

**T.C.  
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
FARMAKOGNOZİ ANABİLİM DALI**

***ALCHEMILLA MOLLIS (BUSER) ROTHM. BİTKİSİ ÜZERİNDE  
FARMAKOGNOZİK ARAŞTIRMALAR***

**Hazırlayan  
Selen ERTÜRK**

**Danışman  
Prof.Dr. Müberra KOŞAR**

**Yüksek Lisans Tezi**

**Ocak 2013  
KAYSERİ**

**T.C.  
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
FARMAKOGNOZİ ANABİLİM DALI**

***ALCHEMILLA MOLLIS (BUSER) ROTHM. BİTKİSİ  
ÜZERİNDE FARMAKOGNOZİK ARAŞTIRMALAR***

**Hazırlayan  
Selen ERTÜRK**

**Danışman  
Prof.Dr. Müberra KOŞAR**

**Yüksek Lisans Tezi**

**Bu çalışma Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından  
TSY-11-3494 nolu proje ile desteklenmiştir.**

**Ocak 2013  
KAYSERİ**

## **BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK**

Bu çalışmadaki tüm bilgilerin, akademik ve etik kurallara uygun bir şekilde elde edildiğini beyan ederim. Aynı zamanda bu kural ve davranışların gerektirdiği gibi, bu çalışmanın özünde olmayan tüm materyal ve sonuçları tam olarak aktardığımı ve referans gösterdiğimi belirtirim.

**Adı-Soyadı: Selen ERTÜRK**

**İmza :**

## **YÖNERGEYE UYGUNLUK ONAYI**

**“*Alchemilla mollis* (Buser) Rothm. Bitkisi Üzerinde Farmakognozik Araştırmalar”**  
adlı **Yüksek Lisans** Tezi, Erciyes Üniversitesi Lisansüstü Tez Önerisi ve Tez Yazma  
Yönergesi’ne uygun olarak hazırlanmıştır.

**Hazırlayan**  
**Selen ERTÜRK**

**Danışman**  
**Prof.Dr. Müberra KOŞAR**

**Anabilim Dalı Başkanı**  
**Prof.Dr. Müberra KOŞAR**

Prof.Dr.Müberra KOŞAR danışmanlığında Selen ERTÜRK tarafından hazırlanan “*Alchemilla mollis* (Buser) Rothm. Bitkisi Üzerinde Farmakognozik Araştırmalar” konulu çalışma jürimiz tarafından Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Eczacılık Farmakognozi Anabilim Dalı’nda Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

11 / 01 / 2013

## JÜRİ

İmza

Danışman : Prof. Dr. Müberra KOŞAR (Farmakognozi ABD)

Üye : Doç.Dr. Ayhan ALTINTAŞ (Farmakognozi ABD)

Üye : Yrd. Doç. Dr. Perihan GÜRBÜZ (Farmakognozi ABD)

## ONAY

Bu tezin kabulü Enstitü Yönetim Kurulunun .....tarih ve.....sayılı kararı ile onaylanmıştır.

...../...../.....

Prof.Dr. Saim ÖZDAMAR  
Enstitü Müdürü

## TEŞEKKÜR

Tez çalışmalarım sırasında bana değerli bilgilerini aktarıp, maddi ve manevi her türlü destek olan tez danışmanım Prof.Dr. Müberra KOŞAR'a,

Botanik çalışmalarımda bana değerli vaktini ayırıp yardımcı olan ve desteğini her zaman arkamda hissettiğim hocam Öğr.Gör.Dr. Ayşe Baldemir'e,

Hücre kültürü çalışmalarında bana yardımcı olan hocam Yrd.Doç.Dr. Perihan Gürbüz'e ve Doç.Dr. M. Betül Aycan'a,

Çalışmalarım sırasında özellikle manevi olarak yanımda olan, laboratuvar çalışmalarımda benden yardımlarını esirgemeyen çalışma arkadaşlarım Arş.Gör. Ecz. Gökçe Şeker Karatoprak, Arş.Gör. Ecz. Çiğdem Yücel'e ve Arş.Gör. Berrak Altınsoy'a,

Bu süreçte hep yanımda olan arkadaşım Zehra Avanoğlu'na,

Her zaman yanımda olan maddi ve manevi her türlü yardımlarını benden esirgemeyen anneme, babama, kardeşime ve eşime,

Sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

**ALCHEMILLA MOLLIS (BUSER) ROTHM. BİTKİSİ ÜZERİNDE****FARMAKOGNOZİK ARAŞTIRMALAR****Selen ERTÜRK****Erciyes Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü****Farmakognozi Anabilim Dalı Yüksek Lisans Programı****Yüksek Lisans Tezi, Ocak 2013****Danışman: Prof.Dr. Müberra KOŞAR****ÖZET**

Bu tez kapsamında Rosaceae familyasına dahil olan *Alchemilla mollis* (Buser) Rothm. bitkisinin toprak üstü kısımlarından elde edilen farklı polaritelerdeki ekstralarının antioksidan aktiviteleri ve kimyasal bileşimleri incelenmiştir. Soxhlet ekstraksiyonu ile hekzan, etilasetat, metanol ve butanol ekstraları geri çeviren soğutucuda su ekstresi, çalkalayıcı su banyosunda 3 gün boyunca % 70'lik metanolla muamele edilerek %70'lik metanol ekstresi hazırlandı. Ekstrelerin antioksidan aktivitelerinin belirlenmesi amacıyla 1,1-difenil-2-pikrihidrazil (DPPH<sup>•</sup>) radikali ve 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonik asit) (ABTS<sup>+•</sup>) radikali süpürücü etkileri,  $\beta$ -karoten-linoleik asit birlikte oksidasyonu ve lipid peroksidasyonunu inhibe edici etkileri incelenmiştir. Ekstrelerin indirgenme kapasiteleri ile spektrofotometrik (toplam fenol, toplam flavonoit, toplam flavonol) ve kromatografik (YBSK) olarak kompozisyonları da belirlenmiştir. Bitkinin toplam ve asitte erimeyen kül miktar tayini ile su miktar tayini yapılmıştır. Anatomik çalışmalarda yaprağın kısımlarından yüzeysel ve enine kesitler, pedisel ve gövdeden ise enine kesitler alınarak incelenmiş; ışık ve elektron mikroskobu ile fotoğrafları çekilmiştir. Ayrıca bu türün çiçek morfolojisi de detaylı bir şekilde çalışılmıştır.

**Anahtar Kelimeler:** *Alchemilla mollis*, Antioksidan aktivite, YBSK, Anatomi, Çiçek morfolojisi.

**PHARMAKOGNOSIC RESEARCHS ON *ALCHEMILLA MOLLIS* (BUSER) ROTHM.****Selen ERTÜRK****Erciyes University, Graduate Institute of Health Science****Department of Pharmacognosy****MS Thesis, January 2013****Advisor: Prof.Dr. Müberra KOŞAR****ABSTRACT**

The antioxidant activity and chemical composition of *Alchemilla mollis* (Buser) Rothm. belongs to the family Rosaceae were investigated. Hexane, ethyl acetate, methanol and butanol extracts were prepared by Soxhlet extraction. In addition, water extracts were prepared with reflux and %70 methanol extract were prepared by three days maceration and than analysed. Antioxidant activity of the extracts were determined using 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH<sup>•</sup>) and 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6- sulphonic acid) (ABTS<sup>+•</sup>) radical scavenging activity,  $\beta$ -carotene-linoleic acid co-oxidation assay and lipid peroxidation assay. In addition, the reduction power and chemical composition of extracts were analysed by spectrophotometric (total phenol, total flavonoids, total flavonols) and chromatographic (HPLC) techniques. The total and insoluble hydrochloric acid ash values and water amount of plant. In anatomical studies, microscopic views of the sections from the leaves (transverse and surface), pedicel and stem (transverse) of this species were examined and photographed by light microscopy (LM) and scanning electron microscopy (SEM). In addition, flower morphology of this species has been examined and described in detail.

**Keywords:** *Alchemilla mollis*, Antioxidant activities, HPLC, Anatomy, Flower morphology.

## İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa no</u>
İÇ KAPAK .....	i
BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK SAYFASI .....	ii
YÖNERGEYE UYGUNLUK SAYFASI .....	iii
KABUL VE ONAY SAYFASI.....	iv
TEŞEKKÜR .....	v
ÖZET .....	vi
ABSTRACT .....	vii
İÇİNDEKİLER.....	viii
KISALTMALAR.....	xii
TABLO VE ŞEKİL LİSTESİ.....	xiv
1.GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2.GENEL BİLGİLER .....	4
2.1. BOTANİK BİLGİLER.....	4
2.1.1. Rosaceae familyasının Dünya’da Yayılışı ve Önemi .....	4
2.1.2. <i>Alchemilla</i> L. Cinsinin Bitki Sistematiğindeki Yeri.....	4
2.1.3. Rosaceae Familyasının Genel Özellikleri.....	5
2.1.3.1. Türkiye ve Doğu Ege Adaları Florası’nda Yer Alan Rosaceae. Familyasının Cins ve Tayin Anahtarı .....	5
2.1.4. <i>Alchemilla</i> L. Cinsinin Dünya’da Yayılışı.....	5
2.1.5. <i>Alchemilla</i> L. Cinsinin Genel Özellikleri .....	6
2.1.5.1. <i>Alchemilla</i> L. Cinsinin Türkiye ve Doğu Ege Adaları Florası’nda yer alan Grup Tayin Anahtarı .....	7
2.1.6. <i>Alchemilla mollis</i> (Buser) Rothm.....	13
2.2. FARMAKOPELERDE KAYITLI OLAN <i>ALCHEMILLA</i> TÜRLERİ .....	14
2.3. <i>ALCHEMILLA</i> TÜRLERİNİN KULLANIMI .....	14
2.3.1. <i>Alchemilla</i> Türlerinin Türkiye’de Etnofarmakognozideki Yeri .....	15
2.3.2. <i>Alchemilla</i> Türlerinin Dünya Genelinde Etnofarmakognozideki Yeri .....	16
2.4. <i>ALCHEMILLA</i> TÜRLERİNİN KİMYASAL BİLEŞENLERİ.....	17
2.4.1. <i>Alchemilla</i> Türlerinde Bulunan Fenolik Asitler .....	17
2.4.2. <i>Alchemilla</i> Türlerinde Bulunan Polifenoller .....	18
2.4.3. <i>Alchemilla</i> Türlerinin Uçucu Yağ Profili.....	19
2.4.5. <i>Alchemilla</i> Türlerinde Bulunan Triterpenler .....	20

