinin incelenmesi için 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) yöntemi ile antioksidan kapasiteleri test edilmiştir, L929 fibroblast hücreleri üzerinde *in vitro* yara modeli ve *in vivo* cilt bariyerini yenileme modelinde çalışılmıştır. Tüm ekstraların yara iyileşme sürecini hızlandırdığı, etanollü ekstrenin fibroblastlar üzerine etkisinin en yüksek olduğu rapor edilmiştir (24).

Alchemilla tür sayısının yüksek olması, yaygın şekilde yetişmesi ve tüm dünyada halk arasında sıklıkla kullanılması ve deneysel çalışmalarda yüksek etkinliklerinin tespit edilmesine rağmen cins üzerinde eczacılık bakımından çalışma sayısı maalesef çok düşüktür. Tasarlanan bu çalışmanın amacı; Türkiye’de yetişen ve daha önce üzerinde herhangi bir sekonder metabolit analizi ve biyolojik aktivite çalışması yapılmamış *A. daghestanica* Juz. ve *A. minusculiflora* Buser türlerinin toprak üstü ve kök kısımlarından hazırlanan metanol ekstralarının *in vitro* antioksidan, COX-1/COX-2 selektivite, elastaz ve kollajenaz enzim inhibisyonu aktivitelerinin test edilmesi ve her iki bitki türü için en yüksek aktiviteyi gösteren total ekstrenin kimyasal içerik profilinin LC-MS/MS analizi ile ortaya konulmasıdır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Botanik Özellikler

2.1.1. Rosaceae Familyasının Botanik Özellikleri

Rosaceae familyasının bitkileri, dünya genelinde yaygın olarak bulunmakla birlikte, özellikle Kuzey Yarımküre’de daha fazla yayılım göstermektedir. Bu bitkiler çoğunlukla çok yıllık olsa da tek yıllık olanlarına da rastlanmaktadır. Bitkiler otsu veya odunsu yapıda olabilir ve bazen dallanmış olarak bulunabilirler. Yaprakları genellikle alternatif dizilişli ve stipulalıdır. Yapraklar basit veya bileşik yaprak şeklinde olabilir ve yaprak kenarları çoğunlukla dişlidir. Çiçek durumu, ağaçlarda ve çalılarda genellikle mahmuz şeklinde sürgün verir. Çiçekler hermafrodit veya tek eşeyli olabilir, aktinomorf, epigin veya perigin yapıda ve 4-5 sepallidir. Çoğunlukla hipantiyum bulunur. Petaller 4-5 tane ve bağımsızdır. Stamenler petal sayısı kadar veya daha fazla olabilir. Ovaryum üst veya alt durumda olabilir. Karpeller, sadece alt durumlu ovaryuma sahip cinslerde birleşik olarak bulunur. Meyveler yaş veya kuru olabilir ve çiçek tablası veya hipantiyum üzerinde, aken tipi, drupa ve çekirdekli olabilir. Tohumlar endosperma taşımaz ve besin maddesi kotiledonda toplanmıştır. Rosaceae familyasına ait kabul edilmiş 222 cins ve 6000 civarında tür bulunmaktadır (25). Anadolu, Rosaceae familyası için hem tür çeşitliliği hem de ekonomik önemi açısından dikkat çekici bir bölgedir. Bölgedeki 35 kadar cins ve 250 tür, bu familyanın biyolojik zenginliğini ve tarımsal önemini ortaya koymaktadır. Meyve çeşitliliği nedeniyle, Rosaceae familyası Anadolu tarımında önemli bir rol oynamaktadır (26).

2.1.2. *Alchemilla* L. Cinsinin Genel Özellikleri

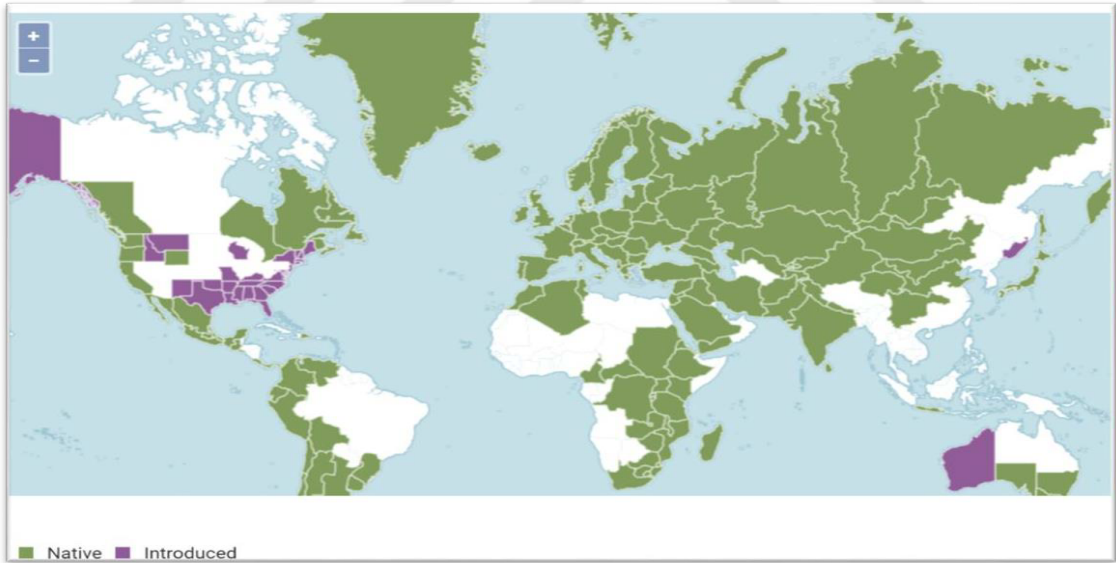
Alchemilla türleri, çoğunlukla Avrasya’da yayılım göstermekle birlikte Avrupa, Doğu Afrika, Kuzey ve Güneybatı Amerika ve Avustralya’da da yetişmektedir. Türkiye’de ise bu türler daha çok Kuzey Anadolu Bölgesi’nde görülürken, Kırım ve Kafkasya’da da rastlanmaktadır. Bu bitkiler çok yıllık olup odunsu rizomlara sahiptirler. Yaprakları palmat veya lobludur. Teşhis sırasında yaprakların olgun ve taban yaprakları, sinüs için ise iki taban lobu arasındaki açığı veya boşluk dikkate alınır. Çiçekleri 4-5 adet birleşik salkım şeklinde gözlemlenir. Hipantiyum urseolat şeklindedir. Epikaliks bulunur ve stamenler 4-5 tanedir. Meyveleri tek, aken tipinde olup, tamamen veya kısmen ince, kuru hipantiyumla kaplıdır. Avrupa’da yetişen türlerin çoğu eşeysiz olarak çoğalır ve polenleri büyük ölçüde

gelişmemiştir. Ayrıca bu bitkiler peyzaj amaçlı olarak da kullanılmaktadır. Sezon sonu büyümesinde veya kesilme, otlatılma gibi durumlarda yaprak şekli ve tüylenmesinde farklılıklar görülebilmektedir (26).

Türkiye florasında *Alchemilla* cinsi 82 tür ile temsil edilmektedir (3).

Alchemilla L. cinsinin sistematik olarak sınıflandırması aşağıdaki gibidir (26):

Alem : Plantae
Bölüm : Spermatophyta
Alt Bölüm : Angiospermae
Sınıf : Dicotyledones
Alt Sınıf : Dialypetalae
Takım : Rosales
Familya : Rosaceae
Cins : *Alchemilla* L.



Şekil 1. *Alchemilla* L. türlerinin dünyadaki yayılışı (27)

Türkiye’de, *Alchemilla* cinsine ait toplam 82 tür bulunmaktadır. Endemik takson sayısı 35’tir (28). Bunlar;

Alchemilla L. Lektotip tür *A. vulgaris*

- *Alchemilla abchasica* Buser
- *Alchemilla akdoganica* Kalheber (E)
- *Alchemilla amoena* (Czeczott) Rothm. (E)
- *Alchemilla ancerensis* Kalheber (E)
- *Alchemilla armeniaca* Rothm. (E)
- *Alchemilla ayazii* Kalheber (E)
- *Alchemilla ayderensis* Kalheber (E)
- *Alchemilla barbatiflora* Juz.
- *Alchemilla basakii* Kalheber (E)
- *Alchemilla beyazoglui* Kalheber (E)
- *Alchemilla boluensis* Menemen & Hamzaoglu (E)
- *Alchemilla bornmuelleri* Rothm. (E)
- *Alchemilla bursensis* Pawl. (E)
- *Alchemilla buseriana* Rothm. (E)
- *Alchemilla caucasica* Buser
- *Alchemilla chlorosericea* (Buser) Juz.
- *Alchemilla cimilensis* Kalheber (E)
- *Alchemilla ciminensis* Pawl. (E)
- *Alchemilla compactilis* Juz.
- *Alchemilla crinita* Buser
- ***Alchemilla daghestanica* Juz.**
- *Alchemilla dura* Buser
- *Alchemilla elevitensis* Kalheber (E)
- *Alchemilla ellenbergiana* Rothm.
- *Alchemilla epipsila* Juz.
- *Alchemilla erythropoda* Juz.
- *Alchemilla erzincanensis* Pawl. (E)
- *Alchemilla fissa* Günther & Schummel
- *Alchemilla gigantodus* S. E. Fröhner
- *Alchemilla glabricaulis* Lindb. (E)
- *Alchemilla grossheimii* Juz.
- *Alchemilla hamzaoglui* Yild. (E)
- *Alchemilla haraldi* Juz.
- *Alchemilla hayirliogluorum* Kalheber (E)
- *Alchemilla hemsinica* Kalheber (E)
- *Alchemilla hessii* Rothm.
- *Alchemilla heterophylla* Rothm.
- *Alchemilla hirsutiflora* (Buser) Rothm. (E)
- *Alchemilla hirtipedicellata* Juz.
- *Alchemilla holocycla* Rothm. (E)
- *Alchemilla holotricha* Juz.
- *Alchemilla ikizdereensis* Kalheber (E)
- *Alchemilla kackarensis* Kalheber (E)
- *Alchemilla lithophila* Juz.

- *Alchemilla microscopica* S. E. Fröhner
- *Alchemilla minusculiflora* Buser
- *Alchemilla mollis* (Buser) Rothm.,
- *Alchemilla monticola* Opiz
- *Alchemilla oligotricha* Juz.
- *Alchemilla orduensis* Pawl. (E)
- *Alchemilla oriturcica* Pawl. (E)
- *Alchemilla orthotricha* Rothm.
- *Alchemilla ovitensis* Menemen & Hamzaoglu (E)
- *Alchemilla oxysepala* Juz.
- *Alchemilla paracompactilis* Ponert (E)
- *Alchemilla pectiniloba* S. E. Fröhner
- *Alchemilla persica* Rothm.
- *Alchemilla plicatissima* S. E. Fröhner
- *Alchemilla plicatula* Gand.
- *Alchemilla porrectidens* Juz.
- *Alchemilla procerrima* S. E. Fröhner (E)
- *Alchemilla pseudocartalinica* Juz.
- *Alchemilla pseudomollis* Juz.
- *Alchemilla retinervis* Buser
- *Alchemilla rivularis* Ponert,
- *Alchemilla rizensis* Pawl. (E)
- *Alchemilla sciadiophylla* Rothm. (E)
- *Alchemilla sericata* Rchb.
- *Alchemilla sericea* Willd.
- *Alchemilla sintenisii* Rothm. (E)
- *Alchemilla smirnovii* Juz.
- *Alchemilla speciosa* Buser.
- *Alchemilla stevenii* Buser
- *Alchemilla straminea* Buser
- *Alchemilla stricta* Rothm.
- *Alchemilla surculosa* S. E. Fröhner
- *Alchemilla tiryalensis* Pawl. (E)
- *Alchemilla trabzonica* Hay.-Ayaz & Beyazoglu (E)
- *Alchemilla transcaucasica* Rothm.
- *Alchemilla valdehirsuta* Buser
- *Alchemilla venosa* Juz.
- *Alchemilla ziganadagensis* Pawl. (E)

Bu çalışmada *Alchemilla daghestanica* Juz. ve *Alchemilla minusculiflora* Buser türleri üzerinde fitokimyasal araştırmalar yapılmıştır.

2.1.3. *Alchemilla daghestanica* Juz.

Çok yıllık ve koyu yeşil renkli bir bitkidir. Gövde 20-40 cm uzunlukta ince fakat oldukça dayanıklı, eğik ve tamamen adpres tüylerle kaplıdır. Yapraklar reniform açık sinuslu 4.5-5.2 cm genişlikte ve genellikle 9 loblu; loblar ovat ya da dairemsi ve kısa yarıklarla ayrılır. Yaprak dişleri 6-8 adet, küçük akut ya da obtus, az çok eşit ve apikal diş uzunluğu yan dişler kadardır. Yaprığın üst yüzeyi, kenarlarda ve kıvrımlarda tüylü, alt yüzey ise tamamen tüylüdür. Petioller 12 cm uzunlukta ve adpres tüylerle kaplıdır. Gövde yaprakları iyi gelişmiştir. Çiçek durumu dar, çiçekler 3-3.5 mm genişliktedir. Hipantiyum uzamış abkonoit yapıda, 2mm uzunlukta ve tüysüzdür. Sepaller hipantiyumdan kısa (1.5 mm'ye kadar) tüysüz, epikaliks lobları sepallerin yarısı kadar uzunlukta, fakat daha dar ve tüysüz, pediseller tüysüz şekildedir (29).

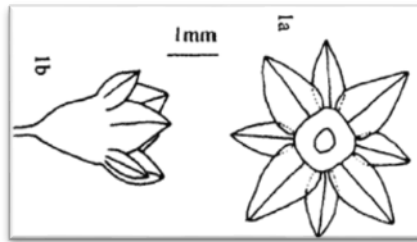
Çiçeklenme zamanı: Mayıs- Temmuz ayı

Yetiştirme ortamı: Dağlardaki çimenlikler ve otlu çalılıklar, 1750-1800m.

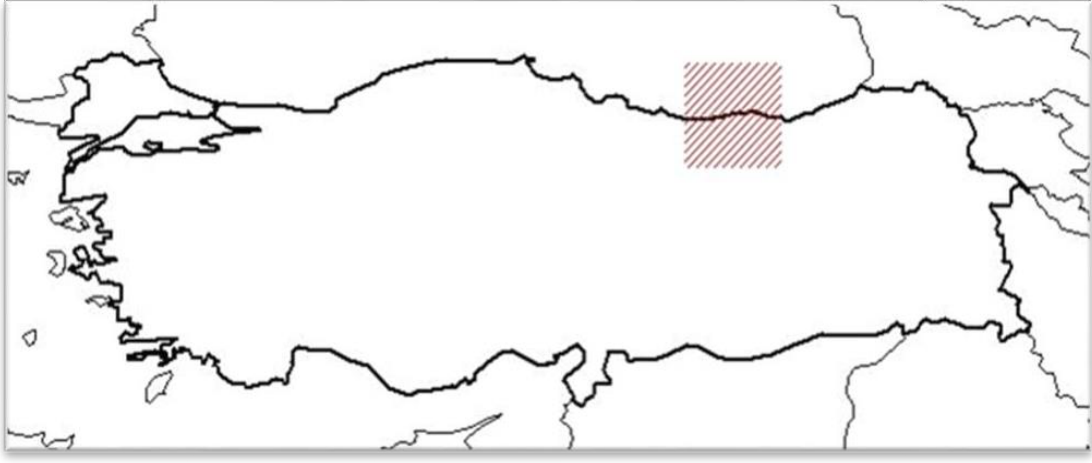
Tipus: Leningrad.