	<u>Sayfa no</u>
2.4.6. <i>Alchemilla</i> Türlerinin İnorganik Madde İçeriği .....	21
2.4.7. <i>Alchemilla</i> Türlerinde Bulunan Diğer Maddeler... ..	21
2.5. <i>ALCHEMILLA</i> TÜRLERİ ÜZERİNDE YAPILAN BİYOAKTİVİTE	
ÇALIŞMALARI .....	21
2.6. ANTİOKSİDANLAR .....	25
2.6.1. Oksijen ve Önemi.....	26
2.6.2. Serbest Radikaller .....	26
2.6.2.1. Oksijen Türevi Serbest Radikaller .....	27
2.6.2.1.1. Süperoksit Anyon Radikali .....	27
2.6.2.1.2. Hidroksil Radikali.....	28
2.6.2.2. Oksijen Türevi Serbest Olmayan Radikaller .....	29
2.6.2.2.1. Hidrojen Peroksit .....	29
2.6.2.2.2. Singlet O <sub>2</sub> .....	30
2.6.2.3. Oksijen Türevi Olmayan Reaktif Azot Türleri.....	30
2.6.2.3.1. Nitrojen oksit .....	30
2.6.2.3.2. Peroksinitrit .....	31
2.6.3. Oksidatif Stres .....	31
2.6.4. Lipit Peroksidasyon .....	32
2.6.4.1. Lipit Peroksidasyonunun Mekanizması .....	32
2.6.5. Antioksidanlar ve Savunma Mekanizmaları .....	33
2.6.5.1. Enzimatik Olan Koruyucu Sistemler .....	35
2.6.5.2. Enzimatik Olmayan Koruyucu Sistemler.....	36
3. GEREÇ VE YÖNTEM .....	39
3.1. ÇALIŞMALARDA KULLANILAN MATERYAL VE	
KİMYASAL MADDELER.....	39
3.1.1. Bitkisel Materyal .....	39
3.1.2. Kimyasal Maddeler .....	39
3.1.3. Kullanılan Aletler.....	40
3.2. ANATOMİK VE MORFOLOJİK ÇALIŞMALAR .....	41
3.3. DENEYSEL ÇALIŞMA .....	41
3.3.1. Ekstrelerin Hazırlanışı .....	41
3.3.2. Kompozisyon Analizleri.....	42
3.3.2.1. Toplam Fenol Miktar Tayini .....	42
3.3.2.2. Toplam Flavonoit Miktar Tayini .....	42
3.3.2.3. Toplam Flavonol Miktar Tayini .....	42
3.3.2.4. Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi ile Analiz .....	43

	<u>Sayfa no</u>
3.3.3. Farmakope Analizleri .....	44
3.3.3.1. Toplam Kül ve Asitte Erimeyen Kül Miktar Tayini .....	44
3.3.3.2. Volümetrik Yöntemle Su Miktar Tayini .....	45
3.3.4. Antioksidan Aktivite Çalışmaları.....	45
3.2.4.1. İndirgenme Gücünün Belirlenmesi .....	45
3.3.4.2. 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH <sup>•</sup> ) Radikalini Süpürücü Etki Tayini .....	45
3.3.4.3. $\beta$ -karoten / linoleik asit Birlikte Oksidasyonu İnhibe Edici Etki tayini.....	46
3.3.4.5. 2,2'- azino-bis (3-etilbenzotiazolin-6- sulfonik asit) (ABTS <sup>•+</sup> ) Radikalinin Süpürücü Etki Tayini.....	46
3.3.4.6. Askorbat –Fe (III)-Katalizli Fosfolipit Peroksidasyonunun İnhibisyonu .....	47
3.3.5. Hücre Kültürü Çalışmaları.....	47
3.2.5.1. MCF-7 Hücrelerinin Kültüre Edilmesi .....	47
3.2.5.2. MCF-7 Hücrelerinin Pasajı .....	47
3.2.5.3. Hücre Dondurma ve Saklama .....	48
3.2.5.4. Fetal Calf Sera'nın İnaktivasyonu .....	48
3.2.5.5. Sitotoksik Etkinin Tetrazolyum Tuzu (MTT) Kolorimetrik Gelişme İnhibisyonu Testi ile Belirlenmesi .....	48
4. BULGULAR .....	50
4.1. ANATOMİK VE MORFOLOJİK BULGULAR .....	50
4.1.1. <i>Alchemilla mollis</i> Türünün Çiçek Morfolojisi.....	50
4.1.2. <i>Alchemilla mollis</i> Türünün Yaprak Anatomisi.....	53
4.1.2.1. Yaprak Ayası .....	53
4.1.2.2. Yaprak Orta Damarının Enine Kesiti .....	54
4.1.2.3. Yaprak Üst ve Alt Epiderması.....	55
4.1.2.4. Petiyol Enine Kesiti .....	59
4.1.3. <i>Alchemilla mollis</i> Türünün Gövde Anatomisi.....	60
4.1.3.1. Gövde Enine Kesiti .....	60
4.2. EKSTRELERİN HAZIRLANIŞI, SPEKTROFOTOMETRİK VE KROMATOGRFİK BİLEŞİM ANALİZLERİ .....	65
4.2.1. Ekstrelerin Hazırlanışı .....	65
4.2.2. Toplam Fenol, Flavonoit ve Flavonol Miktar Tayini .....	65
4.2.3. Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografisi Analizi .....	66
4.3. FARMAKOPE ANALİZLERİ.....	70

	<u>Sayfa no</u>
4.3.1. Toplam Kül ve Asitte Erimeyen Kül Miktar Tayini.....	70
4.3.2. Volümetrik Su Miktar Tayini.....	70
4.4. ANTİOKSİDAN AKTİVİTE ÇALIŞMALARI.....	70
4.4.1. İndirgeme Gücünün Belirlenmesi.....	70
4.4.2. 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH <sup>•</sup> ) Radikalini Süpürücü Etki Tayini.....	71
4.4.3. $\beta$ -Karoten/Linoleik Birlikte Asit Oksidasyonunu İnhibe Edici Etki Tayini.....	72
4.4.4. 2,2'- azino-bis (3-etilbenzotiazolin-6- sulfonik asit)) (ABTS <sup>+•</sup> ) Radikalinin Süpürücü Etki Tayini.....	73
4.4.5. Askorbat –Fe (III)-Katalizli Fosfolipit Peroksidasyonunun İnhibisyonu .....	74
4.5. SİTOTOKSİK ETKİNİN TETRAZOLYUM TUZU (MTT) KOLORİMETRİK GELİŞME İNHİBİSYONU TESTİ İLE BELİRLENMESİ.....	75
5. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	77
5.1. MORFOLOJİK VE ANATOMİK ÇALIŞMALAR .....	77
5.2. SPEKTROSKOPİK VE KROMATOĞRAFİK BİLEŞİM ANALİZLERİ VE ANTİOKSİDAN AKTİVİTE ANALİZLERİ .....	79
6. KAYNAKLAR .....	85
ÖZGEÇMİŞ	

### KISALTMALAR

%AA	Yüzde antioksidan aktivite
2-NF	2-Nitrofluorene
Abs	Absorbans
ABTS <sup>•+</sup>	2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6- sulfonik asit)
AscAE	Askorbik asite eşdeğer miktar
BHA	Bütillenmiş Hidroksi Anisol
BHT	Bütillenmiş Hidroksi Toluen
BP	İngiliz Farmakopesi
CAT	Katalaz
DMSO	Dimetilsülfoksit
DNA	Deoksiribonükleik asit
DPPH <sup>•</sup>	1,1-difenil-2-pikrihidrazil radikali
EP	Avrupa Farmakopesi
FAD	Flavin Adenin Dinükleotit
FCS	Fetal Calf Sera
FMN	Flavin monofikleotit
GAE :	Gallik asite eşdeğer miktar
GC/FID	Gas Kromatografisi /Alev iyon dedektörü
GC-MS	Gas Kromatografisi–Kütle spektroskopisi
GSH-Px	Glutasyon Peroksidaz
HLE	İnsan Lökosit Elastaz
IC <sub>50</sub>	Yüzde ellisini inhibe eden konsantrasyon
İTK	İnce Tabaka Kromatografisi
L	litre

LDL	Düşük Yoğunluklu Lipoproteinler
MCF-7	İnsan meme kanser hücresi
mg	Miligram
mL	Mililitre
MTT	3-(4,5dimetiltiazol-2yl)-2,5-difeniltetrazolyumbromit
NADH	Nikotinamid Adenin Dinükleotit
O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	Süperoksit radikali
PBS	Phosfat Buffer Saline
PC	Fosfodilkolin Liposom Model Sistemi
PPE	Porsin pankreatik elastaz
RE	Rutine eşdeğer
RNS	Reaktif Azot Türleri
ROS	Reaktif Oksijen Türleri
SDH	Süksinat dehidrogenaz
SOD	Süperoksit Dismutaz
TAUM	Teknoloji Araştırma ve Uygulama Merkezi
TEAC	Troloks' a eşdeğer
WHO	Dünya Sağlık Teşkilatı
YBSK	Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi
µg	Mikrogram
µL	Mikrolitre

## TABLO VE ŞEKİL LİSTESİ

	<u>Sayfa No</u>
<b>Tablo 2.1:</b> Türkiye’de yayılış gösteren <i>Alchemilla</i> türleri.....	9
<b>Tablo 2.2:</b> <i>Alchemilla</i> türlerinden izole edilen flavonoit glikozitleri .....	19
<b>Tablo 2.3:</b> Reaktif oksijen türleri .....	30
<b>Tablo 2.4:</b> Reaktif Nitrojen Türleri .....	31
<b>Tablo 2.5:</b> Oksidatif strese neden olan faktörler.....	32
<b>Tablo 2.6:</b> Antioksidan savunma sistemi elemanları .....	35
<b>Tablo 4.1:</b> Ekstre verimleri, toplam fenol, toplam flavonoit ve toplam flavonol miktarları.....	66
<b>Tablo 4.2:</b> <i>Alchemilla mollis</i> ekstrelerinin YBSK sonuçları .....	67
<b>Tablo 4.3:</b> Standartlara ait kalibrasyon denklemleri ve korelasyon katsayıları .....	67
<b>Şekil 1.1:</b> <i>Alchemilla mollis</i> (Buser ) Rothm. ....	3
<b>Şekil 2.1:</b> <i>Alchemilla mollis</i> türünün habitatu .....	13
<b>Şekil 2.2:</b> <i>Alchemilla mollis</i> yapraklarının yağmur sonrası görüntüsü .....	14
<b>Şekil 2.3:</b> Oksijenin suya indirgenmesi .....	26
<b>Şekil 2.4:</b> Haber-Weiss reaksiyonu .....	28
<b>Şekil 2.5:</b> Su molekülünden hidrojen radikali ve hidroksil radikali oluşumu.....	28
<b>Şekil 2.6:</b> Hidroksil radikali ile H çıkartılması ve lipid peroksidasyonunun başlaması.....	29
<b>Şekil 2.7:</b> Süperoksit anyonunun dismutasyonu.....	29
<b>Şekil 3.1:</b> <i>Alchemilla.mollis</i> ’in herbaryum örneği.....	40
<b>Şekil 3.2:</b> MTT boyasının formazana dönüşümü .....	49
<b>Şekil.4.1:</b> <i>A. mollis</i> çiçeğinin <b>A)</b> mikroskopik görüntüsü <b>B)</b> elektron mikroskobu ile hipantiyumun görüntüsü.....	51
<b>Şekil 4.2:</b> <b>A)</b> Epikaliks ve kaliksin üstten görünüşü <b>B)</b> Epikaliks ve kaliksin yandan görünüşü.....	51
<b>Şekil 4.3:</b> <i>A. mollis</i> çiçeğinde kalikste druz kristalleri.....	52
<b>Şekil 4.4:</b> <i>A. mollis</i> çiçeğinde <b>A)</b> stamenlerin mikroskopik görüntüsü <b>B)</b> kapitat stigmanın mikroskopik görüntüsü .....	52
<b>Şekil 4.5:</b> <i>A. mollis</i> çiçeğinin elektron mikroskobu ile stamenlerinin görüntülenmesi .....	53
<b>Şekil.4.6:</b> Yaprak ayası şematik kesiti.....	53
<b>Şekil 4.7:</b> <i>A. mollis</i> yaprak ayası enine kesiti .....	54
<b>Şekil 4.8:</b> <i>A. mollis</i> yaprak ayası enine kesiti .....	54
<b>Şekil 4.9:</b> <i>A. mollis</i> orta damar enine kesit.....	55
<b>Şekil 4.10:</b> Yaprak orta damarı enine kesitte merkezi iletim demetleri.....	55
<b>Şekil 4.11:</b> Druz kristalleri <b>A)</b> Parenkima hücreleri üzerinde <b>B)</b> Alt epiderma orta damarda.....	56
<b>Şekil 4.12:</b> Üst epidermada Ranunculacea tipi stoma ve komşu hücreleri.....	56
<b>Şekil 4.13:</b> Yaprakta örtü tüyü ve salgı tüyleri .....	57
<b>Şekil 4.14:</b> Yaprak üst ve alt epidermasında salgı tüylerinin mikroskopik görüntüsü.....	57

**Sayfa no**

<b>Şekil 4.15:</b>	A) Alt epidermada örtü tüyleri B) Üst epidermada örtü tüyleri C) Örtü tüyünün taban hücreleri .....	58
<b>Şekil 4.16:</b>	Yaprakta stomaların görünümü A) Üst epidermada B, C) Alt epiderma stomaların .....	58
<b>Şekil 4.17:</b>	Yaprak enine kesitte stomanın yan yüzeyden görünüşü (s: stoma).....	59
<b>Şekil 4.18:</b>	Petiol enine kesitte şematik görünüm .....	59
<b>Şekil 4.19:</b>	Petiyolde iletim demetlerinin görünüşü .....	60
<b>Şekil 4.20:</b>	Petiyol enine kesitte gözlenen basit billur kristalleri.....	60
<b>Şekil 4.21:</b>	Gövde şematik görünüm .....	61
<b>Şekil 4.22:</b>	Gövdenin kısımları .....	61
<b>Şekil 4.23:</b>	Gövde enine kesitte selülozik parenkima hücreleri.....	62
<b>Şekil 4.24:</b>	Gövdede örtü tüyleri .....	62
<b>Şekil 4.25:</b>	Gövdeden alınan enine kesitlerde salgı tüylerinin görünüşü .....	63
<b>Şekil 4.26:</b>	A) Gövde parenkimasında druz kristali B) gövde öz bölgesinde druz kristali.....	63
<b>Şekil 4.27:</b>	Kuru drogtan alınan kesitlerde tanen hücreleri .....	64
<b>Şekil 4.28:</b>	Gövde enine kesitte stoma hücresi .....	64
<b>Şekil 4.29:</b>	<i>Alchemilla mollis</i> örnek ekstrelerine ve standartlara ait YBSK kromatogramları.....	68
<b>Şekil 4.30:</b>	<i>Alchemilla mollis</i> 'in bileşimindeki maddelerin kimyasal formülleri .....	69
<b>Şekil 4.31:</b>	<i>A. mollis</i> ekstrelerinin ve standartların demir(III)'ü demir(II)'ye indirgeme Kapasiteleri .....	71
<b>Şekil.4.32:</b>	<i>Alchemilla mollis</i> ekstrelerinin DPPH• radikali süpürücü etkileri.....	72
<b>Şekil 4.33:</b>	<i>A. mollis</i> ekstre ve standartların $\beta$ -karoten-linoleik asit peroksidasyonuna etkileri .....	73
<b>Şekil 4.34:</b>	<i>Alchemilla mollis</i> ekstrelerinin ABTS•+ radikali süpürücü etkileri.....	74
<b>Şekil 4.35 :</b>	<i>Alchemilla mollis</i> ekstrelerinin fosfolipit peroksidasyonunu inhibisyonu .....	75
<b>Şekil 4.36:</b>	<i>Alchemilla mollis</i> ekstrelerinin sitotoksosite sonuçları .....	76
<b>Şekil 5.1:</b>	DPPH• radikali ile antioksidan arasındaki reaksiyon .....	81

## 1. GİRİŞ VE AMAÇ

Türkiye, florasındaki yaklaşık 11.000 bitki türü ile dünyanın en zengin floraya sahip ülkelerindedir (1, 2). Ülkemiz florasının zenginliğinin temelinde, değişik iklim tiplerinin varlığı, coğrafik durumu, jeolojik yapısı, topoğrafik özellikleri, çeşitli toprak gruplarına sahip olması ve üç değişik fitocoğrafik (Avrupa-Sibirya, İran-Turan ve Akdeniz bitki coğrafyası) bölgenin birleştiği yerde bulunması sayılabilir (1).

Ülkemizde *Alchemilla* L. cinsi, otsu ve odunsu bitkilerin bulunduğu dikotiledonların büyük ve önemli bir familyası olan Rosaceae familyasına dahildir (1). Taksonomik açıdan oldukça kritik ve zor bir grup olan *Alchemilla* cinsi başlıca holoartrik bölgede yayılış göstermektedir ve 1000'den fazla türden meydana gelmektedir. Türkiye Florası'nda 50 tür ile temsil edilen bu cinsin tür sayısı son yıllarda sürdürülen geniş kapsamlı çalışmalar ile 78'e ulaşmıştır. Bunların birçoğu özellikle Türkiye'nin Kuzeydoğu Anadolu bölgesinde yayılış göstermektedir (3).

Dünya Sağlık Teşkilatı (WHO) 91 ülkenin farmokopelerine ve tıbbi bitkileri üzerine yapılmış olan bazı yayınlarına dayanarak hazırladığı bir raporda kullanılan tıbbi bitkilerin toplam miktarının 20.000 civarında olduğunu tespit etmiştir. Tüm dünya ülkelerinde olduğu gibi, Türkiye'de de tıbbi açıdan önemli olan bitkiler, yüzyıllardan beri halk arasında hastalıkların tedavisi amacıyla kullanılmaktadır (4). Ülkemizde bulunan bitki türlerinin yaklaşık 1000 kadarı tıbbi özellikleri nedeniyle kullanılmaktadır (5).

*Alchemilla* türleri Avrupa’da tıbbi amaçlarla çeşitli şekillerde kullanılırken ülkemizde halk arasında pek tanınmayan ancak Anadolu’da yetişen bitki türleridir. “Yıldız nişanı” veya “Fındık otu” olarak bilinen *A. pseudocartalinica* Juz. yaprakları ile “Aslan ayağı” olarak bilinen *A. arvensis* (L.) Scop. kök ve yaprakları kabız etkili, kuvvet verici ve idrar artırıcı olarak kullanılmaktadır (5). Yine Avrupa’nın birçok bölgesinde sıklıkla yetişen *A. vulgaris* L. bitkisi toprak üstü kısımlarının halk arasında diüretik, astrenjan, antispazmodik, yara iyileştirici, konvulsif hastalıkların tedavisinde ve aşırı menstrasyonda kür olarak kullanımı olduğu kaydedilmiştir (6).

Son yıllarda giderek artan kanser ve kalp hastalıklarının da içinde bulunduğu kronik hastalıklara yakalanma riskini azaltan bileşikler olarak sıklıkla adından bahsedilen antioksidanlar, sağlığımızın korunması için faydalı maddelerdir. Bitkiler flavonoidler, antosiyaninler, vitaminler ve endojen metabolitler gibi çok çeşitli fenolik nüveye sahip ve antioksidan özellikleri olan maddeleri içerirler (7). *Alchemilla* L. türleri üzerine yapılan aktivite çalışmaları özellikle Avrupa’da yaygın olarak yetişen ve “Lady’s Mantle” adıyla bilinen *A. vulgaris* üzerine yoğunlaşmıştır. Bitkinin sahip olduğu farmakolojik özelliklerinin başlıca içerdiği polifenollerden kaynaklandığı belirtilmiştir. Bu bitki, tanenleri (elajik ve gallik asit) ve flavonoidleri (kersetin, luteolin ve proantosiyanidinler) içerir (8). Astrenjan ve antienflamatuvar özellikleri iyi bilinen *A. xanthochlora* Rothm. türünün polifenolik bileşimi ayrıntılı bir şekilde araştırılmış ve bitkinin yüksek oranda kondense tanenleri içerdiği saptanmıştır (9).

*Alchemilla* türlerinin Türkiye’de genel olarak halk arasında tıbbi amaçlı kullanımına rastlanmamıştır. Bunun yanı sıra ülkemizde yaygın bir şekilde yayılış gösteren bu cinsin türleri üzerine yapılan taksonomik çalışmalar halen devam ederken Türkiye’de yayılış gösteren bazı yaygın türlerin antioksidan aktiviteleri ve kompozisyon analizlerinin yapıldığı da bilinmektedir (3). *A. mollis* bitkisi ise genellikle Türkiye’nin Kuzey Anadolu Bölgesi’nde yayılış gösteren alpin bir bitki olup, halk arasında kullanımı ile ilgili önemli bir bilgiye rastlanmamıştır. Flavonoid bileşiklerinin tayin edildiği bir çalışmada *A. mollis*’in kersitrin, viteksin, rutin, orientin ve izokersetin gibi bileşiklere sahip olduğu yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (YBSK) ve ince tabaka kromatografisi (İTK) ile tespit edilmiştir (1).

Bu tez kapsamında biyolojik aktiviteleri ve fenolik bileşimi bakımından incelenecek olan *Alchemilla mollis* (Buser) Rothm. bitkisi Bulgaristan’da yetişen ve Bulgaristan

Kırmızı Kitab’ında korunan türler listesinde yer alan bir türdür (Şekil 1.1) (10). Bitkinin metanol ekstrelerinin yüksek oranda DPPH• radikalini süpürücü etkiye sahip olduğu belirtilmiş ve bu aktiviteden sorumlu bileşiklerinin bir kısmı literatürde verilmiştir (11).

Bu tezin amacı *A. mollis* bitkisinin antioksidan aktiviteleri ve fenolik bileşimi bakımından incelenmesidir. Bu amaçla farklı polaritelerde hazırlanan ekstreler *in vitro* aktivite testlerinden 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH•) radikal süpürücü etki, 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolin-6- sulfonik asit) (ABTS +•) radikal süpürücü etki,  $\beta$ -karoten-linoleik asit birlikte peroksidasyonu engelleyici etki ve Askorbat-Fe (III)-katalizli fosfolipit peroksidasyonunu engelleyici etki testleri yapılmış ve ekstrelerin indirgenme gücü belirlenmiştir. Ayrıca ekstrelerin antioksidan aktiviteden sorumlu olabilecek fenolik bileşikleri hem spektrofotometrik hem de kromatografik yöntemlerle incelenmiştir. Ayrıca *Alchemilla* türlerinden *A. xanthochlora* Rothm. Türkiye'nin de resmi farmakopesi olan Avrupa Farmakopesi'nde (EP) yer almaktadır. Bu nedenle çalışılan *A. mollis* türü farmakope monografında yer alan kalite kontrol yöntemlerinden mikroskopik analizleri, nem miktar tayini, toplam ve asitte erimeyen kül miktarı bakımından incelenerek farmakope standartlarıyla karşılaştırılmıştır. Bitkinin yaprak ve gövde ve pedisel anatomisi karakteristik özellikleri incelenmiş, hem ışık hem de elektron mikroskobu ile görüntülenmiştir. Ayrıca çiçek elemanları da detaylı olarak incelenmiş ve fotoğraflanmıştır.