Türkiye'deki Yayılışı:

A7 Trabzon: Zigana Dağ tesislerinin doğu tarafındaki yamaç, 1750-1800 m, (29)



Şekil 2. *Alchemilla daghestanica* çiçeğin üstten ve yandan görünüşü



Şekil 3. *Alchemilla daghestanica* türünün Türkiye’deki yayılışı (30)



Şekil 4. *Alchemilla daghestanica*

2.1.4. *Alchemilla minusculiflora* Buser

Çok yıllık, oldukça narin ve ince olan gövde 12 cm boyunda ve oldukça seyrek adpres tüylü. Petioller 2.2-4 cm uzunlukta, tüysüz veya çok seyrek yatık tüylü. Yapraklar orbikular-reniform şekilde, kapalı ya da dar sinuslu, 1.8-3 cm genişlikte 7-9 loblu ve loblar oldukça geniş, yuvarlak-trunkat ve belirgin dişsiz yarıklarla ayrılır. Yaprak dişleri 5-6 adet, eşit ve tepesi akut, apikal diş iki yandaki dişlerden daha kısa şekildedir. Yaprakının üst yüzeyinde tüy bulunmaz, alt yüzeyinde ise sadece damarlarda tüy görülmektedir. Çiçekler 2.5-3 mm genişliktedir ve pediseller tüsüzdür. Hipantiyum ise tüsüz ve 1.7-2.0 mm uzunluktadır. Sepaller ya hipantiyum kadar ya da ondan kısa ve epikaliks lobları gibi tüsüzdür (26,29).

Çiçeklenme zamanı = Haziran – Temmuz ayı

Yetiştirme ortamı = Alpin çayırliklar ve su akıntıları, 1850-2400 m

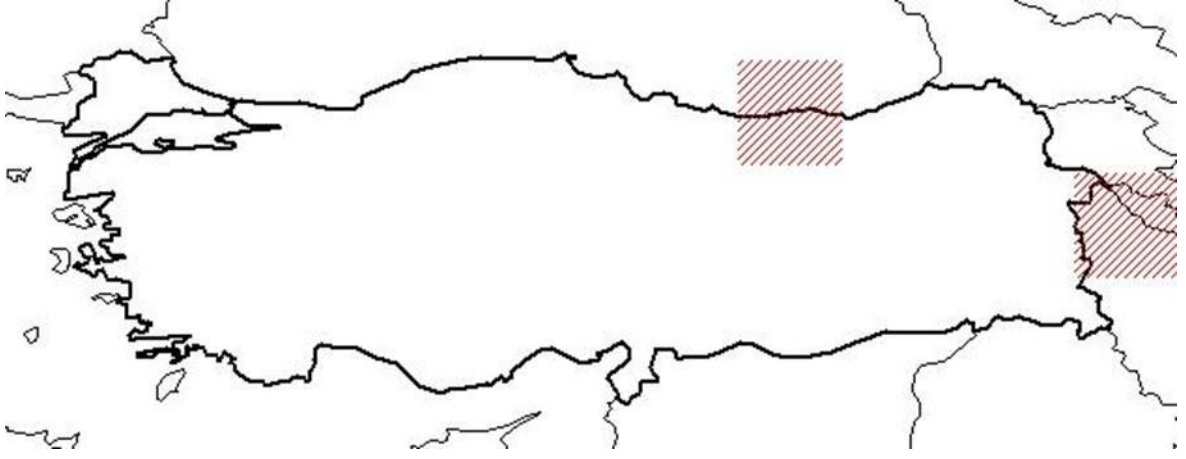
Tipus = [Gürcistan] Abchasia in Jugo Bzybico, Albow.

Türkiye’deki Yayılışı:

A7 Trabzon: Zigana dağı, Çakır Göl, 2600 m, 16.08.1993, (28)

A8 Trabzon: Çaykara, Soğanlı Dağı, Kemer civarları, 2200 m

A7 Trabzon: Zigana Dağı, 2300-2400 m



Şekil 5. *Alchemilla minusculiflora* türünün Türkiye’deki yayılışı (30)



Şekil 6. *Alchemilla minusculiflora*

2.2. *Alchemilla* Türleri Üzerinde Yapılan Kimyasal Çalışmalar

Yapılan literatür inceleme çalışmalarında *Alchemilla* türleri üzerinde yapılmış sekonder metabolit izolasyonu çalışmalarında yapısı aydınlatılan bileşikler Tablo 1’de listelenmiştir.

Tablo 1. *Alchemilla* türlerinden izole edilen bileşikler

Tür Adı	Kullanılan Kısım/Ekstre	İzole Edilen Bileşikler	Kaynak
<i>Alchemilla achtarowii</i> Pawl	Toprak üstü metanol ekstresi	Kersetin 3-O-glukozit (İzokersetin) Kersetin 3-O-glukuronik asit (mikuelianin) Kemferol 3-O-glukozit (astragalin) Kemferol 3-O-(6"-E-kumaroil-β-D-glukozit) (tilirosit)	[31]
<i>Alchemilla acutiloba</i> Opiz	Toprak üstü/ Toprak altı metanol Ekstresi	Gallik asit, Gentisik asit, Kemferol Astragalin, Nikotiflorin, Kersetin Rutin, Hiperozit, İzokersetin, Kafeik asit, Ferulik asit, Rosmarinik asit	[32]
<i>A. armeniaca</i>	Toprak üstü %80 metanol ekstresi	Apigenin 8-C-glukozit (viteksin) Kersetin 3-O-galaktozit (hiperozit) Luteolin 8-C-glukozit (orientin)	[33]
<i>A. barbatiflora</i>	Toprak üstü metanol ekstresi	Kemferol 3-O-(6"-E-kumaroil-β-D-glikozit)-(tilirozit), Prosiyanidin B3, Kateşin, Kersetin 3-O-glukuronik asit Kersetin 3-O-arabinosit Kojik asit	[34]
<i>A. bursensis</i>	Toprak üstü %80 metanol ekstresi	Kersetin 3-O-rutinozit (rutin) Kersetin 3-O-glukozit (isokersetin) Kersetin 3-O-galaktozit (hiperozit)	[33] [34]
<i>A. caucasica</i>	Toprak üstü metanol ekstresi	Apigenin, Kateşin, Kersetin 3-O-glukuronit	[14]
<i>A. cimilensis</i>	Toprak üstü %80 metanol ekstresi	Luteolin 8-C-glukozit (orientin) Kersetin 3-O-rutinozit (rutin) Kersetin 3-O-galaktozit (hiperozit) Kersetin 3-O-glukozit (izokersetin)	[33] [34]
<i>A. Erzincanensis</i>	Toprak üstü %80 metanol ekstresi	Kersetin 3-O-glukozit (izokersetin) Apigenin 8-C-glukozit (viteksin)	[33]
<i>Alchemilla glabra</i> Neygenf	Toprak üstü %80 metanol ekstresi	Rutin, Hiperozit, Kateşin, Gallik asit Epikateşin, Kafeik asit, Ellajik asit, 3,4 dihidroksibenzoik asit, Klorojenik asit, Kersetin 3-O-Glukuronik asit	[35] [36] [31]

Tablo 1.Devam

<i>A. hirtipedicellata</i>	Toprak üstü etanol ekstresi	Orietin, Viteksin	[12]
<i>A. ikizdereensis</i>	Toprak üstü %80 metanol ekstresi	Viteksin, Orientin, Rutin	[33]
<i>A. mollis</i>	Toprak üstü etanol ekstresi	Cis- ve Tans- Tiliroside, Rodiolgin, Hiperozit, İzokersetin, Mikuelianin, Sinokrassosit D2, Gossipetin-3-O- β -D galaktopiranozil- 7-O- α -L-ramnopiranozit	[31] [12] [13]
<i>A. orduensis</i>	Yapraklarının %80 metanol ekstresi	İzokersetin, Kersetin, Viteksin Orientin, Hiperozit	[33]
<i>A. persica</i>	Toprak üstü metanol ekstresi	Ellajik asit, Pedunkulagin, Kasuariktin, Kateşin, Epikateşin, Prosiyanidin, Metil-gallat, Galloyi-HHDP heksoz	[37] [22] [38]
<i>A. speciosa</i>	Toprak üstü metanol ekstresi	Astragalin, Kemferol glukopiranozit, Uronik asit, Kersetin-Mikuelanin, Kersetin-Hiperozit, Sinarozit, Skolimosit	[12] [4]
<i>Alchemilla viridiflora</i> Rothm	Toprak üstü metanol ekstresi	Pedunkulagin, Sanguin H-10 izomeri, Agrimoniin, Galloil-HHDP heksoz, Pentagalloiglukoz	[40] [39]
<i>A. vulgaris</i>	Toprak üstü etanol ekstresi	Kersetin-3-O-arabinozit-7-O-glukuronit, İzokersitrin, Guajverin, Avikülerin, Rutin, Kemferol, Mikuelianin, Hiperozit, Brevifolin, Gallik asit, Rutin, Agrimonin, Arjungenin, Morin, Ellajik asit	[41] [42] [4]

2.3. *Alchemilla* Türleri Üzerinde Yapılan Farmakolojik Çalışmalar

2.3.1. Geleneksel Kullanım

Alchemilla bitkisi Alman botanikçiler tarafından "Kadın Mantosu (Ladys' Mantle)" ismiyle adlandırılmıştır çünkü eski zamanlarda bitkinin yapraklarının şekli rahibelerin giysilerinin yakalarına benzetilmiştir. Fransızlar ise bitkinin yaprakları aslan pençesi şeklinde yarıklı bir yapıya sahip olduğu için bitkiye "Pied de lion" adını vermişlerdir (4).

Anadolu'da "Yıldız nişanı" veya "Fındık otu" olarak bilinen *A. pseudocartalinica* bitkisinin yaprakları ile "Aslan ayağı" olarak bilinen *A. arvensis* (L.) Scop. bitkisinin kök ve yaprakları kabız etkili, kuvvet verici ve idrar artırıcı olarak kullanılmaktadır (32). *A. vulgaris* bitkisinin toprak üstü kısımları, Avrupa'nın birçok bölgesinde yetişir ve halk arasında çeşitli amaçlarla kullanılmaktadır. Bu bitkinin en yaygın bilinen kullanım alanı jinekolojik rahatsızlıkların tedavisidir. Bitki özellikle menoraji, dismenore ve adet ağrısı gibi sorunların tedavisinde kullanılır. Ayrıca, *A. vulgaris*'in diüretik, astrenjan, antispazmodik ve yara iyileştirici özellikleri olduğu bilinmektedir. Bunların yanı sıra, konvulsif hastalıkların tedavisinde ve aşırı menstürasyonda kür olarak da kullanıldığı belirtilmektedir. Özetle, bu bitki geleneksel tıpta geniş bir kullanım yelpazesine sahiptir (17). Bu çalışmaya konu olan *A. minusculiflora* türü, Avrupa- Sibiry elementleri bir bitkidir ve ülkemizde çiçek ve yapraklarından çeşitli yemekler yapılmaktadır (10), ayrıca bitkinin yaprak ve çiçeklerinden de hazırlanan infüzyonunun çıban tedavisinde kullanımı olduğu bilinmektedir (11).

ESCOP monografında, *A. vulgaris*'in toprak üstü kısımlarının genital bölge kaşıntıları, uterus kanaması ve adet ağrıların tedavisinde etkin madde olarak kullanılması önerilmiştir (8). Uluslararası birincil sağlık hizmetleri sınıflandırmasında (International Classification of Primary Care - 2 (ICPC-2)) tanımlanan hastalık kategorilerine göre çeşitli *Alchemilla* türlerinin endikasyonları tanımlanmıştır. Kadın genital organları hastalıklarının tedavisinde (*A. vulgaris*, *A. mollis*, *A. hirsutiflora* ve *A. cryptantha*), cilt hastalığı tedavisinde (*A. vulgaris*, *A. mollis* ve *A. hessii*) veya sindirim hastalıklarının tedavisinde (*A. vulgaris*, *A. pedata*, *A. mollis*, *A. xanthochlora*, ve *A. alpina*) kullanımı üzere tanımlama yapılmıştır (43).

2.3.2. Antioksidan Aktivite

Alchemilla türlerinden elde edilen preparatların geniş bir polifenol spektrumu (flavonoidler, tanenler, fenolik asitler) içermesi nedeniyle, yapılan çok sayıda araştırmada antioksidan olarak kullanılabileceği bildirilmiştir. Çoğu kaynak, DPPH (2,2-Difenil-1-Pikrilhidrazil) ve ABTS (2,2-azino-bis-(3-etil- benzotiazol-6-sulfonik asit)) testlerini kullanarak *A. vulgaris*, *A. mollis*, *A. persica* ve *A. alpina* ekstreleri ve bu ekstrelerin fraksiyonları ile antioksidan bir etkiden bahsedilmiştir (44).

Yapılan bir çalışmada *A. mollis* bitkisinin yaprak ve kök ekstrelerinin antioksidan kapasiteleri araştırılmıştır. Yaprak ekstrelerinin ABTS radikal süpürme aktivitesi ölçülmüş ve düşük bulunmuştur (3.08 ± 6.74 mmol/l E vitamini analogu). Kök ekstreleri arasında ise etanol (2.45 ± 0.003 mmol/l Trolox) ve bütanol (2.35 ± 0.02 mmol/l Trolox) ekstrelerinin en yüksek antioksidan aktiviteye sahip olduğu tespit edilmiştir. Bu aktiviteler, E vitamini ve Trolox eşdeğerleri kullanılarak ölçülmüştür. Sonuçlar, *A. mollis*'in farklı kısımlarının farklı antioksidan potansiyellere sahip olduğunu göstermiştir (4). Başka bir çalışmada; *A. mollis* toprak üstü kısımlarının, serbest radikalleri temizleyici aktivitesini incelemek üzere metanollü ekstresi ve bu ekstreten elde edilen alt ekstrelerin DPPH antioksidan aktivitesi ölçülmüştür. Ölçümlerin sonucunda metanol ekstresinden elde edilen etil asetat alt ekstresinin en aktif radikal temizleyici olduğu tespit edilmiştir ($IC_{50} 9.8 \pm 1.8$ µg/mL) (31).

A. acutiloba bitkisinin toprak üstü ve toprak altı kısımlarından elde edilen çeşitli ekstrelerin antioksidan aktivitelerini belirlemek için DPPH ve ABTS yöntemleri kullanılmış ve tüm testler 96 kuyulu mikro plakalar kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Radikal süpürücü aktivitenin konsantrasyona bağlı olduğu belirlenmiştir. 50 µg/ml'lik bir dozda yapılan testlerde, *A. acutiloba*'nın toprak üstü ekstresinin DPPH radikal temizleme kapasitesi etil asetat (% 94.85 ± 0.30) ve bütanol (% 87.31 ± 0.17) fraksiyonları için en yüksek değerleri göstermiştir. ABTS analizinde ise AH-B (4-hidroksibenzoik asit) içeriği en yüksek (% 80.56 ± 0.17) antioksidan etki göstermiştir. Çalışma kapsamında pozitif kontrol olarak L-askorbik asit, Trolox (E vitamini analogu) ve etilendiamintetraasetik asit disodyum tuzu dihidrat ($Na_2EDTA \cdot 2H_2O$) kullanılmıştır (32).

A. vulgaris bitkisinin toprak üstü kısımlarının etanol ekstresinin antioksidan kapasitesi DPPH, ferrik indirgeyici antioksidan etki, bakır indükleme yöntemi ve total antioksidan kapasitesi yöntemleri kullanılarak test edilmiştir. Yapılan analiz sonucunda ekstrelerin fenolik asit, flavonoid ve tanen bileşiklerini içeren kısımları yüksek antioksidan

kapasitesine sahip olduğu tespit edilmiştir (41).