**Şekil 1.1:** *Alchemilla mollis* (Buser ) Rothm. (12)

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. BOTANİK BİLGİLER

#### 2.1.1 Rosaceae familyasının Dünya’da Yayılışı ve Önemi

Rosaceae familyası bitkiler aleminde 19. büyük familya olarak yer almaktadır. 100 kadar cins ve 2830-3100 kadar türe sahiptir (13). Bu familyanın bitkileri bütün dünyada yetişen Kuzey yarımkürede yayılış gösterenleri iyi gelişmiş bitkilerdir. Genellikle ağaç, çalı ve otsu formda bulunurlar. Avrupa’da 60 kadar yerli ağaç vardır. Meyvelerinin (elma, armut, kiraz, erik kayısı, çilek) ekonomik değeri yüksektir; kesme çiçek olarak ta önemli bitkileri kapsamaktadır (14).

#### 2.1.2. *Alchemilla* L. Cinsinin Bitki Sistematiğindeki Yeri

**Bölüm:** Spermatophyta

**Alt Bölüm:** Angiospermae

**Sınıf:** Dicotyledonae

**Takım:** Rosales

**Familya:** Rosaceae

**Alt Familya:** Rosoideae

**Cins:** *Alchemilla* L.

**Tür:** *Alchemilla mollis* (Buser) Rothm. (15).

### 2.1.3. Rosaceae Familyasının Genel Özellikleri

Rosaceae familyası bitkileri otsu ya da odunsu bazen de dikenli olabilirler. Yaprakları alternan, genellikle stipulalı kenarları sıklıkla dişli basit veya birleşiktir. Çiçek durumu ağaç ve çalılarda genellikle kısa sürgünler üzerindedir; başak, salkım, panikula veya korimbus şeklinde gruplaşmıştır. Çiçek tablası genellikle çukurlaşmış bir kupa şeklini almıştır (hipantiyum), buraya karpeller yerleşmiştir. Çiçekler hermafrodit veya tek eşeyli aktinomorf, perigin veya epigindir. Kaliks 4-5 parçalı serbest; epikaliks mevcut ya da değildir. Koralla 4-5 parçalı ve serbest; ender olarak kaybolabilir. Stamen 1 ya da daha fazla sayıdadır. Ovaryum alt durumludan üst durumluya kadar olabilir, 1 ya da daha fazla karpellidir. Karpeller genelde serbest; stilus terminal, lateral, veya ginobaziktir. Meyve etli veya kuru aken, nuks drupa ya da folikül tipindedir. Çoğunlukla agregat meyve taşırlar. Tohumlarda endosperma yoktur (15,16).

Rosaceae familyası dört alt familyaya ayrılmıştır.

A) Rosoideae

B) Amygdaloideae

C) Maloideae

D) Spiraeoideae

*Alchemilla* cinsi Rosoideae alt familyasına dahildir (15).

#### 2.1.3.1. Türkiye ve Doğu Ege Adaları Florası 'nda Yer Alan Rosaceae Familyasının Cins Tayin Anahtarı

1.Yapraklar basit, bazen derin loblara ayrılmış veya parçalı

2.tek yıllık ya da çok yıllık bitkiler; çiçekleri apetal; epikaliks mevcut

3.Stamen 1(-2);küçük tekyıllık sık yapraklarla karşılıklı simoz

22. *Aphanes*

3.Stamen 4(-10); çok yıllık. Simoz, korimboz ve panikulalı

21.*Alchemilla*

#### 2.1.4. *Alchemilla* L. Cinsinin Dünya'da Yayılışı

Dünya'da *Alchemilla* cinsinin yaklaşık 1000 türü yetişmektedir. *Alchemilla* cinsi taksonomik hiyerarşi içerisinde Avrupa ve Asya'da geniş bir yayılışa sahiptir. Doğu Afrika'da, Kuzey Amerika'da ve Avustralya'da da dağılımının olduğu belirtilmiştir (1). *Alchemilla* cinsi Irak florasında 2 tür, İran florasında 31 tür, Rus florasında 151 tür,

Kafkas florasında 36 tür, Bulgaristan florasında içerisinde *Alchemilla mollis*'in de bulunduğu 35 tür, Lübnan ve Suriye florasında 4 tür, Filistin ve Sina yarımadası florasında 2 tür, Balkan yarımadası florasında 12 tür, Yunanistan florasında 5 tür ile temsil edilmektedir ( 17-25).

Türkiye'deki *Alchemilla* türlerinin hepsi *Alchemilla* seksiyonuna aittir. Bu seksiyon 3 subseksiyon (*Chirophyllum* Rothm., *Heliodrosium* Rothm.ve *Calycanthum* Rothm.) ve 6 seriye (*Saxatiles* Bus., *Sericeae* Bus., *Pubescentes* Bus., *Vulgares* Bus., *Elatae* Rothm. ve *Calycinae* Bus.) ayrılmıştır (1). *Alchemilla mollis* *Calycanthum* Rothm.) altseksiyonuna ve *Elatae* Rothm. serisine aittir (15, 26).

### 2.1.5. *Alchemilla* L. Cinsinin Genel Özellikleri

*Alchemilla* L. cinsi odunsu bir rizoma sahip çok yıllık bitkilerdir. Yaprakları palmat veya palmatilobattır. Çiçek durumu birleşik kimözdür. Çiçek halkaları 4-5 parçalıdır. Hipantiyum testi şeklinde; urseolattır. Epikaliks mevcuttur, koralla yoktur. Stamenler 4-5 adet olup dişi organın üzerini örten diskin dış kenarına bağlanmış durumdadır. Dişi organ tek bir aken meyve meydana getirir. Olgun meyve kısmen veya tamamen hipantiyumun içerisinde gömülüdür.

Bu cinsin türlerinin birçoğu Avrupa'da yaygın olarak apomiktik (tohum kullanılarak çoğaltma) olarak üremektedir; polen tamamıyla verimsiz olabilir ve tohum çiçeklerde vaktinden erkenden gelişebilir.

Floradaki tayin anahtarı iyi yetişmiş olan bitki örneklerinin çiçek durumu ve taban yapraklarının durumuna göre hazırlanmıştır. Geç mevsimde büyüyen ya da otlatma ve biçme işlemi sonucundaki ikinci büyümede yaprak şekli ve tüy yapısı önemli derecede fark eder ve sıklıkla tanımlanamaz. Nitelikli olduğu sürece yaprak için olgun taban yapraklarına, sinüs için ise iki taban lobu kenarı arasındaki açı ya da boşluklara bakılır. Yaprak bölme derinliği; serbest lobun uzunluğunun yaprağın yarıçapına oranı (petiolün en üst kısmından orta lobun en üst kısmına kadar olan kısım ölçülür) kesir olarak (1/2 ve 1/3 gibi ) ifade edilir. Loblar arası az ya da çok belirgin dişli U ve V şekilli yarıklar gelişmiş olabilir bu yüzden her lob alt taraflara doğru yakın olan paralel kenarlara sahiptir. Bu yarık bitişiğindeki dişin boyutunu iki katı kadar geçtiği zaman uzun olarak tarif edilir. Dişlerin sayısı orta lobun bir kenarı içindir ve tepede olan diş dahil değildir (15).

### 2.1.5.1. *Alchemilla* L. Cinsinin Türkiye ve Doğu Ege Adaları Florası 'nda Yer Alan Grup Tayin Anahtarı

1. Yapraklar tabana kadar ya da tabana yakın loblanır.....Grup A

1. Yapraklar en fazla 1/2 (2/3)'e kadar loblanır

2. Sepaller hipantiyumdan belirgin bir şekilde uzun; epikaliks lobları sepallere kadar uzamış ya da onlardan daha uzun çok nadiren kısa; akenler hipantiyumdan çok uzun

3. Gövde ve petiyoller patent, erekto-patent tüylü.....**Grup C**

3. Gövde ve petiyoller tüysüz veya yatık tüylü veya biraz yatık tüylü

4.Hipantiyumların hepsi en azından kısmen tüylü..... Grup D

4.Hipantiyumların hepsi tüysüz.....Grup E

2. Sepaller hipantiyum kadar uzunlukta ya da onlardan kısa; epikaliks lobları çoğunlukla sepallerden kısa; akenler çok hafif hipantiyumdan uzun ya da değil.....Grup B

*Alchemilla* L. cinsi Grup C'ye dahildir.

#### **Grup C**

1. Pedisellerin hepsi  $\pm$  yoğun tüylü

2. Sepaller ve epikaliks lobları tüysüz

3. Gövde, petiol ve pediseller patent tüylü; yaprak lobları 5-8 az çok eşit dişli.....23. *orthotricha*

3. Gövde, petiol ve pediseller patent tüylü; yaprak lobları 7-11 ve düzensiz dişli.....25. *erzincanensis*

2. Sepaller ve epikaliks lobları seyrek olarak kirpikli

4. Çiçek kümesi yoğun, çiçek durumu genişliğinin üç katı kadar uzun; yapraklar geniş sinüslü.....26. *orduensis*

4. Çiçek kümesi seyrek, kısa, yapraklar dar yada kapalı sinüslü ..... 27. *hirtipedicellata*

1. Pedisellerin hepsi tüysüz ya da dip kısımlarında seyrek tüylü
5. Yaprakların hepsi heriki yüzeyde yoğun tüylü
6. Yapraklar sadece  $1 / 10 - 1 / 6$  oranında loblu; çoğu zaman çok belirgin değil.....28. *holocycla*
6. Yapraklar  $1 / 7 - 1 / 4$  oranında loblanır, daima belirgin loblu
7. Çiçekler 3.5-5 mm genişlikte, pedisellerin tümü veya bir kısmı tüysüz
8. Gövdeler hemen hemen boydan boya tüylü; yapraklar dar ya da kapalı sinüslü
9. Yaprak lobları trunquat değil, yarıksız ve 6-10 dişli.....29. *mollis*
9. Yaprak lobları trunquat, kısa fakat belirgin yarıklı; 3-5 (6) dişli.....30. *bornmuelleri*
8. Gövdenin üst kısımları  $1 / 4 - 1 / 3$  tüysüz; yapraklar oldukça geniş sinüslü.....32. *amonea*
7. Çiçekler 4.5-6.5 mm genişlikte, her çiçek kümesinde pedisellerin aşağı kısımları seyrek tüylü.....31. *porrectidens*
5. En azından yaprakların üst yüzeyleri tüysüz ya da  $\pm$  seyrek tüylü
10. En azından hipantiyumların bazısı  $\pm$  tüylü
11. Bazı yaprakların üst yüzeyleri en azından kıvrımlarda tüylü
12. Yaprak lobları arkuat,  $\pm$  orbikular ya da  $\pm$  eliptik
13. Gövdenin hemen hemen tamamı tüylü; yaprak lobları yarıksız.....35. *persica*
13. Gövde üst kısımlarında  $1 / 4 - 1 / 3$  tüysüz, yaprak lobları kısa fakat belirgin yarıklı.....36. *oriturcica*
12. Yaprak lobları en azından kısmen subtriangular

14. Gövdeler neredeyse tamamen tüylü, ancak yapraklar üst kısımlarda dağınık tüylü.....33. *hirsutiflora*

14. Gövdelerin üst kısımları 2 / 5 tüysüz; bazal yapraklar ve aşağı kısımda kalan gövde yapraklarının üst yüzeyleri ± tüysüz.....34. *armenica*

11. Bütün yaprakların üst yüzeyleri tüysüz....39. *bursensis*

10. Hipantiyumların hepsi tüysüz

15. Gövdenin neredeyse tamamı tüylü; yaprak lobları 1 / 4 – 1 / 3 oldukça dar sinüslü.....37. *sintensis*

15. Gövdelerin üst kısımları 1 / 2 – 1 / 4 tüysüz; yaprak lobları 1 / 8 – 1 / 5 geniş sinüslü.....38. *hessii*

Türkiye’de yayılış gösteren *Alchemilla* türleri ile ilgili yapılan en son çalışmada ise tür sayısı 83 olarak belirtilmiştir (Tablo 2.1) (27).

**Tablo 2.1.** Türkiye’de yayılış gösteren *Alchemilla* türleri (27)

Tür adı	Yetiştığı bölge	Endemik/ Endemik değil
<i>A. abchasicaa</i>	Karadeniz Bölgesi	Endemik değil
<i>A. akdoganica</i>	Karadeniz Bölgesi	Endemik
<i>A. amoena</i>	Karadeniz Bölgesi	Endemik
<i>A. ancerensis</i>	Karadeniz Bölgesi	Endemik
<i>A. armeniaca</i>	Karadeniz Bölgesi	Endemik
<i>A. ayazii</i>	Karadeniz Bölgesi	Endemik
<i>A. ayderensis</i>	Karadeniz Bölgesi	Endemik
<i>A. barbatiflora</i>	Karadeniz Bölgesi	Endemik değil
<i>A. basakii</i>	Karadeniz Bölgesi	Endemik
<i>A. beyazoglu</i>	Karadeniz Bölgesi	Endemik
<i>A. boluensis</i>	Karadeniz Bölgesi	Endemik
<i>A. bornmuelleri</i>	Kızılırmak Bölgesi	Endemik
<i>A. bursensis</i>	Marmara Bölgesi, İç Batı Anadolu Bölgesi	Endemik
<i>A. buseriana</i>	Hakkari, Adana Bölgesi	Endemik

**Tablo 2.1.** Türkiye’de yayılış gösteren *Alchemilla* türleri (27) (Devamı)

Tür adı	Yetiştığı bölge	Endemik/ Endemik değil
<i>A. chlorosericea</i>	Karadeniz Bölgesi	Endemik değil
<i>A. caucasica</i>	Marmara, Karadeniz, Erzurum-Kars Bölgesi	Endemik değil
<i>A. cimilensis</i>	Karadeniz Bölümü	Endemik
<i>A. ciminensis</i>	Fırat Bölümü	Endemik
<i>A. compactilis</i>	Batı ve Doğu Karadeniz, Yukarı Murat-Van Bölümü, Adana, Hakkari Bölümü	Endemik değil
<i>A. crinita</i>	Erzurum-Kars ve Yukarı Murat-Van Bölgeleri	Endemik değil
<i>A. daghestanica</i>	Karadeniz Bölümü	Endemik değil
<i>A. dura</i>	Erzurum-Kars ve Yukarı Murat-Van Bölgeleri, Karadeniz Bölümü	Endemik değil
<i>A. elevitensis</i>	Karadeniz Bölümü	Endemik
<i>A. ellenbergiana</i>	Karadeniz, Kızılırmak, Yukarı Murat-Van Bölümü	Endemik değil
<i>A. epipsila</i>	Karadeniz Bölümü	Endemik değil
<i>A. erythropoda</i>	Batı ve Doğu Karadeniz, Yukarı Murat-Van ve Erzurum- Kars Bölümü	Endemik değil
<i>A. erzincanensis</i>	Yukarı Fırat Bölümü	Endemik değil
<i>A. fissa</i>	Karadeniz Bölümü	Endemik değil
<i>A. gigantodus</i>	Karadeniz Bölümü	Endemik değil
<i>A. glabricaulis</i>	Karadeniz Bölümü	Endemik
<i>A. grossheimii</i>	Karadeniz Bölümü	Endemik değil
<i>A. hamzaoglui</i>	Karadeniz Bölümü	Endemik
<i>A. haraldi</i>	Karadeniz Bölümü	Endemik değil
<i>A. hayirlioglu</i>	Karadeniz Bölümü	Endemik
<i>A. hemsinica</i>	Karadeniz Bölümü	Endemik
<i>A. hessii</i>	Hakkari Bölümü	Endemik değil

**Tablo 2.1.** Türkiye’de yayılış gösteren *Alchemilla* türleri (27) (Devamı)

<b>Tür adı</b>	<b>Yetiştığı bölge</b>	<b>Endemik/ Endemik değil</b>
<i>A. hirsutiflora</i>	Marmara Bölümü	Endemik
<i>A. heterophylla</i>	Batı ve Doğu Karadeniz Yukarı Sakarya, Erzurum-Kars, Y. Fırat Bölümü	Endemik değil
<i>A. hirtipedicellata</i>	Karadeniz Bölümü	Endemik değil
<i>A. holocycla</i>	Orta Karadeniz, Orta ve Yukarı Kızılırmak, Konya, Yukarı Fırat ve Adana Bölümü	Endemik
<i>A. holotricha</i>	Karadeniz Bölümü	Endemik değil
<i>A. ikizdereensis</i>	Karadeniz Bölümü	Endemik
<i>A. kackarensis</i>	Karadeniz Bölümü	Endemik
<i>A. lithophila</i>	Yukarı Kızılırmak Bölümü	Endemik değil
<i>A. microscopia</i>	Karadeniz Bölümü	Endemik değil
<i>A. minusculiflora</i>	Karadeniz Bölümü	Endemik değil
<i>A. mollis</i>	Güney Marmara, Karadeniz ve Yukarı Kızılırmak Bölümü	Endemik değil
<i>A. monticola</i>	Karadeniz Bölümü	Endemik değil
<i>A. oligotricha</i>	Asıl Ege Bölümü ve Yukarı Kızılırmak Bölümü	Endemik değil
<i>A. orduensis</i>	Karadeniz Bölümü	Endemik
<i>A. oriturcica</i>	Yukarı Fırat Bölümü	Endemik
<i>A. orthotricha</i>	Karadeniz Bölümü	Endemik değil
<i>A. ovitensis</i>	Karadeniz Bölümü	Endemik
<i>A. oxysepala</i>	Doğu Karadeniz ve Erzurum-Kars Bölümü	Endemik değil
<i>A. paracompactilis</i>	Adana Bölümü	Endemik
<i>A. pectiniloba</i>	Batı Karadeniz ve Yukarı Sakarya Bölümü	Endemik değil
<i>A. percica</i>	Erzurum-Kars, Murat- Van ve Hakkari Bölümleri	Endemik değil
<i>A. plicatissima</i>	Karadeniz Bölümü	Endemik değil

**Tablo 2.1.** Türkiye’de yayılış gösteren *Alchemilla* türleri (27) (Devamı)

Tür adı	Yetiştği bölge	Endemik/ Endemik değil
<i>A. plicatula</i>	Güney Marmara Bölümü	Endemik değil
<i>A. porrectidens</i>	Karadeniz Bölümü	Endemik değil
<i>A. procerrima</i>	Yukarı Murat ve Van Bölümü	Endemik
<i>A. pseudocartalinica</i>	Güney Marmara, Karadeniz, İç Batı Anadolu, Yukarı ve Orta Kızılırmak, Erzurum-Kars ve y-Yukarı Murat ve Van Bölümleri	Endemik değil
<i>A. pseudomollis</i>	Karadeniz Bölümü	Endemik değil
<i>A. retinervis</i>	Doğu Karadeniz Bölümü ve Orta Karadeniz Bölümü	Endemik değil
<i>A. revularis</i>	Adana Bölümü	Endemik
<i>A. rizensis</i>	Karadeniz Bölümü	Endemik
<i>A. sciadiophylla</i>	Adana Bölümü	Endemik
<i>A. sericea</i>	Doğu Karadeniz, Yukarı Murat-Van ve Hakkari Bölümleri	Endemik değil
<i>A. sericata</i>	Batı Karadeniz ve Erzurum-Kars Bölümü	Endemik değil
<i>A. sintenisii</i>	Karadeniz Bölümü	Endemik
<i>A. smirnovii</i>	Karadeniz Bölümü	Endemik değil
<i>A. speciosa</i>	Doğu Karadeniz Bölümü	Endemik değil
<i>A. surculosa</i>	Karadeniz Bölümü, Yukarı Murat-Van Bölümü	Endemik değil
<i>A. stevenii</i>	Doğu Karadeniz Bölümü	Endemik değil
<i>A. straminea</i>	Batı Karadeniz Bölümü	Endemik değil
<i>A. stricta</i>	Batı Karadeniz Bölümü ve Erzurum-Kars Bölümü	Endemik değil
<i>A. tiryalensis</i>	Doğu Karadeniz Bölümü	Endemik
<i>A. trabzonica</i>	Doğu Karadeniz Bölümü	Endemik
<i>A. transcaucasica</i>	Karadeniz Bölümü	Endemik değil
<i>A. valdehirsuta</i>	Doğu ve Batı Karadeniz Bölümü ve Erzurum-Kars Bölümü	Endemik değil
<i>A. venosa</i>	Karadeniz Bölümü	Endemik değil
<i>A. ziganadagensis</i>	Karadeniz Bölümü	Endemik

### 2.1.6. *Alchemilla mollis* (Buser) Rothm.

Gövde 25-80 cm, kuvvetli, sert  $\pm$  dik, yüzeyi yoğun olarak boydan boya tüylü. Yapraklar orbikular ya da, 13×15,5 cm üzeri, orbikular-reniform dar ya da kapalı sinüslü, her iki yüzeyi de yoğun tüylü, loblar 1/7 – 4/13 ve 9-11 parçalı, arkuat, semiorbikular veya rotundat fakat trunat değil, yarıksız, 6-10 dişli, dişler eşit değil, apikal dişler lateral dişlerden çok az daha küçük, gövde yaprakları geniş. Çiçek durumu geniş, çiçek kümeleri birbirine yakın, pediseller tüysüz. Çiçekler (3-)3,5-5(-6) mm genişliğinde hipantiyum yüzeyi çoğunlukla tüylü; epikaliks lobları ovat ya da ovat-lanseolat, 1 küçük dişli, sıklıkla ovat sepallerden daha uzun, her ikisi de akut ve genellikle tüysüz. Çiçeklenme mevsimi 6-8. aylardadır. *Abies* ve *Fagus* ormanlarının arasında 900-2100 m. arası yükseklikte yayılış göstermektedir (Şekil 2.1). Tip örneği tanımlanmamıştır.