2.3.3. Antiinflatuar Aktivite

İnflamasyon çeşitli hastalıkların oluşumunda önemli bir rol oynar ve eski zamanlardan beri bitkiler veya bitkisel kaynaklı ürünlerle birlikte tedavi edilmeye çalışılmıştır (45). Üç *Alchemilla* türünün (*A. vulgaris*, *A. persica* ve *A. mollis*) antiinflatuar aktivitelerini test etmek amacıyla yapılan bir çalışmada; önceki 14 gün boyunca herhangi bir antiinflatuar veya steroid ilaç almamış sağlıklı bireylerden kırmızı kan hücresi (HRBC) toplanmıştır. Bitkilerin antiinflatuar aktivitesi, HRBC membranının ısı kaynaklı hemolizine karşı stabilizasyon kapasitesinin ölçülmesiyle belirlenmiştir. *A. mollis* toprak üstü kısımdan hazırlanan %80 metanol ekstresi HRBC membran stabilize edici etki gösterirken (IC_{50} 1.22 ± 0.07 mg/mL), *A. persica* kök ekstresi en düşük aktiviteyi (IC_{50} 1.82 ± 0.14 mg/mL) göstermiştir. Ekstreler (*A. mollis* ve *A. persica*, %80 metanol), standart olarak kullanılan asetilsalisilik aside kıyasla HRBC membranlarını hemolize karşı önemli ölçüde koruduğu raporlanmıştır. Ayrıca, çalışmada etkiden sorumlu olabilecek moleküllerin izolasyonu yapılmış ve *A. mollis*'ten ellajik asit ve mikuelianin izole edilmiştir. Mikuelianin molekülünün, *A. mollis* (IC_{50} 1.23 ± 0.02 mg/mL) ekstresine benzer aktiviteye sahip olduğu, ellajik asidin ise çok daha etkili bir antiinflatuar ajan olduğu (IC_{50} 0.57 ± 0.01 mg/mL) rapor edilmiştir (9).

A. vulgaris su ve %70 etanol ekstreleri üzerinde yapılan bir çalışmada, bitki su ekstresinin varlığında soya fasulyesinden elde edilen 15-lipoksijenaz enzim aktivitesinin inhibisyonu ölçülmüştür. Sonuçlar, ekstrenin araşidonik asit metabolitlerinin dönüşümünü yüksek oranda inhibe edici aktivitesi olduğu ve IC_{50} değeri (0.52 mg/mL) tespit edilmiştir (46). Ayrıca, % 70 etanol ile hazırlanan *A. vulgaris* ekstresi, LPS kaynaklı IL-8 salınımını azalttığı ve TLR2 ve TLR4 sinyal yollarının uyarılmasını engellediği; öte yandan, bu ekstrenin NF- κ B p65 translokasyonuna karşı etkili olmadığı bulunmuştur (47).

2.3.4. Antimikrobiyal Aktivite

İlaç dirençli patojenlerin artan sayısı, patojenik bakterilerle mücadele için alternatifler sağlayabilen bitki kaynaklı terapötikleri belirlemeye yönelik bir ihtiyaç oluşturmaktadır (48).

Yapılan bir çalışmada *A. mollis* bitkisinin farklı çözücülerde hazırlanmış olan ekstralarının antimikrobiyal etkileri üzerinde durulmuştur. Bu çalışmada ekstralarının *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) ve *Klebsiella pneumoniae* (klinik suş) mikroorganizmalarına karşı farklı konsantrasyonlarda antimikrobiyal aktivite gösterdiği gözlenmiştir, ancak aynı ekstraların *Candida albicans* (ATCC 90028)'a karşı herhangi bir inhibisyon zonu oluşturmadığı tespit edilmiştir (13).

A.vulgaris kök metanol ekstresinin bileşenlerinin kantitatif analizi yüksek salisilik ve ellajik asit içeriğinin yanı sıra kersetin ve kateşin içerdiğini göstermiştir. Tespit edilen bileşiklerin sinerjik etkisinin *Alchemilla* bitkilerinin antibakteriyel aktivitesinde önemli bir rol oynayabileceği vurgulanmıştır (49).

A. vulgaris yapraklarının etanollü ekstresi gram pozitif bakteriler olan *S. aureus* ve *Staphylococcus epidermidis*' in üzerinde, disk difüzyon yöntemi kullanılarak 10 mg/mL konsantrasyonlarda antimikrobiyal aktivite açısından incelenmiştir. Bunun sonucunda tıbbi bitkilerin mikroorganizmaların büyümesini sınırlamak için gerekli olan çok sayıda fitokimyasal bileşen içerdiği belirlenmiştir. Bu araştırma, bu bitkilerin yaprak ekstralarının *S. aureus*, *S. epidermidis*, *E. coli*, *K.pneumoniae*, *P. aeruginosa* ve *C. albicans*'ın her birine karşı iyi düzeyde aktiviteye sahip olduğu sonucuna varmıştır (50).

2.3.5. Yara İyileştirici Aktivite

A. vulgaris'in yara iyileşmesindeki rolü önemli olup, hücre çoğalması üzerinde büyük bir etkiye sahip olduğu ve yaraların kapanmasında kritik bir rol oynadığı bilinmektedir. *Alchemilla* türleri, yüksek tanen içeriği sayesinde yara iyileştirici özelliklere sahiptir ve bu nedenle halk arasında geleneksel olarak uzun yıllardır kullanılmaktadır. *A. vulgaris* toprak üstü ekstresi yara iyileştirici etkisi L929 fibroblast hücreleri kullanılarak *in vitro* çizik analizinde araştırılmıştır. Ekstrede fenolik maddeler, flavonoid ve tanen içeriği tespit edilmiştir. Yüksek fenolik madde olması antioksidan aktiviteye sahip oluşunun yanında ayrıca fibroblast göçünü sağlaması ve yüksek oranda açık yara kapanmasını sağladığı tespit edilmiştir. İçeriğindeki ellagallik asit sayesinde kolajen üretimini artırdığını ve yara iyileşmesini hızlandırdığı tespit edildi. Ekstre içinde bulunan diğer bir madde kersetin-3-O- β glukuronit'in ise kollajen sentezini uyardığı ve doksisiklin etkin maddesinden daha etkin olduğu tespit edilmiş bu sayede yara ve yanık iyileşmesinin yanı sıra dermatit, akne ve foto yaşlanma gibi deri hastalıklarının tedavisinde kullanılabileceği

tespit edilmiştir (17).

% 2 lik *A. vulgaris* sulu veya etanolik veya % 6 lık propilen glikolik ekstresi içeren jellerin, topikal uygulamasının L929 fibroblastlarla “çizik” testinde yara kapanmasını hızlandırdığı, aynı zamanda hasarlı cilt bariyerini de desteklediği tespit edilmiştir. *A. vulgaris*'in antioksidan özellikleri, fenolik asitce zengin ekstraler ile jellerin tatmin edici uygulama ve yapışkan özellikleri, doğal nemlendirme özellikleri ve düşük pH'ı muhtemelen araştırılan jellerin genel yara iyileştirme potansiyelini göstermiştir (42).

A. vulgaris'in *in vitro* ortamda "Chang" karaciğer hücreleri, "MDBK" epitel hücreleri ve farelerin aortik miyofibroblast hücrelerinde çoğalmayı artırdığı tespit edilmiştir. Ayrıca *in vivo* olarak erkek sıçanlar üzerinde yapılan çalışmalarda, gliserin ile uygulandığında yara iyileşmesini önemli ölçüde hızlandırdığı gözlemlenmiştir. Bu bulgular, *A. vulgaris*'in yara iyileştirici potansiyelini ve mekanizmalarını anlamak açısından oldukça önemlidir (51).

Yapılan bir çalışmada, tanence zengin bitkilerin kronik yara iyileştirici özellikleri araştırılmış ve 128 bitki incelenmiştir. Bu araştırma sonucunda, *A. vulgaris* ve *Mimosa tenuiflora* (Wild.) Poir. bitkilerinin farklı konsantrasyonlarda yara iyileşmesini hızlandıran epitelium ve fibroblast hücrelerinin çoğalmasında olumlu yönde etkilediği tespit edilmiştir. Bu bulgular, söz konusu bitkilerin yara iyileşme süreçlerinde potansiyel terapötik rollerini ortaya koymaktadır (13).

4-44 yaş aralığındaki 48 sağlıklı erkek ve kadın hastada yaygın minör oral ülser yaraları üzerinde *A. vulgaris* bitkisinin gliserin içindeki standart % 3'lük ekstresinin (Aphtarine®) olası iyileştirici özelliklerini ve tolere edilebilirliğini belirlemek için bir çalışma yürütülmüştür. Aphtarine, *A. vulgaris*'in standart hidrogliserinlenmiş özütü kullanılarak GMP gerekliliklerine uygun olarak üretilen bir üründür. Aphtarine®' in içeriği HPLC ile belirlendiği üzere % 0.08 tanenden oluşmaktadır. Bunların % 3.8'i ellajik asit, % 0.02'si kersetin ve % 0.0002'si luteolin olarak tespit edilmiştir. Üretici firma tarafından hazırlanan Aphtarine® isimli jelin ağızda oluşan küçük ülserlere günde üç defa topikal uygulanmasıyla rahatsızlığı giderdiği görülmüştür ve hastaların % 60.4'ünde 2 gün içinde ve % 75'inde 3 gün içinde tam iyileşme sağlandığı rapor edilmiştir (52).

A. mollis ve *A. persica*'nın toprak üstü kısımlarından hazırlanan sulu metanol ekstraleleri, yara modelleri kullanılarak yara iyileştirme aktivitesi açısından değerlendirilmiştir. Farelere 0.05 mL ksilazin (% 2 Alfazine®) ve 0.15 mL ketamin (% 10

Ketasol®) ile anestezi uygulanmış ve farelerin arka gövde kılları tıraş edilip % 70 alkol ile temizlenmiştir. Her iki tarafta dorsal orta hattın 1.5 cm uzaklıkta steril bir bıçakla 5 cm uzunluğunda iki adet lineer-paravertebral kesi oluşturulmuştur. Her biri 1 cm aralıklarla üç cerrahi dikiş atılmıştır. Test merhemleri, referans ilaç (Madecassol®) ve merhem bazı 9 gün boyunca her hayvan grubundaki sırt yaralarına günde bir kez topikal olarak uygulanmıştır. Son gün tüm dikişler alınmıştır. Tedavi edilen derinin gerilme mukavemeti bir tansiyometre kullanılarak ölçülmüştür. *A. mollis* ve *A. persica*'nın toprak üstü ekstreleri kesi yarası modelinde sırasıyla % 39.3 ve % 33.3 çekme mukavemeti değerleri ve eksizyon yarası modelinde sırasıyla % 51.4 ve % 43.5 büzülme değerleri ile önemli derecede yara iyileştirme aktivitesi göstermiştir (22).

A. mollis ekstrelerinin veya preparatlarının yara iyileştirici özelliklerinin yanında *A. mollis*'in etanol-su ekstresinin anti-aging aktivitesi test edilmiştir. Bu çalışmada on altı tüysüz fareye güneş lambalarıyla UVB ışını uygulanmıştır. İlk hafta, haftada yedi kez 100 mJ/cm² ve sonraki dokuz hafta boyunca haftada iki kez 200 mJ/cm² şeklinde maruziyet uygulanmıştır. Deney fare gruplarından biri % 0.1 *A. mollis* ekstresi içeren bir diyetle beslenirken, ikinci grup % 1 *A. mollis* ekstresi içeren bir diyetle beslenmiştir. Tedavi edilen gruplarda fare derilerinin kontrol grubuna göre daha pürüzsüz ve daha ince olduğu ve etkinin doza bağlı olduğu bulunmuştur. Ayrıca *A. mollis* ekstresi uygulanan grupta kolajen liflerinin yoğunluğu önemli ölçüde daha yüksek olarak belirlenmiştir (53).

2.3.6. Enzim İnhibisyonu Aktivitesi

Yapılan bir araştırmada *A. vulgaris* bitkisinden çeşitli polaritelerde ekstreler hazırlanmış, % 70 etanol ekstresi en yüksek antiasetilkolinesteraz potansiyeline sahip ve % 80 metanol ekstresi en güçlü bütirilkolinesteraz inhibisyonu göstermiştir. Amilaz inhibitörleri olarak görev yapan ekstrelerin aktiviteleri en yüksekten en düşüğe şu şekilde sıralanmıştır: Su > % 70 etanol > % 80 metanol > etil asetat. En yüksek gallik asit, kafeik asit, kateşin ve kersetin içeriğine sahip ekstrelerin aynı zamanda en yüksek aktiviteyi gösterdiği tespit edilmiştir (54). Ayrıca, *Alchemilla* bitki ekstrelerinin, tirozinaz aktivitesini inhibe etmeleri nedeniyle kozmesötik araştırmalar için önem arz ettiği vurgulanmaktadır. Mevcut araştırmalar şunu belirtmektedir: *A. vulgaris*'in % 70 etanol ekstresinin güçlü aktivitesi ve 3 mg/mL'de tirozinazın % 71.55 ± 4.39 inhibisyonu *A. vulgaris*'in su-metanollü ekstresinin biyoanaliz kılavuzluğunda fraksiyonlanması, kolajenaz inhibitör aktivitesine sahip flavonoidlerin tanımlanmasına ve izolasyonu sağlanmıştır (55).

2.3.7. Kardiyovasküler Aktivite

A. vulgaris bitkisinin metanol ve su ekstralarının kan basıncını düşürücü etkisinin test edilebilmesi için tasarlanan çalışmada; 5 hafta boyunca ilgili ekstraların her birinden 300 mg/kg/gün dozunda olacak şekilde fareler beslenmiştir. İşlemlerin sonunda farelerin kan basıncı ölçülmüştür. Metanol ekstresinin uygulanmasından sonra kan basıncı 119.60 mmHg, su ekstresinin uygulanmasından sonra kan basıncı 138.50 mmHg ve kontrol grubu 156.50 mmHg olarak ölçülmüştür. Ek olarak, her iki ekstrede de gevşemeler gözlemlenirken, ekstralar K^+ ile önceden kasılmış arterlere uygulandığında ise zıt vasküler etki fark edilmiştir (56). Farelere 10 gün boyunca 300/mg/kg/gün dozda uygulanan ekstre, lipid içeriğini arttırmış ve eritrosit membranlarının fosfolipit kompozisyonunu normalleştirmiştir ve bu geri dönülemez şekilde değiştirilmiş eritrosit seviyelerinde azalmaya ve eritrosit deforme edilebilirliğinde bir iyileşmeye yardımcı olmuştur (57).

2.3.8. Sitotoksik Aktivite

A. vulgaris toprak üstü kısmının ekstralarının (metanol, etanol, etilasetat) sitotoksik etkileri insan göğsü MCF7 ve geleneksel kemoterapötik dirençli istilacı kanser hatları da dahil olmak üzere çeşitli kanser hücre hatları üzerinde test edilmiştir. Etilasetat ekstresinin içeriğinde olduğu belirlenen kafeik asit ve gallik asidin çok çeşitli tümör tiplerinde güçlü antiproliferatif ve sitotoksik özelliklere sahip olduğu tespit edilmiştir. Bu fenolik asitlerin hücre döngüsünün ilerlemesi ve hücre ölümüyle ilgili ana sinyal yollarına müdahale, daha sonra da epitelial/mezenkimal migratif özelliklere müdahale gibi çeşitli mekanizmalar yoluyla olduğu belirtilmiştir (17).

Yapılan bir araştırmada 347 farklı bitki ekstresinin nöroblastoma hücreleri üzerindeki sitotoksik etkileri değerlendirilmiştir. *A. vulgaris* bitkisinin de orta derecede sitotoksik aktivite gösterdiği tespit edilmiştir (58).

Yapılan bir çalışmada *Alchemilla* türlerinden hazırlanan bitki ekstralarının HeLa hücreleri üzerindeki etkileri incelenmiştir. Doza bağlı sitotoksiste ve ekstraların apoptotik ve nekrotik etkileri olduğu da kaydedilmiştir. Özellikle *A. trabzonica* türünün diğer türlerden (*A. erythropoda*, *A. ikizdereensis*, *A. oriturcica*) daha yüksek toksik, apoptotik ve nekrotik etki gösterdiği vurgulanmıştır. Bu çalışmanın sonucunda, *Alchemilla* türlerinin gelecekte kanser çalışmalarında önemli bir yere sahip olabileceği saptanmıştır (34).