Gen merkezi Kuzey Anadolu'da A2 (A) Bursa: Ulu Dağ, *Letourneux* A3 Bolu: Ala Dağ, Kartal Kaya Tepesi üzeri, 1600-2000 m. *D.* 37311. A4 Kastamonu: Ilgaz Dağları, 1350-2100m, *D.* 384423 Çankırı Tuht üzeri Bokly Tepe 1450 m. *Czeczott* 237, p.p. A5 Sinop: Çangal Dağı, Ayancık üzeri 900 m. *D.* 38191 A6 Amasya: Ak Dağ, 1400-1800 m, *Bornm.* 1889: 293 A7 Gümüşhane: Tempede, *Sint.* 1894 7418 B6 Sivas Ak Dağ'ın kuzeyi 1400 m. *Jasely Dasch, Siehe* 315.



Şekil 2.1: *Alchemilla mollis* türünün habitata (28)

## 2.2. FARMAKOPELERDE KAYITLI OLAN *ALCHEMILLA* TÜRLERİ

Geniş bir yayılış alanına sahip olan *Alchemilla* türlerinin çok eski çağlardan beri tıbbi amaçlarla kullanımının tüm dünyada özellikle de Avrupa'da yaygın olduğu gözlenmektedir. *A. vulgaris* türünün toprak üstü kısımları ülkemizin de dahil olduğu birçok ülkede resmi olarak kabul gören Avrupa Farmakopesi'nde kayıtlı olarak bulunmaktadır (29). Ayrıca ulusal bir farmakope olan British Pharmacopoeia'nın 1996, 2000 baskılarında *Alchemilla vulgaris*'in kullanım kayıtlarına rastlanmaktadır (30). Ayrıca 2009 ve 2011 baskılarında da yine *Alchemilla vulgaris*'in kullanımına yer verilmiştir (31, 32).

## 2.3. *ALCHEMILLA* TÜRLERİNİN KULLANIMI

Rosaceae familyasının bir üyesi olan *Alchemilla* türleri Avrupa ve Asya'da yabani olarak yetişen aynı zamanda bahçelerde süs bitkisi olarak kültüre alınan bitkilerdir. Bitkinin yaprakları su geçirmez özelliktedir. Eski çağlarda rahibe kadınların giysilerinin yakaları yapraklarının şekline benzetildiği için Alman botanikçiler bitkiye "Kadın Mantosu (Ladys'Mantle)" Fransızlar ise yaprakları aslan pençesi şeklinde yarıklı bir yapıya sahip olduğu için "Aslan Pençesi adını vermişlerdir (33, 34).



Şekil 2.2. *Alchemilla mollis* yapraklarının yağmur sonrası görüntüsü (35)

*Alchemilla*, Arapça bir kelime olan Alkemelych (alchemy = simya) kelimesinden türemiş olup, bitkinin bazı güçlerinin olduğuna inanılmasından dolayı bu ad verilmiştir (1). Değersiz maddeleri altına çevirme ve bütün hastalıkları iyileştirme ve hayatı sonsuz biçimde uzatacak ölümsüzlük iksirini bulma çabalarına simya denilmesiyle bağlantılı olarak Latin yazarlar çiğ tanelerini bir kimyacı gibi kullanıp saflaştırdığına inanmışlar ve bitkinin hastalıkların tedavisinde çok güçlü etkilere sahip olduğunu düşündüklerinden dolayı bitkiyi *Alchemilla* ismiyle anmışlardır (34).

*Alchemilla* bitkisi daha çok kuzey bölgelerde yetişen bir bitki olduğu için klasik *Materia Medica* kitabında yer almamıştır. Ancak bitki Eski Almanlara göre mitolojide doğurganlığın sembolü olarak bilinen Tanrı Freya ile ilgisi olduğu düşünüldüğü için oldukça önemlidir. Zaten bitki Orta çağda yara iyi edici olarak kullanılsa da Rönesans ile birlikte resmi farmakopelere girmiş özellikle kadınlara özel olan hastalıkların tedavisinde kullanılmıştır (36).

Bitki astrenjan özellikte acı lezzetli ve aspirin gibi salisilat benzeri maddeler içermektedir. Bu bileşikleri taşıyan bitkilerde genellikle nemli bölgelerde yaşarlar ve yaprakları su geçirmez özelliktedir ve üzerinde toplanan su damlalarını kendisi için uygun şekilde kullanır. Bitkinin sahip olduğu bu özelliklerle bağlantılı olarak da dokulardan suyu uzaklaştırmak üzere kullanıldığı düşünülmektedir. Yani bitki genel anlamda kanamaları durdurmada, diyarede, aşırı menstruasyonda ve enfeksiyonlarda kullanılır (34). Bitkiye astrenjan özellik veren tanenler dokularda çeşitli nedenlerle meydana gelen (uterusun sarkması, fitik vb.) gevşemelerde kas tonusunun tekrar toparlanması için kullanılmakta, salisilatlar ise koagüle olmuş kanın incelmelerini sağlayarak kan akışını hızlandırmakta ve varis oluşumunu engellemektedir (36).

Sonuçta bitki sahip olduğu kimyasal içeriği ile bağlantılı olarak eski çağlardan beri birçok hastalığın tedavisinde kullanılmıştır.

Aşağıda *Alchemilla* türlerinin ülkemizde ve dünya genelinde etnofarmakognozik kullanımı ile ilgili ayrıntılı bilgi verilmiştir.

### **2.3.1. *Alchemilla* Türlerinin Türkiye’de Etnofarmakognozideki Yeri**

Ülkemizde *Alchemilla* türleri tedavi edici olarak halk arasında yaygın bir kullanım alanına sahip değildir. Ancak yapılan etnofarmakognozik araştırmalarda Doğu Anadolu Bölgesinde “yıldız nişanı” olarak bilinen *A. pseudocartalinica* yapraklarının infüzyon

şeklinde kabız, diüretik ve tonik olarak kullanıldığı kaydedilmiştir (37). Yine Sivas ve Yozgat bölgesinde yapılan bir başka çalışmada ise *A. mollis* halk arasında “Gürlevik” olarak bilinmekte ve bitkinin gövdesi kabukları soyularak besin maddesi olarak tüketilmektedir (38).

### 2.3.2. *Alchemilla* Türlerinin Dünya Geneline Etnofarmakognozideki Yeri

Dünya genelinde *A. vulgaris* türünün yaygın olarak tedavi edici amaçla kullanıldığı gözlenmektedir. Ükelere göre *A. vulgaris*'in halk arasında kullanımı aşağıda verilmiştir.

**Fransa:** Bitki astrenjan, antihemorajik ve antidiyareik olarak kullanılmaktadır (39).

**İtalya:** Toprak üstü kısımlarının infüzyonu tonik, stomaşik, diüretik hemostatik ve astrenjan olarak kullanılırken yaprakları ise nezleye ve menstrual ağrılara karşı kullanılmaktadır (40, 41).

**Bulgaristan:** Ürogenital hastalıkların tedavisinde ve enflamasyonlu yaraların tedavisinde antiseptik olarak kullanılmaktadır (41, 42).

**Polonya:** Gastritte, antienflamatuvar ve karminatif olarak, yaraların tedavisinde kullanılmaktadır (43).

**Ürdün ve İsrail:** Bitkinin yaprak ve köklerinin dekoksilyonun antidiyabetik olarak kullanımının yanı sıra literatürlerde mide ve bağırsak yaralarının tedavisi ve kilo kaybı için kullanımı kaydedilmiştir (44, 45).

**Bosna-Hersek:** *A. vulgaris* ile beraber bu bölgede *A. filicaulis* Buser. türünün toprak üstü kısımları halk arasında menstruasyon rahatsızlıklarında ve başağrısında kullanılmaktadır (46).

**Karadağ:** Bitki toprak üstü kısımları hafif geçirilen diyarede ve menapoz şikayetlerinde kullanılmaktadır (47).

Ayrıca yine çeşitli literatürlerde *A. vulgaris* bitkisinin ülser, egzema ve deri kızarıklıklarının tedavisinde kullanıldığı belirtilmiştir (8).

Bitki gece altını ıslatan çocuklara halk arasında *Agrimonia* L. (kasikotu), *Petroselinium* L. (maydanoz), ve *Geranium* L. (sardunya) türleri ile birlikte kullanılmıştır (48).

*A. xanthochlora* Rothm. Avrupa’da yine yaygın olarak kanamalara karşı astrenjan olarak ve diyarede kullanılmaktadır (49).

*A. alpina* L. türünün İspanya’nın Pallars bölgesinde toprak üstü kısımlarının çay şeklinde veya ağız bakım suyu olarak antimikotik amaçla kullanımı bulunmaktadır (50).

Pakistan’da yapılan fitoterapi araştırmalarında ise *A. mollis*’in harici ve dahili olarak ülser, hemoroid ve yanıklarda, ağız bakım suyu olarak inflamasyon tedavisinde ve periodontal hastalıklarda, diyarede ve safra rahatsızlıklarında kullanıldığı kayıtlıdır (51).

Ayrıca bazı kaynaklarda *A. arvensis* Scop. türünün özellikle böbrek taşlarını düşürmede oldukça etkili olduğu, *A. alpina*’nın karın ağrılarını, *A. woodii* Kuntze. ise başağrılarını tedavi etmek için kullanıldığı belirtilmektedir (52).

#### **2.4. ALCHEMILLA TÜRLERİNİN KİMYASAL BİLEŞENLERİ**

Fitokimyasal çalışmaların birçoğu farmakolojik olarak aktif olan fenolik bileşikler üzerindedir (40). Rosaceae familyasının üyeleri tipik olarak flavonoidler ve fenolik asitler bakımından oldukça zengindir. Ayrıca *A. alpina*, *A. acutiloba* Opiz., *A. xanthochlora* ve *A. speciosa* Buser. gibi birçok *Alchemilla* türünde de bu bileşiklerin varlığı kanıtlanmıştır (39).

*A. vulgaris* bitkisi flavonoidleri ve tanenleri yüksek oranda taşımaktadır (8). Ayrıca triterpenik maddeler üzerine de çalışmalar mevcuttur (9). Ancak bu çalışmalar cinsin karakteristik bileşenleri hakkında kesin bilgiler vermek için yeterli değildir. Hem bitkinin tedavi edici özelliklerinden sorumlu bileşenlerinin yapısını aydınlatmak hem de yüksek oranda morfolojik çeşitlilik gösteren türlerinin kemotaksonomik olarak doğru sınıflandırmasını yapmak için kimyasal çalışmalar yoğun bir şekilde devam etmektedir (53).

##### **2.4.1. Alchemilla Türlerinde Bulunan Fenolik Asitler**

Fitoterapide yaygın olarak astrenjan, diüretik ve antiinflamatuvar amaçla kullanıldığı bilinen *Alchemilla* türlerinin bu özelliklerinin, sahip oldukları fenolik asitler, flavonoidler, tanenler ve triterpenlerden dolayı olduğu bilinmektedir (54).

Bulgaristan’da endemik olarak yayılış gösteren *A. jumrukczalica* Pawl. bitkisi üzerinde yapılan bir çalışmada gaz kromatografisi–kütle spektrometresi (GC-MS) kullanılarak 10 serbest, 17 bağlı fenolik asitin varlığı ve miktarları tespit edilmiştir. Çalışmada serbest

olarak bulunan fenolik asitlerden gentisik, protokateşik, salisilik ve kafeik asit yüksek miktarlarda tespit edilmiştir. Bağlı halde bulunan fenolik asitler ise salisilik, protokateşik, kafeik, trans-sinamik, gentisik ve vanilik asittir (54).

#### 2.4.2. *Alchemilla* Türlerinde Bulunan Polifenoller

Fenolik bileşikler bitki sekonder metabolitlerinin en geniş grubudur. Doğada oldukça yaygın olarak bulunup birçok tıbbi bitkinin en önemli bileşiklerindedir. Hem serbest olarak hem de glikozit formunda bulunabilen bu fenolik madde grubu şelatlama özelliklerinden dolayı yüksek antioksidan aktiviteye sahiptir (55).

Doğu Karadeniz bölgesinde yayılış gösteren 8 endemik *Alchemilla* türünün (*A. armeniaca*, *A. erzincanensis*, *A. cimilensis*, *A. orduensis*, *A. ikizdereensis*, *A. oriturcica*, *A. bursensis* ve *A. hirsutiflora*) flavonoit bileşikleri yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (YBSK) ve ince tabaka kromatografisi (İTK) ile tanımlanmıştır. Türlerde genel olarak flavonol-*O*- glikozitleri ve flavon-*C*- glikozitlerinin varlığı tespit edilmiştir. Tanımlanan flavonoitlerden rutin (kersetin-3-*O*-rutinosit), hiperozit (kersetin-3-*O*-galaktozit), izokersetin (kersetin-3-*O*-glikopiranozit), kersitrin (kersetin-3-*O*-ramnozit) flavonol *O*-glikozitleri, orientin (luteolin-8-*C*-glikozit) ve viteksin (apigenin-8-*C*-glikozit) ise flavon-*C*-glikozitleri olarak belirtilmiştir (56).

Yapılan kimyasal çalışmalar sonucunda çeşitli *Alchemilla* türlerinden çok sayıda flavonoit glikoziti izole edilmiştir. Bulgaristan'da endemik olarak yetişen ve soyu tükenmekte olan tehlike sınırındaki türler arasında olan *A. achtarowii* Pawl bitkisinin kimyasal kompozisyonu çalışılmış ve kersetin ve kemferol glikozitleri bu tür için karakteristik bileşenler olarak verilmiştir (53).

Tablo 2.1.'de *Alchemilla* türlerinden izole edilen flavonoit glikozitleri verilmiştir (53).

Tanenler bitkilerde yaygın olarak bulunan, varlığı ile bitkiyi patojen ve herbivorlere karşı koruyan, yapısında fenolik ve karboksilik asit gruplarını içeren büyük molekül ağırlıklı polifenollerdir (57).

*Alchemilla* türleri yüksek miktarda tanen içeriği ile farmakope kayıtlarına girmiş bir bitkidir. Bitkiden resmi olarak farmakopelerde belirtilen yöntemlerle elde edilen tanen içeriğinin büyük bir kısmını pirogallol oluşturmaktadır. Elajitanen ve dimerik alkemillin ise diğer izole edilip tanımlanan bileşiklerdir (30).

*A. vulgaris* bitkisinin de gallik asit ve elajik asit içerdği yapılan çalışmalarda tespit edilmiştir (8).

**Tablo 2.2.** *Alchemilla* türlerinden izole edilen flavonoit glikozitleri

Bitki tür Adı	Tipi	Bileşik
<i>A. coriacea</i> Buser.	Kersetin	Mikuelianin
<i>A. filicaulis</i> Buser.	Kersetin	Mikuelianin
<i>A. glabra</i> Neygenf.	Kersetin	Mikuelianin
<i>A. mollis</i> (Rothm.) Buser	Kersetin	Hiperozit, isokersetin, Mikuelianin
	Kemferol	<i>Cis-</i> ve <i>trans</i> -tilirozit
	Gossipetin	Gossipetin-3- <i>O</i> - $\beta$ - <i>D</i> -glikopiranosil-7- <i>O</i> - $\alpha$ - <i>L</i> -ramnopiranosit (sinokrassozit D <sub>2</sub> ) Gossipetin-3- <i>O</i> - $\beta$ - <i>D</i> -galaktopiranosil-7- <i>O</i> - $\alpha$ - <i>L</i> -ramnopiranozit Gossipetin-7- <i>O</i> - $\alpha$ - <i>L</i> - ramnopiranozit (rodiolgin)
<i>A. speciosa</i> Buser	Kersetin	Hiperozit, isokersetin, Kersetin-3- <i>O</i> - <i>L</i> - ramnozit (kersitrin), mikuelianin, kersetin-3- <i>O</i> - rutinzit (rutin), kersetin-3- <i>O</i> - $\beta$ - <i>D</i> -sambubiozit, kersetin-3- <i>O</i> - $\beta$ - <i>D</i> -sambubiozit-7- <i>O</i> - $\beta$ - <i>D</i> -glikozit, kersetin-3- <i>O</i> - $\beta$ -(2"- <i>O</i> - $\alpha$ - <i>L</i> -ramnopironosil)-glikopironozit uronik asit
	Kemferol	Tilirozit, kemferol-3- <i>O</i> - $\beta$ - <i>D</i> -glikosit(astragallin, trifolin), kemferol-3- <i>O</i> - $\beta$ - <i>D</i> -glikouronit, kemferol-3- <i>O</i> - $\beta$ -(2"- <i>O</i> - $\alpha$ - <i>L</i> -ramnopironosil)-glikopironosil uronik asit
	Luteolin	Luteolin -7- <i>O</i> - $\beta$ - <i>D</i> - glikozit, Luteolin -7- <i>O</i> - $\beta$ - <i>D</i> - rutinosit,
<i>A. vulgaris</i> L.	Kersetin	Isokersitrin, rutin, kersetin-3- <i>O</i> - <i>D</i> -arabinofuranosit (avikularin)
	Kemferol	Tilirozit
<i>A. xanthochlora</i> Rothm.	Kersetin	Mikuelianin, Gujaverin

### 2.4.3. *Alchemilla* Türlerinin Uçucu Yağ Profili

*Alchemilla* türlerinin uçucu yağları ile çok fazla çalışma bulunmasa da *A. xanthochlora* toprak üstü kısımlarının uçucu yağları ile ilgili yapılan bir araştırmada GC/FID ve GC/MS ile birçok bileşenin yapısı aydınlatılmıştır. Başlıca bileşikler olarak; *cis*-3-hekzanol, linalool, okt-1-en-ol, nonanol, mirtenol, hegzadekanoik asit, *cis*-3- hekzanil asetat, ve  $\alpha$ -terpineol elde edilmiştir (9).

Bu türün uçucu yağlarının bileşenlerini alkoller (*cis*-3-hekzanol, okt-1-en-3-ol), aromatik bileşikler (benzil alkol, 2-pentiletanol), aldehitler (nonanol, fenilasetaldehit, oktadekanal), terpenler (linalool, mirtenol,  $\alpha$ -terpineol), asitler (hegzadekanoik asit, 2-dodekanoik asit, 2-tetradekanoik asit ve tetradekanoik asit) hidrokarbonlar ve çeşitli bileşikler (öjenol ve *p*-vinilguaiakol) oluşturmaktadır (9).

*Alchemilla* cinsi alpin bölgede yetişen bir mera bitkisi olduğu için yetiştiği çayırılık alanda herbivorlar tarafından sıklıkla tüketilen bir bitkidir. Tüketildiğinde hayvanların bağırsak florasında değişikliğe neden olduğundan dolayı hayvanlar tarafından üretilen sütün içeriğini ve tadını değiştirdiği ile ilgili çeşitli çalışmalar da bulunmaktadır. Bu cinsin uçucu yağ profili bu yüzden de önem taşımaktadır (9).

#### **2.4.5. *Alchemilla* Türlerinde Bulunan Triterpenler**

Triterpenler doğada oldukça bol bulunan 30 karbonlu biyolojik olarak aktif bileşiklerdir. Glikozitleri ya da esterleri şeklinde bulunurlar. *Alchemilla* türlerinden de flavonoidlerle birlikte oldukça çok sayıda triterpen izole edilmiştir (30).

İzlanda'da yetişen üç farklı *Alchemilla* türü ile yapılan bir çalışmada *A. faeroensis* (Lange) Buser. bitkisinden 5 triterpen saflaştırılmış ve *A. alpina* ve *A. vulgaris* türlerinde de aynı triterpen bileşiklerin var olduğu belirtilmiştir. Daha önceleri yapılan bir çalışmada ise *A. pastoralis* Buser. türünden triterpenik madde olarak oleanolik asit ve betulik asit izole edildiği kaydedilmiştir (58). Doğal kaynaklarda bulunan oleanolik asit varlığı ile ilgili yapılan bir derleme çalışmasında ise *A. alpina*, *A. faeroensis*, ve *A. vulgaris*'in toprak üstü kısımlarında *A. pastoralis*'in ise bütün kısımlarında bu maddenin var olduğu belirtilmiştir (59).

*Alchemilla* türlerinin karakteristik bileşenleri olarak bilinen flavonoidlere İzlanda'da yetişen üç *Alchemilla* türünde rastlanmazken aynı türlerin Avrupa'da yayılış gösterenlerinde flavonoidlerin var olduğu belirtilmiştir. Bu farklılığın İzlanda'nın iklimik ve ekolojik şartlarından kaynaklandığı düşünülmektedir (58).

*A. alpina*, *A. vulgaris* ve *A. faeroensis* türlerinden izole edilen triterpenik bileşikler; ursolik asit, 2 $\alpha$ -hidroksiursolik asit, 2 $\alpha$ ,19 $\alpha$ -dihidroksi ursolik asit (tormentik asit), 2 $\alpha$ ,3 $\alpha$ ,19 $\alpha$ -trihidroksiurs-12-en-28-oik asit (öskopik asit) ve oleanolik asittir (58).

#### 2.4.6. *Alchemilla* Türlerinin İnorganik Madde İçeriği

Bir bitkinin teröpatik etkisinden sorumlu olan kimyasal bileşenleri genellikle organik bileşiklerdir. Ancak yapılan çalışmalar gösteriyor ki bitkilerde bulunan eser elementler de bitkinin tedavi edici özelliğine büyük katkı sağlamaktadır (59).

Bitkilerde bulunan manganez katalitik aktiviteden sorumlu bir iz elementtir. Fotosentez için gerekli enzim aktivitesinden sorumlu olduğu, ayrıca solunum ve azot metabolizmasında görevli olduğu düşünülmektedir. *A. vulgaris* bitkisinin toplam manganez miktarının değerlendirildiği bir çalışmada bitkide yüksek oranda manganez tespit edilmiştir (60).