A. vulgaris toprak üstü etanol ekstresi antitümör kapasitesi MCF-7, A375, A549 ve HCT116 hücre hatları üzerinde test edilmiştir. Bu hücre hatları üzerinde güçlü süpresyon tespit edilmiştir. Süpresyon etkinin hücre bölünmesini bloke etmesi, kaspas bağımlı apoptoz ve otofajik hücre ölümü yolları üzerinden olduğu tespit edilmiştir (41).



3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. Gereç

3.1.1. Kullanılan Cihazlar

Kullanılan cihazlar Tablo 2’de verilmiştir.

Tablo 2. Kullanılan cihazlar ve markaları

Cihazın Adı	Marka
Buzdolabı (+4 °C)	Arçelik
Derin dondurucu (-20 °C)	Arçelik
Hassas analitik terazi	Ohaus
Manyetik karıştırıcı	Heidolph MR
UV-Vis Spektrofotometre	Thermo Scientific Multiskan Go
Orbital çalkalayıcı	Bio-Rad UltraRocker™ Rocking platform
Otomatik pipetler	Socorex
pH metre	Ohaus
Rotary evaporatör	Heidolph
Su banyolu çalkalayıcı	Memmert
Soğutmalı santrifüj	Sigma
Elektroforez güç kaynağı	Bio-Rad
Görüntüleme sistemi	Bio-Rad
Vorteks	Wisd

3.1.2. Kimyasal Maddeler ve Ekipmanlar

Kullanılan kimyasal maddeler ve ekipmanlar Tablo 3’de verilmiştir.

Tablo 3. Kullanılan kimyasallar, marka ve kodları

Kimyasal Adı	Marka/ Kodu
Alüminyum klorür (AlCl_3)	Fluka/ 06220
Amonyum asetat ($\text{NH}_4\text{CH}_3\text{CO}_2$)	Isolab/ 903.026.1000
2,2-difenil-1-pikril hidrazil (DPPH)	Sigma Aldrich/ D9132
Elastaz	Sigma Aldrich/E1250
Epigallokateşin gallat	Sigma Aldrich/E4143
N-(3-[2-Furil]akriloil)-Leu-Gly-Pro-Ala (FALGPA)	Sigma Aldrich/EF5135
Folin-Ciocalteu fenol reaktifi	Sigma Aldrich/ F9252
Gallik asit	Sigma Aldrich/ G7384
Kollajenaz	Sigma Aldrich/ C9891
96 Kuyulu plaka	Nest/ 701001
Metanol	Isolab/ 947.046.2500
N-Süksinil-Ala-Ala-Ala-nitroanilit (AAPVN)	Sigma Aldrich/ S4760
Siklooksijenaz yöntem kiti	Cayman Chemical 701050
Trisma baz	Sigma Aldrich/ 93362

3.1.3. Kullanılan Çözeltiler

5 mL 2 N Folin-Ciocalteu fenol reaktif çözeltisi deiyonize suyla hacmi 20 mL’ye tamamlanarak 0.5 N Folin reaktifi çözeltisi hazırlanmıştır.

5 mg gallik asit, 500 μL metanolde çözülerek 10 mg/mL konsantrasyonda gallik asit çözeltisi hazırlanmıştır.

% 10’luk Na_2CO_3 çözeltisinin hazırlanması için; 5 g Na_2CO_3 , 25 mL deiyonize suda çözülüp hacmi 50 mL’ye tamamlanmıştır.

10 mg kersetin, 1000 μL metanolde çözülerek 10 mg/mL konsantrasyonda stok çözelti hazırlanmıştır.

1 M amonyum asetat çözeltisinin hazırlanması için 1.5416 g amonyum asetat, 20 mL deiyonize suda çözülmüştür.

0.2 mM DPPH çözeltisi için 6.4 mg DPPH 81.152 µL metanolde çözülmüştür.

0.22 U/mL elastaz çözeltisinin hazırlanması için 0.26 mg elastaz enzimi tartılıp 50 mM pH=8 Tris-HCl tamponu ile 1 mL'ye tamamlanmıştır.

10 mg/mL epigallokateşin gallat stok çözeltisi için 10 mg epigallokateşin gallat tartılıp metanol ile 1 mL'ye tamamlanmıştır. Trisin tamponunun hazırlanması için; 2.24 gram trisin tartılıp 250 mL distile suda çözülür, ardından 111 mg CaCl₂ tartılır ve 100 mL distile suda çözülür, son olarak 2.34 g NaCl tartılır 100 mL'de çözülür. Ardından 100 mL trisin, 10 mL CaCl₂ ve 90 mL NaCl karıştırılıp seyreltik NaOH ile pH 7.5'e ayarlanmıştır.

Kollajenaz enziminin deneye uygulanabilir hale getirilmesi için 1.8 mg kollajenaz enzimi tartılır ve 40 mL trisin tamponunda çözülerek 5.6 U/mL stok enzim çözeltisi hazırlanır. Stoktan 3.571 mL alındıktan sonra 16.428 mL trisin tamponuyla seyreltilerek 1.1 U/mL'ye seyreltilmiştir.

FALPGA substratının hazırlanmasında 1.2 mg FALPGA tartılır 2.5 mL trisin tamponuyla çözülmüştür.

3.2. Yöntem

3.2.1. Bitki Materyalleri

A. daghestanica ve *A. minusculiflora* bitkileri çiçekli durumda iken kök ve toprak üstü kısımları 28 Mayıs 2022 tarihinde Dr. Öğr. Üyesi Nurdan Yazıcı Bektaş tarafından Trabzon, Çaykara, Sultan Murat Yaylası'ndan toplanmıştır.

Bitki türlerinin tayini İstanbul Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Botanik Anabilim Dalı öğretim üyesi Doç. Dr. Yeter Yeşil Cantürk tarafından yapılmıştır.

A. daghestanica bitkisine ait bir örnek ISTE 118080 kodu ile, *A. minusculiflora* bitkisine ait bir örnek de ISTE 118078 kodu ile İstanbul Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Herbaryumu (ISTE)'nda saklanmaktadır.

Toplanan materyaller açık havada, gölgede ve serin ortamda kurutulmuş ve hava almayacak şekilde ambalajlanarak saklanmıştır.

3.2.2. Ekstraksiyon İşlemleri

Bitkiler kök ve toprak üstü kısımlarına ayrılmış, bitki değirmeninde toz edilmiş ve tartılmıştır. Her bir kısım metanol:su (80:20) ile 24 °C de 8 saat masere edilmiştir.

8 saat sonunda bakiye süzölmüştür ve işlem 3 kez tekrarlanmıştır. Süzöntöler birleştirilmiştir. Metanol ortamdan rotary evaporatör kullanılarak uzaklaştırılmış ve ardından sulu bakiye liyofilizatöre koyularak ekstre tamamen kurutulmuştur. (17)

İşlem sonunda; *A. daghestanica* kök (**Alda kök**), *A. daghestanica* toprak üstü (**Alda herba**), *A. minusculiflora* kök (**Almin kök**), *A. minusculiflora* toprak üstü (**Almin herba**) kuru ekstreleri hazırlanmıştır ve tasarlanan çalışmalarda yapılacak işlemler için kullanılmak üzere +4 °C’de saklanmıştır.

Bitki ekstreleri üzerinde yapılan biyolojik aktivite çalışmaları Karadeniz Teknik Üniversitesi Eczacılık Fakölte Biyokimya Anabilim Dalı Laboratuvarlarında Doç. Dr. Burak Barut’un destekleri ile gerçekleştirilmiştir.

3.2.3. Toplam Fenolik ve Flavonoit Madde Miktarı Tayini

Bitki ekstrelerinin toplam fenolik ve flavonoit madde miktarı tayini spektrofotometrik yöntem kullanılarak tespit edilmiştir.

3.2.3.1. Toplam Fenolik Madde Miktarı Tayini

Ekstrelerin toplam fenolik madde miktarı tayini Folin-Coicalteu reaktifi kullanılarak spektrofotometrik olarak incelenmiştir (59). Çalışmada üçer tekrar olacak şekilde 5 mg/mL konsantrasyondaki ekstrelerden 20 µL alınarak deney tüplerine eklenmiştir. Standart fenolik bileşik olarak gallik asit kullanılmıştır. Deney tüplerine farklı konsantrasyonlarda gallik asit eklenmiştir. Her bir tüpe 400 µL 0.5 N Folin-Coicalteu reaktifi, 680 µL deiyonize su ve 400 µL %10’luk Na₂CO₃ eklenip karıştırılmıştır. Elde edilen karışımlar 120 dakika karanlıkta bekletildikten sonra 96 kuyucuklu plakaya aktarılmıştır. Spektrofotometre cihazıyla 760 nm’de metanolden oluşan köre karşı absorbansları ölçölmüştür. Ekstrelerin toplam fenolik madde miktarı gallik asit kalibrasyon eğrisinden yararlanılarak mg gallik asit eşdeğeri (GAE)/ekstrenin gram kuru ağırlığı olarak verilmiştir.

3.2.3.2. Toplam Flavonoit Madde Miktarı Tayini

Ekstrelerin toplam flavonoit madde miktarı tayini alüminyum nitrat kolorimetrik yöntemi kullanılarak incelenmiştir. Çalışmada üçer tekrar olacak şekilde 2.5 mg/mL konsantrasyondaki ekstrelerden 250 µL alınarak deney tüplerine eklenmiştir. Standart bileşik olarak kersetin kullanılmıştır. Deney tüplerine farklı konsantrasyonlarda kersetin eklenmiştir. Daha sonra her deney tüpüne sırasıyla 25 µL % 10’luk AlCl₃, 25 µL 1M

NH₄CH₃CO₂ ve 700 µL deiyonize su eklenmiştir. Karışımlar 30 dakika karanlıkta inkübasyona bırakıldıktan sonra 96 kuyucuklu plakaya aktarılmış ve 415 nm’de etanolden oluşan köre karşı absorbansları spektrofotometrik olarak ölçülmüştür. Ekstrelerin toplam flavonoit madde miktarı mg kersetin eşdeğeri (KE)/ekstrenin gram kuru ağırlığı olarak verilmiştir (59).

3.2.4. Antioksidan Aktivitenin İncelenmesi

3.2.4.1. DPPH Radikal Süpürme Aktivitesinin Belirlenmesi

Ekstrelerin DPPH radikal süpürme etkinliği spektrofotometrik yöntem kullanılarak incelenmiştir. DPPH radikal süpürme etkinliğinin saptanmasında pozitif standart bileşik olarak gallik asit kullanılmıştır. Ekstreler farklı konsantrasyonlarda (20-200 µg/mL) hazırlanarak 96 kuyucuklu plakaya eklenmiştir. Her kuyucuğa 200 µL 0.2 mM DPPH çözeltisi eklenmiş ve 30 dakika karanlıkta inkübasyona bırakılmıştır. 517 nm’de absorbans değerleri spektrofotometrede ölçülmüştür (A₁). Kör olarak da metanolde hazırlanmış 0.2 mM DPPH çözeltisinin 517 nm’deki absorbans değerleri ölçülmüştür (A₀). DPPH radikallerinin inhibisyonu farklı konsantrasyonlar için aşağıda verilen “Eşitlik 1” denklemi ile hesaplanmıştır. Her bir deney üç günde üç tekrarlı olarak gerçekleştirilmiştir ve değerlerin standart sapması da hesaplanmıştır.

$$\%İnhibisyon = \frac{A_0 - A_1}{A_0} \times 100 \text{ (Eşitlik 1)}$$

A₀: Numunelerin ilavesi olmaksızın ölçülen absorbans; A₁: ekstrelerin ilavesi sonrasında ölçülen absorbans.

3.2.5. Enzim İnhibisyon Çalışmaları

3.2.5.1. COX 1/2 Enzim İnhibisyonu

Ekstrelerin COX 1/2 enzim inhibisyonu spektrofotometrik yöntem ile incelenmiştir (60). COX inhibitör etkinliği, ticari kolorimetrik tarama kitleri (COX Colorimetric Inhibitor Screening Assay Kit, Cayman Chemical 701050) kullanılarak incelenmiştir. Bunun için kit protokolünde bulunan basamaklar uygulanacaktır. Pozitif kontrol olarak diklofenak kullanılmıştır. Tüm deneyler üç tekrarlı gerçekleştirilmiştir. Sonuçlar Eşitlik 1 kullanılarak hesaplanmıştır.

3.2.5.2. Elastaz Enzim İnhibisyonu

Ekstrelerin elastaz inhibisyon etkinliği spektrofotometrik yöntem ile incelenmiştir (61). İlk olarak toplam hacim 200 µL olacak şekilde, Tris-HCl (pH 8.0) tamponu ortamında 1 µg/mL elastaz enzimi ve 25 µL ekstrelerin çeşitli konsantrasyonları (20-200 µg/mL) eklenmiş ve karışım 15 dakika inkübe edilmiştir. Bu süre sonunda substrat olarak 0.8 mM N-Süksinil-Ala-Ala-Ala-nitroanilit (AAPVN) ilave edildikten sonra karışım 20 dakika inkübasyona bırakılmıştır. Ardından karışımların absorbanları 402 nm’de ölçülmüştür. Pozitif kontrol olarak epigallokateşin gallat kullanılmıştır. Tüm deneyler üç tekrarlı gerçekleştirilmiştir. Sonuçlar Eşitlik 1 kullanılarak hesaplanmıştır.

3.2.5.3. Kollajenaz Enzim İnhibisyonu

Ekstrelerin kollajenaz inhibisyon etkinliği spektrofotometrik yöntem ile incelenmiştir (61). İlk olarak toplam hacim 200 µL olacak şekilde, trisin (pH 7.5) tamponu ortamında 1.1 U/mL kollajenaz enzimi ve 25 µL ekstrelerin çeşitli konsantrasyonları (20-200 µg/mL) eklenmiş ve karışım 15 dakika inkübe edilmiştir. Bu süre sonunda substrat olarak 1 mM N-[3-(2-Furil)akriloil]-Leu-Gly-Pro-Ala (FALPGA) ilave edildikten sonra karışım 15 dakika inkübasyona bırakılmıştır. Ardından karışımların absorbanları 340 nm’de ölçülmüştür. Pozitif kontrol olarak epigallokateşin gallat kullanılmıştır. Tüm deneyler üç tekrarlı gerçekleştirilmiştir. Sonuçlar Eşitlik 1 kullanılarak hesaplanmıştır.

3.2.5.4. İstatistiksel Analiz

Toplam fenolik madde miktarı, toplam flavanoid madde miktarı, antioksidan ve enzim inhibisyonu deneyleri üç tekrarlı gerçekleştirilip sonuçlar Microsoft Excel Windows10 ve GraphPad Prism 5.0 programları kullanılarak hesaplandı. Toplam fenolik ve flavanoid madde miktarı sonuçlarının istatistiksel analizleri için one way Tukey testi, antioksidan ve enzim inhibisyonları deneylerinde ise twoway ANOVA testi, gruplar arasındaki ilişkinin ortaya konulması içinde Bonferroni posttests analizleri kullanıldı.

3.2.5.5. LC-MS/MS Analizinin Gerçekleştirilmesi

Enzim inhibisyonu çalışmaları sonucunda iki bitki için de en yüksek etkinliğe sahip ekstre tespit edilmiştir ve sekonder metabolit profili LC-MS/MS cihazı kullanılarak incelenmiştir. Analiz çalışmaları Dicle Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Analitik Kimya Anabilim Dalı öğretim üyesi Doç. Dr. Mustafa Abdullah Yılmaz’ın destekleri ile

gerçekleştirilmiştir.

Analizleri gerçekleştirmek üzere Dicle Üniversitesi Bilim ve Teknoloji Uygulama ve Araştırma Merkezi'nde bulunan Shimadzu Neexera Ultra Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografi (UHPLC) cihazı ve Shimadzu LC-MS 8040 model ardışık kütle spektrometre cihazı kullanılmıştır.

Ters faz ultra yüksek performanslı sıvı kromatografisi için SIL-30AC model oto örnekleyici, CTO-10ASvp model kolon fırını (40 °C), LC-30AD model pompa, DGU-20A3R model degazer kullanılmıştır. Kromatografik ayırım için Agilent Poroshell 120 EC-C18 model (150 mm × 2,1 mm, 2.7 µm) analitik kolon kullanılmıştır. Gradient mobil faz için Çözücü A (su + 5 mM amonyum format + % 0,1 formik asit) ve Çözücü B (metanol + 5 mM amonyum format + % 0,1 formik asit) kullanılmış ve 0-25. dakikada % 20-100 Çözücü B, 25-35. dakikada % 100 Çözücü B, 35-45. dakikada % 20 Çözücü B kolondan 0,5 m/dk akış hızı ile geçirilmiştir. Numune kolona 5 µL hacim ile enjekte edilmiştir (62).

Standart olarak kullanılan 53 maddenin ve ekstrelerin kalitatif ve kantitatif kütle spektroskopik tayinlerinde Shimadzu LCMS-8040 model pozitif ve negatif iyonizasyon modları bulunan elektrospray iyonizasyon (ESI) kaynağı sıralı kütle spektroskopisi kullanılmıştır. LC-ESI-MS/MS verileri Shimadzu LabSolutions yazılımı ile işlenmiştir. Fitokimyasalların miktar tayini için MRM (multiple reaction monitoring, çoklu reaksiyon izleme) modu kullanılmıştır. MRM metot, belirlenen öncül fitokimyasal-fragment iyon geçişlerinin taranmasına dayalı olarak fitokimyasal bileşikleri seçici olarak tespit etmek ve miktarını belirlemek için optimize edilmiştir. Çarpışma enerjileri (CE), optimum fitokimyasal parçalanma ve istenen ürün iyonlarının maksimum iletimini sağlamak için optimize edilmiştir. MS çalışma koşulları şu şekilde uygulanmıştır: kurutma gazı (azot) akışı: 15 L/dk; nebulize edici gaz (azot) akışı: 3 L/dak; DL sıcaklığı: 250 °C; ısı bloğu sıcaklığı: 400 °C ve arayüz sıcaklığı: 350 °C (62).

4. BULGULAR

4.1. Ekstraksiyon Bulguları

13.2 g kurutulmuş *A. dagestanica* toprak üstü kısımlarından % 15 verim ile 1.98 g kuru ekstre (**Alda herba**), 18.75 g kuru kök drogundan % 12 verim ile 2.25 g kuru ekstre (**Alda kök**) elde edilmiştir.

A. minusculiflora türünün 1.1 g kurutulmuş toprak üstü kısımlarından % 20 verim ile 0.220 g (**Almin herba**) ve 4.22 g kurutulmuş kök drogundan % 22 verim ile 0.929 g kuru ekstre (**Almin kök**) elde edilmiştir.

4.2. Toplam Fenolik Madde Miktarı Tayini

Ekstrelerin toplam fenolik madde miktarı tayini spektrofotometrik yöntemler kullanılarak incelenmiştir. Sonuçlar Tablo 4’de gösterilmektedir. Almin kök toplam fenolik madde miktarı 188.30 ± 2.68 mg GAE/g kuru ağırlık bulunurken, alda kök ise 144.32 ± 7.46 mg GAE/g kuru ağırlık ile en yüksek fenolik içeriğe sahip ekstre olduğu tespit edilmiştir. Ekstreler arasında en düşük etkinlik Alda herbada görülmüştür.

Tablo 4. Ekstrelerin toplam fenolik madde miktarı

	Toplam fenolik içerik mg *GAE/g kuru ağırlık
Alda kök	144.32 ± 7.46
Alda herba	6.37 ± 0.95
Almin kök	$188.30 \pm 2.68^{**}$
Almin herba	24.18 ± 9.98

*GAE: Gallik asit eş değeri. ** $p < 0.0001$, diğer ekstrelerle kıyaslandığında.

4.3. Toplam Flavonoit Madde Miktarı Tayini

Ekstrelerin flavonoit madde miktarı tayini spektrofotometrik yöntemler kullanılarak incelenmiştir. Sonuçlar Tablo 5’te gösterilmektedir. Almin herbanın toplam flavonoit madde miktarı 160.42 ± 9.25 mg KE/g kuru ağırlık bulunurken, Alda herbanın ise 156.18 ± 2.82 mg KE/g kuru ağırlık ile en yüksek flavonoit içeriğe sahip ekstre olduğu tespit edilmiştir.

Tablo 5. Ekstrelerin toplam flavonoit madde miktarı

	Toplam flavonoit içerik
	mg *KE/ g kuru ağırlık
Alda kök	-
Alda herba	156.18 ± 2.82
Almin kök	-
Almin herba	160.42 ± 9.25 ^{ns}

*KE: kersetin eş değeri, ns: istatistiksel olarak farklılık yok, diğer ekstreyle kıyaslandığında

4.4. Antioksidan Aktivitenin İncelenmesi

4.4.1. DPPH Radikal Süpürme Aktivitesinin Belirlenmesi

Ekstrelerin radikal süpürme etkileri, DPPH yöntemi kullanılarak incelenmiştir. Sonuçlar Tablo 6'da sunulmuştur. Bu çalışmada pozitif kontrol olarak gallik asit kullanılmıştır. Sonuçlara incelendiğinde ekstrelerin konsantrasyona bağlı olarak radikal süpürme etkinliği gösterdiği ortaya konulmuştur. Almin kök 50 ve 200 µg/mL'de % 81.33 ± 3.05 ve % 91.58 ± 0.15 oranlarında inhibisyon göstermiştir. Pozitif kontrol kullanılan gallik asit ile kıyaslandığında ekstrelerin düşük DPPH radikal süpürme etkinliğine sahip olduğu tespit edilmiştir.

Tablo 6. Ekstrelerin DPPH aktivitesi (%)

µg/mL	10	50	200
Alda kök	30.98 ± 1.09	68.70 ± 1.58	91.58 ± 0.19 ^{ns}
Alda herba	18.55 ± 2.00	40.66 ± 5.96	82.70 ± 8.39
Almin kök	24.75 ± 3.95	81.33 ± 3.05	91.58 ± 0.15 ^{ns}
Almin herba	17.78 ± 1.00	53.26 ± 1.90	89.41 ± 2.73
Gallik asit	92.10 ± 0.20	91.99 ± 0.02	91.98 ± 0.15

ns: pozitif kontrol ile aynı konsantrasyonda kıyaslandığında istatistiksel olarak farklılık yok.

4.5. Enzim İnhibisyonlarının İncelenmesi

4.5.1. COX 1/2 Enzim İnhibisyon Etkinliğinin Belirlenmesi

Ekstrelerin COX 1/2 enzimlerine ait inhibisyon çalışmaları spektrofotometrik yöntem kullanılarak incelenmiştir. Sonuçlar Tablo 7 ve 8’de verilmiştir. Bu çalışmada pozitif kontrol olarak diklofenak kullanılmıştır. Tablo 7’de görüldüğü üzere Almin kök ekstresinde 50 µg/mL ve 200 µg/mL’de % 71,48 ± 5.84 ve % 83.99 ± 0.53 oranlarında inhibisyon görülmüştür. Çalışma sonuçları incelendiğinde Alda kök ekstresi ile 200 µg/mL konsantrasyonda % 85.79 ± 2.58 oranında COX-1 enzimine karşı inhibisyon görülmüştür. Her iki ekstrenin COX-1 enzimi üzerine IC₅₀ değerleri incelendiğinde Alda kök 11.25 µg/mL, Almin kök ise 38.64 µg/mL olarak belirlenmiştir.

Ekstrelerin COX-2 enzimine karşı etkinlikleri incelendiğinde ise konsantrasyona bağlı olarak etkinlik tespit edilmiştir. Ekstreler arasında en yüksek etkinlik Almin kök ve Alda köke ait bulunmuştur. Her iki ekstrenin COX-2 enzimi IC₅₀ değerleri incelendiğinde Alda kök 27.57 µg/mL, Almin kök ise 37.04 µg/mL olarak belirlenmiştir. Ekstrelerin selektiflik indeksi incelendiğinde; Alda kök ekstresinin COX-2 enzimini daha selektik şekilde inhibe ettiği tespit edilmiştir.

Tablo 7. Ekstrelerin COX-1 etkinliği (%)

µg/mL	10	50	200	IC ₅₀ (µg/mL)
Alda kök	nd	57.34 ± 3.02 ^{ns}	85.79 ± 2.58 ^{***}	11.25
Alda herba	nd	13.14 ± 0.92	76.48 ± 0.95 ^{***}	137.29
Almin kök	8.56 ± 1.67	71.48 ± 5.84 ^{***}	83.99 ± 0.53 ^{***}	38.64
Almin herba	nd	50.15 ± 11.17	79.19 ± 1.83 ^{***}	49.19
Diklofenak	57.55 ± 0.73	61.91 ± 1.14	60.00 ± 0.91	

Nd: Aktivite yok, ***p<0.001 pozitif kontrol ile aynı konsantrasyonda kıyaslandığında

Tablo 8. Ekstrelerin COX-2 etkinliği (%)

$\mu\text{g/mL}$	10	50	200	IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$)
Alda kök	16.00 ± 4.21	59.26 ± 2.18	$91.89 \pm 1.27^{***}$	37.04
Alda herba	12.54 ± 2.58	37.30 ± 1.32	$73.42 \pm 5.35^{\text{ns}}$	116.49
Almin kök	24.97 ± 0.93	$68.24 \pm 7.89^{\text{ns}}$	$91.82 \pm 0.56^{***}$	27.57
Almin herba	14.63 ± 5.91	52.92 ± 2.88	$83.29 \pm 5.35^*$	45.84
Diklofenak	72.62 ± 0.44	72.29 ± 1.46	73.87 ± 1.93	

ns: pozitif kontrol ile aynı konsantrasyonda kıyaslandığında istatistiksel farklılık yok, * $p < 0.05$ pozitif kontrol ile aynı konsantrasyonda kıyaslandığında, *** $p < 0.001$ pozitif kontrol ile aynı konsantrasyonda kıyaslandığında

Tablo 9. Ekstrelerin COX-1/COX-2 oranı

	IC_{50} (COX-1/COX-2)
Alda kök	0.30
Alda herba	1.18
Almin kök	1.40
Almin herba	1.07

4.5.2. Elastaz Enzim İnhibisyon Etkinliğinin Belirlenmesi

Ekstrelerin elastaz enzim inhibisyonu spektrofotometrik yöntem kullanılarak incelenmiştir. Sonuçlar Tablo 10’da verilmiştir. Bu çalışmada pozitif kontrol olarak epigallokateşin gallat kullanılmıştır. Çalışma sonuçları incelendiğinde ekstreler arasında Almin kök ekstresinin IC_{50} değerin 40.35 $\mu\text{g/mL}$ ile en düşük değere sahip olduğu gözlenmiştir. Bu veri Almin kök ekstresinin en güçlü inhibisyon gösteren ekstre olduğunu ortaya koymuştur.

Tablo 10. Ekstrelerin elastaz inhibisyon etkinliği (%)

$\mu\text{g/mL}$	10	50	200	$\text{IC}_{50} (\mu\text{g/mL})$
Alda kök	nd	29.71 ± 3.87	54.20 ± 4.89	90.15
Alda herba	27.83 ± 5.62	49.23 ± 0.33	51.27 ± 2.87	72.22
Almin kök	33.61 ± 5.44	$54.14 \pm 4.58^{\text{ns}}$	59.13 ± 3.23	40.35
Almin herba	32.31 ± 2.05	50.83 ± 2.27	55.49 ± 1.67	54.12
*EPG	51.95 ± 3.26	63.06 ± 5.63	77.27 ± 5.26	9.35

*EPG: Epigallokateşin gallat, ns: pozitif kontrol ile aynı konsantrasyonda kıyaslandığında istatistiksel farklılık yok

4.5.3. Kollajenaz Enzim İnhibisyon Etkinliğinin Belirlenmesi

Ekstrelerin kollajenaz enzim inhibisyonu spektrofotometrik yöntem kullanılarak incelenmiştir. Sonuçlar Tablo 11’de verilmiştir. Bu çalışmada pozitif kontrol olarak epigallokateşin gallat kullanılmıştır. Çalışma sonuçları incelendiğinde ekstrelerin kollajenaz enzimine karşı inhibitör özellik göstermediği tespit edilmiştir. Pozitif kontrol olarak kullanılan epigallokateşin gallat’ın 200 $\mu\text{g/mL}$ ’da % 84.22 ± 0.22 gösterdiği belirlenmiştir.

Tablo 11. Ekstrelerin kollajenaz inhibisyon etkinliği (%)

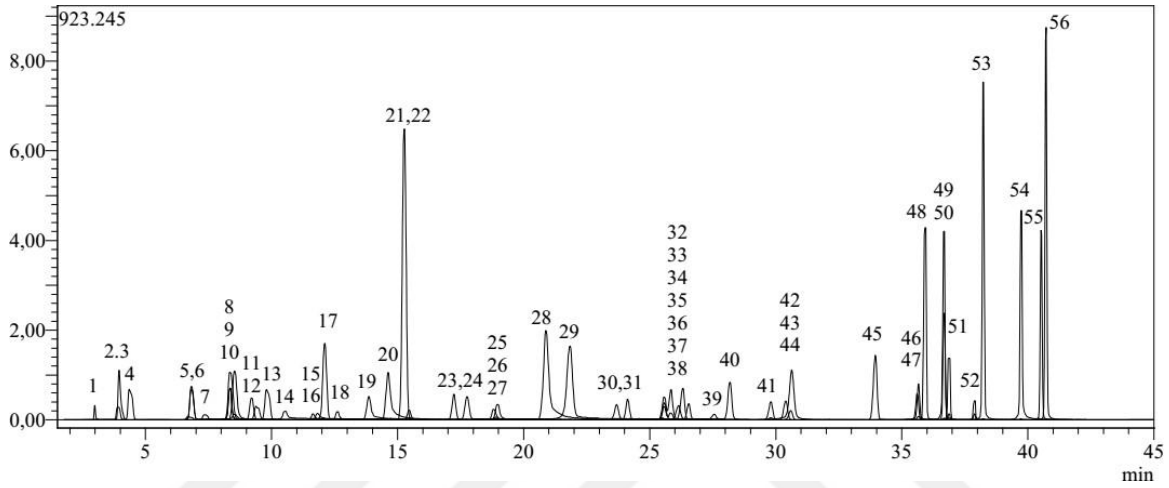
$\mu\text{g/mL}$ ($\mu\text{g/mL}$)	10	50	200	IC_{50}
Alda kök	nd	nd	nd	nd
Alda herba	nd	nd	nd	nd
Almin kök	nd	nd	nd	nd
Almin herba	nd	nd	nd	nd
*EPG	-	-	84.22 ± 0.22	-

*EPG: Epigallokateşin gallat, nd: Aktivite yok.

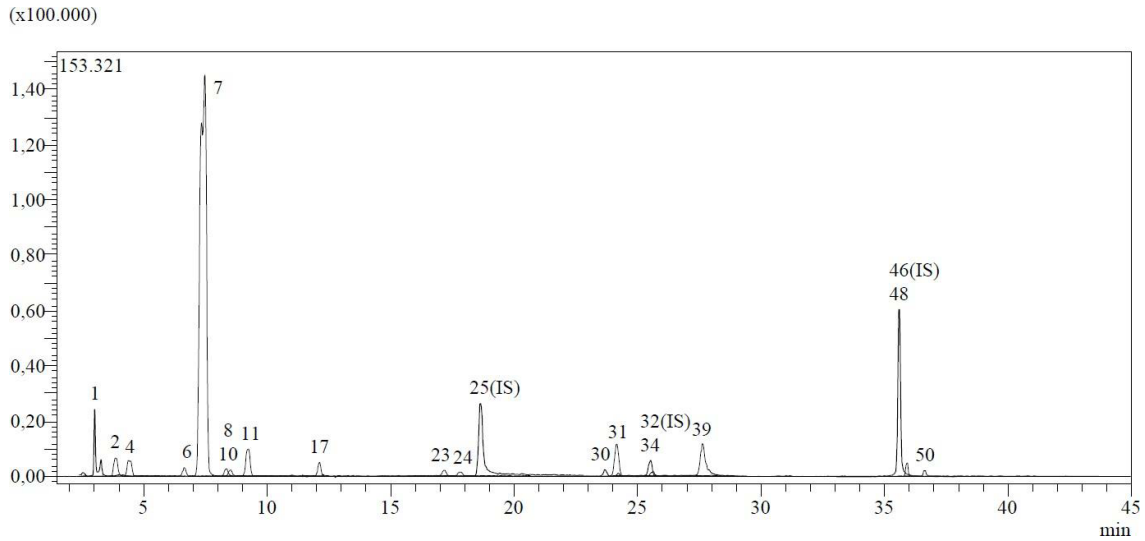
4.6. LC-MS/MS Analiz Sonuçları

Yapılan biyolojik aktivite çalışmalarında *Alchemilla daghestanica* bitkisinden hazırlanan ekstrelerden Alda kök kodlu ekstre ve *Alchemilla minusculiflora* bitkisinden hazırlanan ekstrelerden Almin kök kodlu ekstre daha yüksek etkili olarak belirlenmiştir ve

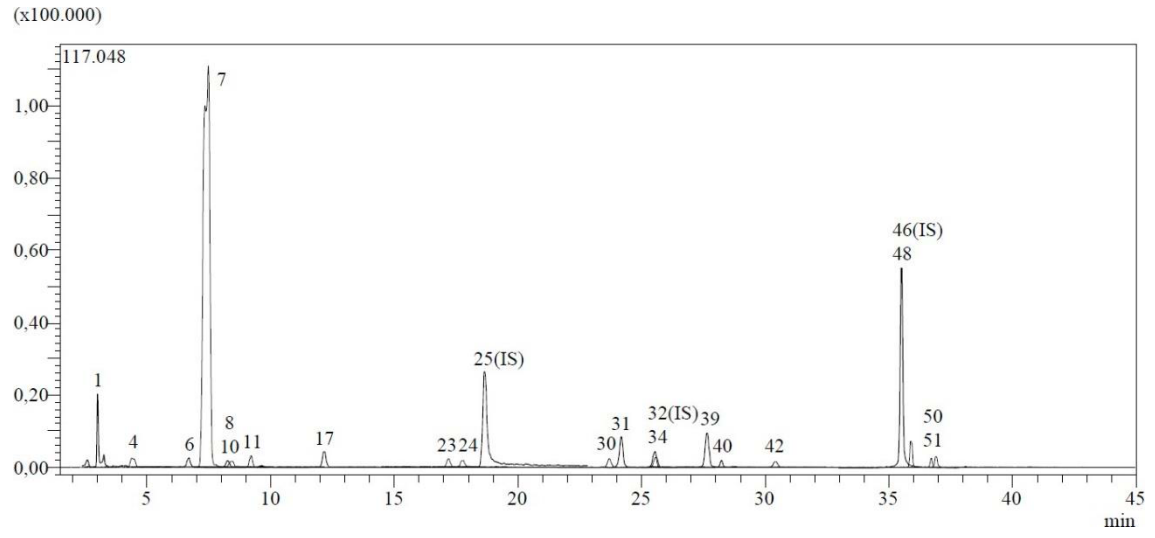
fenolik bileşikler yönünden fitokimyasal içerik profili LC-MS/MS yöntemi ile incelenmiştir. Yapılan LC-MS/MS analizinde 53 fitokimyasal bileşik standart olarak kullanılmış (Şekil 5) ve *Alchemilla minusculiflora* Almin kök kodlu ekstre (Şekil 6) *Alchemilla daghestanica* Alda kök kodlu ekstre (Şekil 7) analiz edilmiştir. İki ekstrede de majör molekül olarak kateşin (Alda kök 50.433 µg/g ve Almin kök 65.806 µg/g, Tablo 12) ve ellajik asit (Alda kök 2.799 µg/g ve Almin kök 6.725 µg/g, Tablo 12) tespit edilmiştir.



Şekil 7. Standart bileşiklerin LC-MS/MS analizine ait kromatogram



Şekil 8. Almin Kök ekstresi LC-MS/MS analizine ait kromatogram



Şekil 9. Alda Kök ekstresi LC-MS/MS analizine ait kromatogram

Tablo 12. Almin Kök ve Alda Kök Ekstrelerinin LC-MS/MS Analiz Sonuçları

No	Bileşikler	RT*	Ana iyon (m/z)	Parçalanma iyonları	İyon modu	Almin Kök (µg/g)	Alda Kök (µg/g)
1	Kinik asit	3.0	190.8	93.0	Neg	1.022	0.359
2	Fumarik asit	3.9	115.2	40.9	Neg	0.13	-
3	Akotlinik asit	4.0	172.8	129.0	Neg	-	-
4	Gallik asit	4.4	168.8	79.0	Neg	0.217	0.09
5	Epigallokateşin	6.7	304.8	219.0	Neg	-	-
6	Protokateşik asit	6.8	152.8	108.0	Neg	0.091	0.078
7	Kateşin	7.4	288.8	203.1	Neg	65.806	50.433
8	Gentisik asit	8.3	152.8	109.0	Neg	0.079	0.064
9	Klorojenik asit	8.4	353.0	85.0	Neg	-	-
10	Protokateşik aldehit	8.5	137.2	92.0	Neg	0.039	0.037
11	Tannik asit	9.2	182.8	78.0	Neg	0.238	0.074
12	Epigallokateşin gallat	9.4	457.0	305.1	Neg	-	-
13	Sinarin	9.8	515.0	191.0	Neg	-	-
14	4-OH Benzoik asit	10.5	137.2	65.0	Neg	-	-
15	Epikateşin	11.6	289.0	203.0	Neg	-	-
16	Vanilik asit	11.8	166.8	108.0	Neg	-	-
17	Kafeik asit	12.1	179.0	134.0	Neg	0.03	0.029
18	Şiringik asit	12.6	196.8	166.9	Neg	-	-
19	Vanilin	13.9	153.1	125.0	Poz	-	-
20	Şiringik aldehit	14.6	181.0	151.1	Neg	-	-
21	Daidzin	15.2	417.1	199.0	Poz	-	-
22	Epikateşin gallat	15.5	441.0	289.0	Neg	-	-
23	Piseid	17.2	391.0	135/106.9	Poz	0.028	0.047
24	p-Kumarik asit	17.8	163.0	93.0	Neg	0.056	0.049
25	Ferulik asit	18.8	192.8	149.0	Neg	-	-
26	Sinapik asit	18.9	222.8	193.0	Neg	-	-
27	Kumarin	20.9	146.9	103.1	Poz	-	-
28	Salisilik asit	21.8	137.2	65.0	Neg	-	-
29	Sinarozit	23.7	447.0	284.0	Neg	0.033	0.073
30	Mikuelianin	24.1	477.0	150.9	Neg	0.566	0.361
31	Rutin	25.6	608.9	301.0	Neg	-	-
32	İzokersitrin	25.6	463.0	271.0	Neg	0.06	0.135
33	Hesperidin	25.8	611.2	449.0	Poz	-	-
34	o-Kumarik asit	26.1	162.8	93.0	Neg	-	-
35	Genistin	26.3	431.0	239.0	Neg	-	-
36	Rozmarinik asit	26.6	359.0	197.0	Neg	-	-
37	Ellajik asit	27.6	301.0	284.0	Neg	6.725	2.799
38	Kosmosiin	28.2	431.0	269.0	Neg	-	0.01
39	Kersitrin	29.8	447.0	301.0	Neg	-	-
40	Astragalin	30.4	447.0	255.0	Neg	-	0.028
41	Nicotiflorin	30.6	592.9	255.0/284.0	Neg	-	-

Tablo 12. Devam

42	Fisetin	30.6	285.0	163.0	Neg	-	-
43	Daidzein	34.0	253.0	223.0	Neg	-	-
44	Kersetin	35.7	301.0	272.9	Neg	-	-
45	Naringenin	35.9	270.9	119.0	Neg	0.022	0.032
46	Hesperetin	36.7	301.0	136.0/286.0	Neg	-	-
47	Luteolin	36.7	284.8	151.0/175.0	Neg	0.005	0.01
48	Genistein	36.9	269.0	135.0	Neg	-	0.016
49	Kempferol	37.9	285.0	239.0	Neg	-	-
50	Apigenin	38.2	268.8	151.0/149.0	Neg	-	-
51	Amentoflavon	39.7	537.0	417.0	Neg	-	-
52	Krisin	40.5	252.8	145.0/119.0	Neg	-	-
53	Akasetin	40.7	283.0	239.0	Neg	-	-

*RT: Retention time (Alıkonma zamanı)

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Alchemilla L. cinsi Dünya’da kuzey yarım kürede yayılım göstermektedir ve yaklaşık bin tür ile temsil edilmektedir (63). Ülkemizde *Alchemilla* cinsinin çoğunluğu Karadeniz bölgesinde yayılım gösteren 82 tür ile listelenmiştir (3).

Alchemilla türleri Anadolu’da aslan pençesi ve fındık otu isimleri ile bilinirler. Doğu Karadeniz bölgesinde bitkinin çeşitli türleri dekoksionu halinde dahilen karaciğer iltihaplanması, mide ağrısı, bronşit, nefes darlığı, boğaz enfeksiyonu, romatizma, kadın hastalıklarının ve adet bozukluklarının tedavisinde; haricen ezilerek lapa halinde yara ve kesik tedavisinde kullanılmaktadır (3). Bitki Avrupa’da “Lady’s mantle” ismi ile bilinmektedir ve halk arasında tıbbi etkiler için kullanılmaktadır. Bitkinin toprak üstü kısımlarından hazırlanan infüzyon ve/veya etanol ekstresinin diyare, gastrointestinal rahatsızlıklar ve dismenore tedavisinde kullanımı ESCOP (European Scientific Cooperative on Phytotherapy) monograflarında ve Avrupa Farmakopesinde kayıtlıdır ve çoğunlukla *A. vulgaris* türü kullanılmaktadır (8).

Bitkiden hazırlanan ekstrelerin genel olarak antioksidan, antimikrobiyal, antiinflamatuvar, nöroprotektif etki gösterebildiği ve bu etkilerden sorumlu ana kimyasal bileşenlerin tanenler, fenolik asitler ve flavonoidler olduğu bilimsel çalışmalar ile ortaya konmuştur (63).

Dokunun bütünlüğünün bozulmasına ve dokunun işleyişinin bozulmasına yara denir. Yara iyileşme süreci hemostaz ve inflamasyon, koagülasyon, granülasyon dokusu oluşumu, reepitelizasyon ve hücre dışı matrisin (ECM) yeniden şekillenmesi gibi fizyolojik olayları içermektedir (65). Ayrıca hücre dışı matrisin büyüme faktörü aktivasyonu ile bağlantılı olarak hücreler için önemli sinyalleri dönüştürme yeteneği ile yara iyileşme sürecinde aktif bir rol oynadığı bulunmuştur. Dermisteki hücre dışı matris molekülleri kolajen, elastin, proteoglikanlar ve glikozaminoglikanlardan oluşmaktadır. Kolajen, yara iyileşme sürecinin tüm aşamalarında rol oynarken elastin deriye ve diğer dokulara esneklik kazandırmaktadır. Kollajenaz enziminin inhibisyonu ile dokunun yeniden yapılanması, yaranın iyileşmesi ve dokuların normal işleyişine kavuşma sürecine katkı sağlanabilmektedir (18). Elastaz enziminin aktivasyonu ile elastinin heliks yapısının bozulması, cildin elastik formunun deformasyonu ve cilt sarkmasına ilerleyen süreç meydana gelmektedir. Elastaz inhibisyonu ile cildin yaşlanmasının önüne geçilmesi ve sürecin tersine döndürülmesi amaçlanmaktadır (19). Ayrıca yaralanan dokuda reaktif

oksijen ürün oluşumu artmakta ve yara iyileşme sürecini olumsuz etkilemektedir. Bu nedenle antioksidan etkili bileşiklerin yara iyileşme sürecinde kullanılması önemli hale gelmektedir (65). COX-1, çoğu hücrede yaygın olarak bulunurken, COX-2 fibroblast, makrofaj ve diğer bağışıklık hücrelerinde bulunan ve inflamasyon yanıt için üretimi indüklenir. Pek çok inhibitör molekül inflamasyonun sitotoksik etkilerini kontrol etmek üzere COX-2 üzerine etki etmeyi hedeflemektedir. COX-1 inhibitörleri gastrointestinal mukozaya zararlı etki yaparken, COX-2'nin güvenli olduğu bulunmuştur. COX inhibitörleri, postoperatif prosedürden sonra rutin olarak inflamasyonu geçici olarak hafifletmek ve yara kapanmasını sağlamak için kullanılır (66). Yara iyileşme sürecinde iz oluşumunda inflamasyonun etkisi büyüktür. İnflamasyon yanıtın azaltılması, COX-2 inhibisyonu hedeflenerek iz oluşumunu sınırlamak ve izsiz yara iyileşmesine etkili olmak mümkündür (21). Bitkiler içerdikleri aktif sekonder metabolitler ile antioksidan, antiinflamatuvar, antimikrobiyal, hücre stimule edici özellikler gibi biyolojik etkinlikler göstererek yara iyileşmesini hızlandırabilirler. *Alchemilla* türlerinin yaralarda ve enfeksiyöz durumlarda geleneksel olarak kullanımına dayanarak yara ile ilişkili olabilecek bilimsel çalışmalar tasarlanmaktadır (17).

Yapılan bu çalışmada Anadolu'da Karadeniz bölgesinde doğal olarak yetişen *A. daghestanica* ve *A. minusculiflora* türlerinin toprak altı ve toprak üstü ekstraktlarının antioksidan, antiinflamatuvar etkinliklerinin incelenmesi, cilt üzerine kullanım potansiyelinin değerlendirilmesi ve etkiden sorumlu olabilecek fitokimyasal içeriğinin ortaya konması amaçlanmıştır. Bu bölümde elde edilen bulguların literatür ile karşılaştırmalı şekilde incelenmiştir.

Çalışmada *A. daghestanica* türünden iki adet (Alda kök, Alda herba); *A. minusculiflora* türünden iki adet (Almin kök, Almin herba) ekstre hazırlanmıştır. Ekstrelerin total fenolik ve total flavonoit madde miktarı tayinleri spektrofotometrik yöntemler ile yapılmıştır. İki bitki için de kök ekstraktları fenolik bileşikler bakımından daha zengin bulunmuştur. Alda kök 144.32 ± 7.46 mg GAE/g kuru ağırlık ve Almin kök 188.30 ± 2.68 mg GAE/g kuru ağırlık miktarınca fenolik madde içerdikleri tespit edilmiştir (Tablo 4). Toplam flavonoit miktar tayini analizlerinde Alda kök ve Almin kök ekstraktlarında değer hesaplanamamış; Alda herba ekstresi için 156.18 ± 2.82 mg KE/g kuru ağırlık ve Almin herba için 160.42 ± 9.25 mg KE/g kuru ağırlık bulunmuştur (Tablo 5). DPPH yöntemi ile ekstraktların antioksidan kapasiteleri ortaya konmuştur. Tablo 6'da gösterildiği

gibi 200 µg/mL dozda standart olarak kullanılan gallik asit % 91.98 ± 0.15 , Alda kök ekstresi % 91.58 ± 0.19 ve Almin kök ekstresi % 91.58 ± 0.15 radikal süpürücü etkiye sahip olduğu bulunmuştur. Bitkilerde kök ekstralarının daha kuvvetli antioksidan kapasiteye sahip oldukları görülmektedir. Fenol ve flavonoit grubu bileşiklerin antioksidan kapasitelerinin yüksek olduğu bilinmektedir (67). *A. mollis* üzerinde yapılan bir tez çalışmasında bitkinin toprak üstü kısımlarından çeşitli polaritelerde ekstralar hazırlanmış ve total fenol ve total flavonoit miktar tayini yapılmıştır. su, % 70 metanol, butanol, metanol, etil asetat ve hekzan ekstralarının hazırlandığı çalışmada total fenol miktarı en fazla olan ekstre su ekstresi (172.60 ± 1.26 mg GAE/g ekstre) ve total flavonoit miktarı (50.63 ± 0.59 mg RE (rutin)/ g ekstre) ve DPPH radikal süpürücü etkisi (IC_{50} 0.21 mg/mL) en yüksek olan ekstre ise metanol ekstresi olarak tespit edilmiştir (17,25) *A. vulgaris* türü üzerinde yaptıkları bir çalışmada bitkinin kök (AVA) ve toprak üstü (AVR) kısımlarından hazırlanan metanol ekstralarının total fenolik ve total flavonoit miktar tayinleri, antioksidan kapasiteleri (DPPH, ABTS ve hidroksil radikal süpürücü yöntemler ile) test edilmiştir. AVA ekstresinin total fenolik içerik miktarı (558.19 ± 4.83 mg GAE/g kuru ekstre) AVR ekstresinin ise total flavonoit miktarı (19.80 ± 0.35 mg Rutin/g) daha yüksek bulunmuştur. Antioksidan aktivite çalışmalarında ise AVA daha aktif bulunmuştur. DPPH için AVA 5.96 ± 0.21 µg/mL, AVR 11.86 ± 0.56 µg/mL IC_{50} değere sahip olduğu gösterilmiştir (24). Sapko ve ekibinin (2016) yaptığı çalışmada ise *A. vulgaris* kök ve toprak üstü kısımlarından hazırlanan % 70 etanol ekstralarının total fenolik ve total flavonoit miktar tayinleri analiz edilmiş; kök ekstresinde total fenolik miktarı yüksek (80.2 ± 3.54 mg/g kuru ekstre), toprak üstü ekstresinde ise total flavonoit miktarının (28.26 ± 2.21 mg/g kuru ekstre) diğer ekstreye göre daha fazla yüksek olduğu tespit edilmiştir. *A. vulgaris* kök etilasetat ekstresinin (IC_{50} 0.06 ± 0.01 µg/mL) DPPH süpürücü aktivitesi toprak üstü etil asetat ekstresinden (IC_{50} 0.08 ± 0.01 µg/mL) daha yüksek olduğu gösterilmiştir (68). Shilpee ve arkadaşları (2021) *A. vulgaris* türünün toprak üstü kısımlarından hazırladıkları etil asetat ve metanol ekstralarının toplam fenolik içerik miktarlarını incelemiş ve sırasıyla 547.333 ve 386.86 µg GAE/mL ekstre olarak; total flavonoit miktarları ise 153.33 ve 275.00 µg rutin ekivalan/mL ekstre olarak saptamışlardır. Ekstrelerin antioksidan kapasiteleri DPPH yöntemi ile analiz edilmiş ve etil asetat ekstresi IC_{50} 66.71 mg/mL, metanol ekstresi IC_{50} 23.47 mg/mL olarak rapor edilmiştir (69). Uzunkaya ve ekibi (2024) *A. pseudocartalinica* türünün kökleri ve toprak üstü kısımlarından hazırlanan çeşitli polaritelerdeki ekstralar üzerinde yaptıkları

çalışmalarda kök *n*-butanol alt ekstresinin total fenolik miktarının (688.92 ± 23.04 mg GAE/g kuru ekstre) daha yüksek olduğunu, toprak üstü diklorometan alt ekstresinin ise daha yüksek miktarda total flavonoit içerdiğini (135.01 ± 7.28 mg Kersetin/g kuru ekstre); kök *n*-butanol ise DPPH radikal süpürücü aktivitesinin diğer ekstrelerden daha fazla olduğunu raporlamıştır ($IC_{50} 8.25 \pm 1.32$ µg/mL) (64).

Alda kök, Alda herba, Almin kök ve Almin herba ekstrelerinin antiinflamatuvar aktivitelerini belirlemek amacıyla COX-1 ve COX-2 enzim inhibisyonları incelenmiştir. İki bitki türü için de tüm ekstreler 200 µg/mL konsantrasyonda standart olarak kullanılan diklofenaktan daha yüksek inhibisyon aktivitesi göstermiş; en kuvvetli inhibisyon kök ekstrelerinde saptanmıştır. 200 µg/mL konsantrasyonda pozitif standart diklofenak COX-1 enzimini % 60.00 ± 0.91 , Alda kök % 85.79 ± 2.58 , Almin kök % 83.99 ± 0.53 oranında inhibe etmiştir. Benzer şekilde 200 µg/mL konsantrasyonda diklofenak COX-2 enzimini % 73.87 ± 1.93 , Alda kök % 91.89 ± 1.27 ve Almin kök % 91.82 ± 0.56 oranında inhibe etmiştir. Boroja ve arkadaşları (2018) *A. vulgaris* kök ve toprak üstü metanol ekstrelerinin antiinflamatuvar etkilerini COX enzimleri üzerinde 50 µg/mL konsantrasyonda test etmiş; iki ekstrenin de COX-1 enzimini % 44 oranında indometasinden (% 49.63) daha zayıf şekilde inhibe ettiği; COX-2 enzimini ise toprak üstü metanol ekstresinin (% 63.56) pozitif standart NS-398'den (% 40.72) daha güçlü inhibe ettiği raporlanmıştır (24). *A. vulgaris* kök ve toprak üstü kısımlarından hazırlanan metanol ekstrelerinin yüksek fenolik içeriğe sahip olduğu, antioksidan ve antimikrobiyal etkinliklerinin yanında COX-1 ve COX-2 üzerinde inhibisyon etki gösterdikleri gösterilmiştir (17). *A. vulgaris* % 70 etanol ekstresinin LPS ile indüklenmiş modelde IL-8 salınımını azalttığı, TLR2 ve TLR4 sinyal yolakları üzerinden inhibisyon etki gösterdiğini, bunların yanında NF-kB p65 translokasyonuna etki etmediği gösterilmiştir (47).

Alda kök, Alda herba, Almin kök ve Almin herba ekstrelerinin cilt üzerine etkileri için *in vitro* sistemlerde elastaz ve kollajenaz enzimlerini inhibe etme potansiyelleri araştırılmıştır. Epigallokateşin gallatin pozitif standart olarak kullanıldığı çalışmalarda ekstreler 10, 50 ve 200 µg/mL konsantrasyonda test edilmiş ve hiçbir ekstrede kollajenaz enzim inhibisyonu saptanamamıştır. Bunun yanında elastaz enzimi üzerinde inhibisyon gözlemlenmiştir. Alda ekstreleri arasında en yüksek inhibisyonu Alda herba ($IC_{50} 72.22$ µg/mL), Almin ekstreleri arasında en yüksek inhibisyonu Almin kök ($IC_{50} 40.35$ µg/mL) göstermiş ve epigallokateşin gallattan ($IC_{50} 9.35$ µg/mL) daha zayıf etkinlik

göstermişlerdir.

A. mollis ve *A. persica* türlerinin kök ve toprak üstü kısımlarından hazırlanan metanol: su (80:20) ekstralarının biyolojik etkinlikleri; *in vivo* hayvan deneyi ile lineer insizyon ve sirkular eksizyon yara modellerinde, *in vitro* Whittle metodu ile antiinflamatuvar modelinde test edilmiş ve toprak üstü ekstralarının kuvvetli etkinlik gösterdiği saptanmıştır (22).

Kurtul (2022) ve ekibi de aynı bitkilerden hazırladıkları ekstralar üzerinde çeşitli biyolojik aktivite ve izolasyon çalışması yürütmüş; insan kırmızı kan hücreleri üzerinde antiinflamatuvar etkinliği en yüksek olan ekstrenin *A. mollis* toprak üstü ekstresi olduğu tespit edilmiştir (IC_{50} 1.22 ± 0.07 mg/mL). Etkiden sorumlu olabilecek moleküllerin izolasyonu yapılmış, ellajik asit ve mikuelianin izole edilmiştir. Mikuelianin (IC_{50} 1.23 ± 0.02 mg/mL) ekstreye benzer antiinflamatuvar etki gösterirken ellajik asit çok daha yüksek etki göstermiştir (IC_{50} 0.57 ± 0.01 mg/mL) (9). *A. vulgaris* türü üzerinde yapılan bir biyolojik aktivite yönlendirmeli izolasyon çalışmasında; kollajenaz inhibisyonundan tanenlerin değil flavonoit grubu bileşiklerin sorumlu olduğu, en etkili bulunan bileşiğin kersetin-3-O- β -glukuronit (mikuelianin) olduğu ve FDA tarafından kollajenaz inhibitörü olarak onaylı olan doksisiklinden daha kuvvetli etki gösterdiği raporlanmıştır (70). *A. vulgaris* türünden hazırlanan çeşitli polaritedeki ekstralar yara iyileşmesi üzerine etkisi L929 fibroblast hücrelerinde *in vitro* ve cilt bariyeri yenileme *in vivo* modellerde test edilmiş; en etkili ekstrenin etanol ekstresi olduğu ve içeriğindeki majör bileşiklerin ellajik asit, izokersetin ve morin olduğu tespit edilmiştir (42). Ayrıca ellajik asidin kütanöz lipid peroksidasyonunu önleyebildiği, UV-B ışınlarının neden olduğu kolajen yıkımını ve inflamasyon tepkilerini önleyebildiği; kersetin glikozitinin ve ellajik asitin kolajen üretimini iyileştirerek yara iyileşme hızını arttırabildiği gösterilmiştir (17).

Yapılan tez çalışmasında biyolojik aktivite çalışmalarında kök ekstralarında daha ümit vaat edici etkiler görüldüğü için fitokimyasal içerik analizleri Alda kök ve Almin kök ekstraları üzerinde gerçekleştirilmiştir. Fenolik ve flavonoit yapısındaki bileşiklerin tespit edilmesi için LC-MS/MS analizleri uygulanmıştır. Alda kök ekstresinde tanen grubu kateşin (50.433 μ g/g), ellajik asit (2.799 μ g/g), gallik asit (0.09 μ g/g), protokateşik asit (0.078 μ g/g), tannik asit (0.074 μ g/g), bir fenolik asit olan kinik asit (0.359 μ g/g) ve flavonoit türevi olan mikuelianin (0.361 μ g/g), izokersitrin (0.135 μ g/g) ve sinarozit (0.073 μ g/g) tespit edilmiştir. Almin kök ekstresinde majör olarak tanen türevi kateşin (65.806

$\mu\text{g/g}$), ellajik asit (6.725 $\mu\text{g/g}$), tannik asit (0.238 $\mu\text{g/g}$), gallik asit (0.217 $\mu\text{g/g}$); fenolik asit yapısında kinik asit (1.022 $\mu\text{g/g}$), flavonoit türevi olan mikuelianin (0.566 $\mu\text{g/g}$) ve izokersitrin (0.06 $\mu\text{g/g}$) tespit edilmiştir.

Etnobotanik çalışmalarda *Alchemilla* türlerinin daha çok toprak üstü kısımlarının kullanıldığı, monograf ve farmakopelerde bitkinin toprak üstü kısımları konusunda kullanımların derlendiği görülmektedir (8,63). Bunun yanında yapılan çeşitli çalışmalarda *Alchemilla* kök ekstrelerinin fenolik içerikten; toprak üstü ekstrelerin ise flavonoit türevi bileşiklerce zengin olduğu görülebilmektedir (64,9). *A. pseudocartalinica* köklerinin fenolik bileşikler bakımından toprak üstü kısımlardan daha zengin olduğu özellikle kuvvetli antioksidan etkisi ile öne çıkan kateşin içeriklerinin yüksek olduğu gösterilmiştir (64,71,6). Kök ekstrelerinde majör molekül olarak kateşin ve türevlerine rastlanmaktadır. Bu tip moleküllerin yüksek antioksidan etkiye sahip olduğu ve çeşitli biyolojik aktivitelerden sorumlu olabildikleri pek çok çalışmada gösterilmiştir (13,71,72) *A. vulgaris* kök ve toprak üstü kısımlarından hazırlanan ekstrelerin ortopoks virüsüne karşı etkileri test edilmiş ve kök ekstrelerinin toprak üstü ekstresinden daha aktif; kateşin içeriği yüksek olan kök ekstresinin de diğer kök ekstresinden daha aktif olduğu raporlanmıştır (71). *A. mollis* kök ve toprak üstü metanol ekstrelerinin 100 ve 200 mg/kg dozda karaciğerde karbon tetraklorür ile oluşturulmuş hasar modelinde hücrel hasarı onarabildiği, ALT seviyelerinde düşme sağlayabildiği, kök ekstrelerinin toprak üstü ekstrelerden daha etkili olduğu ve etkiden fenolik bileşiklerin ve flavonoitlerin sorumlu olabileceği bildirilmiştir (6).

Bu çalışma ile ilk defa *A. daghestanica* ve *A. minusculifolia* türlerinin fitokimyasal içerikleri incelenmiş ve biyolojik etkinlikleri değerlendirilmiştir. Elde edilen veriler literatür ile paralellik göstermekte ve ülkemiz florasında yetişen 80'in üzerinde *Alchemilla* türünün tıbbi bitki olarak ve ilaç hammaddesi eldesinde değerlendirilmesi için ümit vadeci veriler sunmaktadır.

6. KAYNAKLAR

1. Şar S, Esin K, Ataç A (2011). Aromaterapinin tarihçesi ve bu alanda kullanılan tıbbi bitkilerden örnekler. Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Lokman Hekim Tıp Tarihi ve Folklorik Tıp Dergisi (Özel sayı) 32-33.
2. Hayirlioglu-Ayaz S, Inceer H (2009). Three new *Alchemilla* L.(Rosaceae) records from Turkey. Pak J Bot 41(5): 2093-2096.
3. Ayaz S (2012). *Alchemilla* L. Güner A, Aslan S, Ekim T, Vural M, Babaç MT (Ed.), Türkiye Bitkileri Listesi (Damarlı Bitkiler). Nezahat Gökyiğit Botanik Bahçesi Yayınları, İstanbul, Sayfa: 791-794.
4. İlgün S, Baldemir A, Koşar M (2014). *Alchemilla* L. türlerinin kimyasal bileşikleri ve biyolojik aktiviteleri. HUIPHARM 1: 17-30.
5. Gruenwald J, Brendler T, Jaenicke C (2007). PDR for Herbal Medicines. Medical Economics Company, Inc, Montvale; Sayfa: 456-457.
6. Ozbek H, Acikara OB, Keskin I, Kırmızı NI, Ozbilgin S, Oz BE, Saltan G (2017). Evaluation of hepatoprotective and antidiabetic activity of *Alchemilla mollis*. Biomed Pharmacother 86: 172-176.
7. Renda G, Özel A, Barut B, Korkmaz B, Şoral M, Kandemir Ü, Liptaj T (2018). Bioassay guided isolation of active compounds from *Alchemilla barbatiflora* Juz. Rec Nat Prod 12(1).
8. ESCOP (2013). Herbal Monograph *Alchemillae herba* - Alchemilla / Lady's Mantle, The Scientific Foundation for Herbal Medicinal Products, European Scientific Cooperative on Phytotherapy (ESCOP). Online serie
9. Kurtul E, Eryilmaz M, Sarialtin SY, Tekin M, Acikara ÖB, Çoban T (2022). Bioactivities of *Alchemilla mollis*, *Alchemilla persica* and their active constituents. Braz J Pharm 58.
10. Korkmaz M, Karakurt E (2015). Kelkit (Gümüşhane) ilçesinde doğal gıda bitkilerinin geleneksel kullanımları. BİBAD 8(2): 31-39.
11. Göç F, Erel E, Sarı A (2021). Plants used in traditional treatment for boils in Turkey. International Journal of Traditional and Complementary Medicine Research 2(1): 49-61.

12. Kanak S, Krzemińska B, Celiński R, Bakalczuk M, Dos Santos Szewczyk K (2022). Phenolic composition and antioxidant activity of *Alchemilla* species. *Plants* 11(20): 2709.
13. Karatoprak G Ş, İlğün S, Koşar M (2018). Antiradical, antimicrobial and cytotoxic activity evaluations of *Alchemilla mollis* (Buser) Rothm. *Int J Herb Med* 6(2): 33-38.
14. Karaoglan E S, Bayir Y, Albayrak A, Toktay E, Ozgen U, Kazaz C, Cadirci E (2020). Isolation of major compounds and gastroprotective activity of *Alchemilla caucasica* on indomethacin induced gastric ulcers in rats. *Eurasian J Med* 52(3): 249.
15. Ondrejovič M, Ondřígová Z, Kubincová J (2009). Isolation of antioxidants from *Alchemilla xanthochlora*. *Appl Nat Sci* 313.
16. İlğün S, Şeker Karatoprak G, (2021). *Alchemilla mollis* (Buser) Rothm bitkisi köklerinden elde edilen ekstraktların antioksidan ve sitotoksik etkileri. *Mersin Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi* ,14, no.2, 176-185.
17. Tadić VM, Krgović N, Žugić A (2020). Lady's mantle (*Alchemilla vulgaris* L., Rosaceae): A review of traditional uses, phytochemical profile, and biological properties. *Lekovite Sirovine* 40: 66-74.
18. Madhan B, Krishnamoorthy G, Rao JR, Nair BU (2007). Role of green tea polyphenols in the inhibition of collagenolytic activity by collagenase. *Int J Biol Macromol* 41: 16–22.
19. Nantarat N, Mueller M, Lin WC, Lue SC, Viernstein H, Chansakaow S, Leelapompisid P (2020). Sesaminol diglucoside isolated from black sesame seed cake and its antioxidant, anti-collagenase and anti-hyaluronidase activities. *Food Biosci* 36: 100628
20. Berk DR, Bentley DD, Bayliss SJ, Lind A, Urban Z (2012). Cutis laxa: A review. *JAAD* 66: 842.e1-842.e17.
21. Wilgus TA (2004). The impact of cyclooxygenase-2 mediated inflammation on scarless fetal wound healing. *AJP* 165(3): 753-761.
22. Oz B, İlhan M, Ozbilgin S, Akkol E, Acikara O, Saltan G, Suntar I (2016). Effects of *Alchemilla mollis* and *Alchemilla persica* on the wound healing process. *Bangladesh J Pharmacol* 11(3).

23. Žižovic I, Arsic I, Tadic V, Mišić D, Petrovic S, Jovanovic S (2016). Bioactive semisolid and solid phytopreparations. Patent, RS 55130 B1
24. Boroja T, Mihailović V, Katanić J, Pan SP, Nikles S, Imbimbo P, Bauer R (2018). The biological activities of roots and aerial parts of *Alchemilla vulgaris* L. S Afr J Bot 116: 175-184.
25. WFO (2023). The World Flora Online (WFO) Plant List [online]. Available from: <https://wfoplantlist.org/taxon/wfo-7000000532-2023-12?page=1>. [Accessed 17.09.2024]
26. Davis PH (ed.) (1982). Flora of Turkey and the East Aegean Islands. Vol. 4. Edinburgh: Edinburgh University Press.
27. Powo, 2024, <https://powo.science.kew.org/taxon/urn:lsid:ipni.org:names:300081812>
28. Baytop T (1999). Türkiye’de Bitkiler ile Tedavi. İkinci baskı. Nobel Tıp Kitabevi Yayınları, İstanbul.
29. Hayırlıoğlu-Ayaz S (1997). Doğu karadeniz bölgesinde yayılış gösteren *Alchemilla* L. türlerinin morfolojik ve sitotaksonomik yönden incelenmesi. Doktora tezi, Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, Trabzon
30. Tübives (2024). Turkish Plants Data Service [online] Available from: http://194.27.225.161/yasin/tubives/index.php?sayfa=1&tax_id=364. [Accessed 15.09.2024]
31. Trendafilova A, Todorova M, Nikolova M, Gavrilova A, Vitkova A (2011). Flavonoid constituents and free radical scavenging activity of *Alchemilla mollis*. Nat Prod Commun 6(12): 1851–1854.
32. Dos Santos Szewczyk K, Pietrzak W, Klimek K, Grzywa-Celińska A, Celiński R, Gogacz M (2022). LC-ESI-MS/MS identification of biologically active phenolics in different extracts of *Alchemilla acutiloba* Opiz. Molecules 27(3): 621.
33. Kaya B, Menemen Y, Saltan FZ (2012). Flavonoids in the endemic species of *Alchemilla* L., (section *Alchemilla* L. subsection *calycanthum* Rothm. Ser. Elatae Rothm.) from north-east Black Sea region in Turkey. Pak J Bot 44.2: 595-597.
34. Turk M, Kaya B, Menemen Y, Oğuztuzun S (2011). Apoptotic and necrotic effects of plant extracts belonging to genus *Alchemilla* L. species on HeLa cells in vitro. JMPR 5(18): 4566-4571.

35. Krivokuća M, Niketić M, Milenković M, Golić N, Masia C, Scaltrito MM, Kundaković T (2015). Anti-*Helicobacter pylori* activity of four *Alchemilla* species (Rosaceae). *Nat Prod Commun* 10(8): 1369-1371
36. Denev P, Kratchanova M, Ciz M, Lojek A, Vasicek O, Blazheva D, Hyrs P (2014). Antioxidant, antimicrobial and neutrophil-modulating activities of herb extracts. *ABP* 61(2): 359-367.
37. Afshar FH, Maggi F, Ferrari S, Peron G, Dall'Acqua S (2015). Secondary metabolites of *Alchemilla persica* growing in Iran (East Azarbaijan). *Nat Prod Commun* 10(10): 1705-1708
38. Özbilgin S, Özbek H, Kirmizi Nİ, Öz BE, Kurtul E, Özrenk BC, Acikara ÖB (2019). Evaluation of the antidiabetic activity of *Alchemilla persica* Rothm. in mice with diabetes induced by alloxan. *Turk J Pharm Sci* 16(3): 261.
39. Radović J, Suručić R, Niketić M, Kundaković-Vasović T (2022). *Alchemilla viridiflora* Rothm.: the potent natural inhibitor of angiotensin I-converting enzyme. *Mol Cell Biochem* 477: 1893–1903.
40. Radović J, Ušjak D, Milenković M, Kundaković-Vasović T (2022). Inhibition of α -amylase *in vitro* and *in vivo* hypoglycemic effect of methanol extract of *Alchemilla viridiflora* Rothm. *Arh Farm* 72: 461–462
41. Jelača S, Dajić-Stevanović Z, Vuković N, Kolašinac S, Trendafilova A, Nedialkov P, Stanković M, Tanić N, Tanić NT, Acović A, Mijatović S, Maksimović-Ivanić D (2022). Beyond traditional use of *Alchemilla vulgaris*: Genoprotective and antitumor activity *in vitro*. *Molecules* 27(23): 8113.
42. Tasić-Kostov M, Arsić I, Pavlović D, Stojanović S, Najman S, Naumović S, Tadić V (2019). Towards a modern approach to traditional use: *in vitro* and *in vivo* evaluation of *Alchemilla vulgaris* L. gel wound healing potential. *J of Ethnopharm* 238: 111789
43. Bina F, Soleymani S, Toliat T, Hajimahmoodi M, Tabarraei M, Abdollahi M, Rahimi R (2019). Plant-derived medicines for treatment of endometriosis: A comprehensive review of molecular mechanisms. *Pharmacol Res* 139: 76-90
44. Nedyalkov P, Kaneva M, Mihaylova D, Kostov G, Kemilev S (2015). Influence of the

- ethanol concentration on the antioxidant capacity and polyphenol content of *Alchemilla mollis* extracts. C R Acad Bulg Sci 68(12): 1491-502.
45. Mueller M, Hobiger S, Jungbauer A (2010). Anti-inflammatory activity of extracts from fruits, herbs and spices. Food Chem 122(4): 987-996.
 46. Trouillas P, Calliste CA, Allais DP, Simon A, Marfak A, Delage C, Duroux JL (2003). Antioxidant, anti-inflammatory and antiproliferative properties of sixteen water plant extracts used in the Limousin countryside as herbal teas. Food Chem 80(3): 399-407.
 47. Schink A, Neumann J, Leifke AL, Ziegler K, Fröhlich-Nowoisky J, Cremer C, Lucas K (2018). Screening of herbal extracts for TLR2-and TLR4-dependent anti-inflammatory effects. PloS One 13(10): e0203907.
 48. Vaou N, Stavropoulou E, Voidarou C, Tsigalou C, Bezirtzoglou E (2021). Towards advances in medicinal plant antimicrobial activity: A review study on challenges and future perspectives. Microorganisms 9(10): 2041.
 49. Ibrahim OH, Abo-Elyousr KA, Asiry KA, Alhakamy NA, Mousa MA (2022). Phytochemical characterization, antimicrobial activity and in vitro antiproliferative potential of *Alchemilla vulgaris* Auct root extract against prostate (PC-3), breast (MCF-7) and colorectal adenocarcinoma (Caco-2) cancer cell lines. Plants 11(16):2140.
 50. Edrah SM (2017). Evaluation of antimicrobial activities of *Alchemilla vulgaris* and *Portulaca oleracea* ethanolic extracts and correlation with their phytochemical profiles. Biofarmasi J Nat Prod Biochem 15(2): 91–94.
 51. Shrivastava R, Cucuat N, John WG (2007). Effects of *Alchemilla vulgaris* and glycerine on epithelial and myofibroblast cell growth and cutaneous lesion healing in rats, Phytother Res 369-373.
 52. Shrivastava R, John GW, de Lavour ZAC (2006). Treatment of common mouth ulcers with topical *Alchemilla vulgaris* in glycerine (Aphtarine o). Clin Drug Investig 26(10): 567-73.
 53. Hwang E, Ngo HT, Seo SA, Park B, Zhang M, Yi TH (2018). Protective effect of dietary *Alchemilla mollis* on UVB-irradiated premature skin aging through regulation of transcription factor NFATc1 and Nrf2/ARE pathways. Phytomedicine 39: 125-136.

54. Vlaisavljević S, Jelača S, Zengin G, Mimica-Dukić N, Berežni S, Miljić M, Stevanović ZD (2019). *Alchemilla vulgaris* agg.(Lady's mantle) from central Balkan: antioxidant, anticancer and enzyme inhibition properties. RSC Advances 9(64): 37474-37483.
55. Neagu E, Paun G, Albu C, Radu GL (2015). Assessment of acetylcholinesterase and tyrosinase inhibitory and antioxidant activity of *Alchemilla vulgaris* and *Filipendula ulmaria* extracts. J Taiwan Inst Chem 52: 1-6.
56. Takır S, Altun IH, Sezgi B, Süzgeç-Selçuk S, mat A, Uydeş-Doğan BS (2015). Vasorelaxant and blood pressure lowering effects of *Alchemilla vulgaris*: A comparative study of methanol and aqueous extracts. Pharmacogn Mag 11: 163-169.
57. Plotnikov MB, Aliev OI, Andreeva VY, Vasil'ev AS, Kalinkina GI (2006). Effect of *Alchemilla vulgaris* extract on the structure and function of erythrocyte membranes during experimental arterial hypertension. Bull Exp Biol Med 141: 708-711.
58. Mazzio EA, Soliman FK (2009). *In vitro* screening for the tumoricidal properties of international medicinal herbs. Phytotherapy Res 385-398.
59. Yazıcı Bektaş N, Barut B, Mataracı Kara E, Yeşil Cantürk Y (2021). Total phenolic, total flavonoid contents, and *in vitro* biological activities of *Cephalaria procera* Fisch.& Ave-Lall. Istanbul J Pharm 51(3): 365–371.
60. Barut B, Şöhretoğlu D, (2020) Total phenolic content, cyclooxygenases, α -glucosidase, acetylcholinesterase, tyrosinase inhibitory and DPPH radical scavenging effects of *Cornus sanguinea* leaves and fruits. J Pharm Res 24(5): 623-631
61. Acıkara B, İlhan M, Kurtul E, Šmejkal K ve Akkol K (2019). Inhibitory activity of *Podospermum canum* and its active components on collagenase, elastase and hyaluronidase enzymes, Bioorg Chem 93: 103330.
62. Yilmaz MA (2020). Simultaneous quantitative screening of 53 phytochemicals in 33 species of medicinal and aromatic plants: A detailed, robust and comprehensive LC–MS/MS method validation. Ind Crops Prod 149: 112347.
63. Jakimiuk K, Tomczyk M (2024). A review of the traditional uses, phytochemistry, pharmacology, and clinical evidence for the use of the genus *Alchemilla* (Rosaceae). J Ethnopharmacol 320: 117439.

64. Uzunkaya Ç, Gökkaya İ, Akkaya D, Şoral M, Seyhan G, Barut B, Abdullah Yilmaz M, Renda G (2024). Phytochemical analysis and assessment of antioxidant and enzyme inhibitory activity of *Alchemilla pseudocartalinica* Juz. Chem Biodivers e202401217.
65. Genc Y, Guragac Dereli FT, Saracoglu I, Kupeli Akkol E (2020). The inhibitory effects of isolated constituents from *Plantago major* subsp. *major* L. on collagenase, elastase and hyaluronidase enzymes: Potential wound healer. SPJ 28(1): 101-106.
66. Shukla SK, Sharma AK, Gupta V, Yashavarddhan MH (2019). Pharmacological control of inflammation in wound healing. J Tissue Viability 28(4): 218-222.
67. Croft KD (1998). The chemistry and biological effects of flavonoids and phenolic acids. Ann N Y Acad Sci 854(1): 435-442
68. Sapko OA, Chebonenko OV, Utarbaeva AS, Amirkulova AZ, Tursunova AK (2016). Antioxidant activity of medicinal plants from southeastern Kazakhstan. Pharm Chem J 50: 603-607.
69. Shilpee J, Yadav A, Gothwal R (2021). Assessment of total phenolic, flavonoid content and in vitro antioxidant properties of *Alchemilla vulgaris* (Lady's mantle). J Adv Sci Res 12(4): 205–209.
70. Mandrone M, Coqueiro A, Poli F, Antognoni F, Choi YH (2018). Identification of a collagenase-inhibiting flavonoid from *Alchemilla vulgaris* using NMR-based metabolomics. Planta Med 84 (12–13): 941–946.
71. Filippova EI (2017). Antiviral activity of Lady's mantle (*Alchemilla vulgaris* L.) extracts against orthopoxviruses. Bull Exp Biol Med 163(3): 374-377
72. Grzesik M, Naparło K, Bartosz G, Sadowska-Bartos I (2018). Antioxidant properties of catechins: Comparison with other antioxidants. Food Chem 241: 480-492

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı : Mertcan ORTAHIŞAR
Uyruğu : Türk
Doğum Tarihi :
E-Posta :

EĞİTİM BİLGİLERİ

Derece	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mezuniyet
Yılı Lisans	Biruni Üniversitesi Eczacılık Fakültesi	2020
Lise	Hasan Sadri Yetmişbir Anadolu Lisesi	2014

AKADEMİK/MESLEKİ DENEYİMİ

Görevi	Kurum	Süre (Yıl -Yıl)
1. ECZACI	HAYAT ECZANESİ / SÜRMENE	2021-Halen
2. YARDIMCI ECZACI	SAĞLIK ECZANESİ / SÜRMENE	2020
3. STAJYER ECZACI	LEVENT ECZANE- OPTİK / LEVENT	2019

YABANCI DİL

İNGİLİZCE

BİLDİRİLER

1. Ortahisar M, Akkaya D, Seyhan G, Barut B, Yazıcı N (2024). The radical scavenging and cyclooxygenases inhibitory effects of *Alchemilla daghestanica* Juz. 14th International Symposium on Pharmaceutical Sciences.