#### 2.4.7. Diğer Maddeler:

Bakterilerin fenolik asitleri indirgemesi sonucu açığa çıkan bir bileşik olan 2-*piron*-4,6-karboksilik asit Rosaceae familyasının Rosoideae takımının birçok üyesinde tespit edilmiştir. Tespit edilen fenolik asit *A. conjuncta* Bab. ve *A. xanthocholara* türlerinde de bulunmuştur. Bu nedenle bu bileşiğin Rosaideae takımı için kemotaksonomik olarak sınıflandırılmasında önem taşıyan karakteristik bir bileşen olduğu düşünülmüştür (61).

### 2.5. *ALCHEMILLA* TÜRLERİ ÜZERİNDE YAPILAN BİYOAKTİVİTE ÇALIŞMALARI

**Antimikrobiyal etki:** *Alchemilla* türlerinin antimikrobiyal aktiviteleri üzerine yapılmış çok fazla sayıda araştırma bulunmamaktadır. Ancak 2004 yılında yapılmış bir çalışmada *A. diademata* Rothm. türünün *Staphylococcus aureus*'a karşı antimikrobiyal aktivite gösterdiği belirtilmiştir (62).

Doğu Karadeniz Bölgesi'nde yayılış gösteren *A. rizeensis* bitkisinin yaprak ve tohumlarından elde edilen ekstrelerin antimikrobiyal aktivitesine bakılmış ancak önemli bir etki gözlenmediği kaydedilmiştir (63).

*A. mollis* bitkisinin farklı çözücülerde hazırlanmış ekstrelerinin antimikrobiyal etkilerini tespit etmek için yapılan bir çalışmada ekstrelerin *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus faecalis* ve *Klebsiella pneumoniae* mikroorganizmalarına karşı farklı oranlarda antimikrobiyal aktivite gösterdiği

gözlenmiş, ancak *Candida albicans*'a karşı herhangi bir inhibisyon zonu oluşturmadığı saptanmıştır (64).

Avustralya ve İzlanda'da *A. alpina* toprak üstü kısımlarının etanol ekstresi ile *A. faeroensis* ve *A. vulgaris* bitkilerinin köklerinin petrol eteri ekstrelerinin *Plasmodium falciparum*'a karşı aktif olduğu tespit edilmiştir (65).

**Antioksidan, Antienflamatuvar, Antiproliferatif Etki:** *Alchemilla* türlerinin sahip olduğu zengin flavonoit ve tanen içeriği bitkinin yüksek oranda antioksidan aktivite göstermesini sağlamaktadır. Batı Sibirya'da tıbbi amaçla kullanılan *A. vulgaris* bitkisinde aralarında bulunduğu 20 bitkinin *in vitro* ve *in vivo* olarak antioksidan aktiviteleri ölçülmüş *A. vulgaris* ekstresinin en yüksek aktivite gösteren bitkiler arasında olduğu belirtilmiştir. Bitkinin su ekstresinin alkol ekstresine göre daha aktif olduğu gözlenmiştir. *in vivo* mikrobiyal test sistemleri kullanılarak *A. vulgaris*'in polifenol içeriğinin bağırsak mikrobiyasındaki bakterilere karşı koruyucu etkisinin olup olmadığını belirlemek üzere çeşitli deneyler yapılmıştır. Yapılan deneylerde bitkinin H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'nin bakteriostatik etkisini azalttığı gözlenmiştir. *A. vulgaris* ile muamele edilen hücreler antioksidan gen ekspresyonunu önemli derece arttırmıştır. Bitkinin sahip olduğu yüksek flavonoit ve tanen içeriğinin, antioksidan aktivitesini ve antioksidan gen ekspresyonunu arttırmasından sorumlu olduğu belirlenmiştir (66). Yine *A. vulgaris* türünün antioksidan aktivitesini belirlemek için Türkiye'de yapılan bir çalışmada ticari yollarla elde edilen bitkilerin metanolik ve su ekstrelerinin DPPH• radikalini ve süperoksit anyonunu süpürücü etkisine bakılmış "Fosfodilkolin Liposom" (PC) model sistemi kullanılarak lipit peroksidasyonunu inhibe edici özelliği olduğu tespit edilmiştir (6).

Serbest radikalleri süpürücü aktivitesine bakılmış diğer türler ise Bulgaristan'da yayılış gösteren endemik *A. jumrukczalica* ve *A. vulgaris* bitkileridir. Bu iki bitkinin DPPH• radikalini süpürücü etkisi ticari olarak elde edilen BHT ve şiringik asite karşı ölçülmüş ve bitkilerde bulunan fenolik asitlerinde bu aktiviteden sorumlu bileşikler olduğu tespit edilmiştir (54).

Fransa'nın Limousin bölgesinden toplanıp su ekstresi hazırlanan *A. vulgaris* bitkisinin antioksidan, antienflamatuvar ve antiproliferatif etkilerine bakılmış ve antioksidan testlerle (DPPH• radikalini, hidroksil radikalini ve süper oksit radikalini süpürücü etkisi) polifenolik bileşik içeriği birlikte değerlendirilmiştir. Antienflamatuvar etkiyi

tespit etmek için seçilen bitkiler arasında *A.vulgaris*'in lipoksijenaz enzim aktivitesini önemli derece inhibe ettiği belirtilmiştir. Son olarak bitkinin B16 hücreleri (C57BI/6 fare spontanöz deri tümör hücrelerinden türevlendirilmiş) üzerindeki sitotoksik etkilerine bakılmış; yüksek konsantrasyonlarda (> 0,5mg/ml) yüksek antiproliferatif etkiye sahip olduğu tespit edilmiştir (39).

Bulgaristan'da yetişen tıbbi bitkilerle antioksidan aktivitesinin çok yüksek olduğu bilinen ekonomik öneme sahip *Camellia sinensis*, *Ilex paraguariensis*, *Aspalathus linearis* ve *Cyclopia genistoides* bitkilerinin aktiviteleri ABTS<sup>•+</sup> yöntemi ile, fenol içerikleri ise Folin-Ciocalteu yöntemi ile karşılaştırılmış Bulgaristan'da yetişen *A. vulgaris* bitkisinin bu dört bitkiden daha yüksek aktivite gösterdiği tespit edilmiştir (42).

**Yara İyi Edici Etki:** Yaraların iyileşmesi ve kapanmasında hücre çoğalmasının büyük etkisi olduğu bilinmektedir. Mukoza membranı ve deri üzerindeki yaranın iyileşme hızını geciktirmek için çoğalan bakteri hücreleri ile yaranın kapanması için çoğalan fibroblast ve epitelyum hücreleri arasında sürekli bir yarışma söz konusudur (8). *Alchemilla* türleri de sahip oldukları yüksek miktardaki tanen içeriğinden dolayı yara iyi edici özelliklere sahip olup, halk arasında geçmiş yıllardan beri bu özelliğinden dolayı kullanılmaktadır (6). *A. vulgaris*'in *in vitro* olarak "Chang" karaciğer hücrelerinde "MDBK" epitelyum hücrelerinde ve farelerin aortik miyofibroblast hücrelerinde poliferasyonu arttırdığı gösterilmiştir. *in vivo* olarak ise erkek ratlar üzerinde yapılan çalışmalarda gliserinle beraber uygulandığında yara iyileşmesini önemli ölçüde hızlandırdığı gözlenmiştir (8). Tanence zengin bitkilerin kronik yara iyi edici özelliklerinin araştırıldığı bir çalışmada 128 bitki içerisinden *A. vulgaris* ile *Mimosa tenuiflora* bitkilerinin farklı konsantrasyonlarda yara iyileşmesini hızlandıran epitelyum ve fibroblast hücrelerinin çoğalmasını olumlu yönde etkilediği belirtilmiştir (67).

*A. vulgaris* bitkisinin geleneksel olarak ağız bakımında kullanıldığı bilinmektedir. Buradan yola çıkarak son zamanlarda gliserinle birlikte yara iyileşmesini hızlandırdığı ile ilgili çalışmalar bulunmaktadır. Tekrarlayan aftöz stomatit ya da aftöz ülser olarak bilinen yaygın bir oral mukoza hastalığının tedavisinde Aphtrine<sup>®</sup> isimli standart gliserin içerisinde %3'lük *A.vulgaris* bitkisinin ekstresi kullanılmaktadır. Aphtrine<sup>®</sup> isimli bu piyasa preparatı YBSK ile analiz edildiğinde tanen olarak elajik asit, flavonoit olarak ise kersetin ve luteolin içermektedir. Hastalara uygulanarak test edilen bu

preparatın % 87 oranında iyi sonuç verdiği tespit edilmiş, önemli bir yan etkiye rastlanmadığı kaydedilmiştir (68).

**Antimutajenik Etki:** 1994 yılında *A. alpina* ve *A. mollis*'in antimutajenik aktivitesinin saptanması için yapılan bir çalışmada bitkilerin tanen içeriği ile antimutajenik aktivitesi arasında doğru bir orantı gözlenmemiş olsa da tanenleri uzaklaştırılmış ekstrelerin herhangi bir antimutajenik aktivite göstermediği saptanmıştır. Yapılan çalışmada antimutajenik aktivitenin belirlenmesi amacıyla Ames testi uygulanmış standart olarak doğrudan aktivite gösteren 2-Nitrofluorene (2-NF) mutajeni kullanılmıştır. Yüksek konsantrasyonlarda zayıf ve orta derecede antimutajenik aktivite gösterdiği tespit edilmiştir (69).

**Sıkılaştırıcı Etki:** Yaşlanmanın başlıca problemlerinden biri, cildin elastikiyetini kaybetmesidir. Kollajen ve glikozaminoglukanlar ise dokuların birbiriyle bağlantısını sağlayan protein yapılarıdır ve cildin elastikiyetini korumasında önemli role sahiptir. Bu proteinlerin yıkılmasından sorumlu olan enzimler elastazlar ve kollejenazlardır. Bu enzimlerin inhibisyonunu sağlayarak elastikiyet kaybını önlemek için bitkilerle yapılan bir çalışmada *A. vulgaris*'in de içinde bulunduğu 7 bitki ile çalışılmıştır. Enzimatik inhibisyon için porsin pankreatik elastaz (PPE) ve insan lökosit elastaz (HLE) enzimleri kullanılmıştır. *in vitro* olarak uygulanan standartize edilmiş bitki ekstralarının PPE ve HLE enzimlerini önemli oranda inhibe ettiği tespit edilmiştir. Bu çalışma için yapılan literatür araştırmalarında flavonoit ve kateşin türevi bileşiklerin anti-elastaz aktiviteye sahip olduğu görülmüş yüksek tanen içeriği ile *Alchemilla* bitkisi bileşenlerinde bu aktiviteden sorumlu olabileceği düşünülmüştür (70).

**Antikoagülant Etki:** Polonya'da yapılmış olan bir çalışmada *A. vulgaris* bitkisinin sahip olduğu polifenolik ve polisakkarit içeriğinden dolayı antikoagülant aktiviteye sahip olduğu tespit edilmiştir (71).

**Sitotoksik, Apoptotik ve Nekrotik Etki:** Kanser tedavisinde alternatif tedavi yöntemlerinden biri olarak son zamanlarda oldukça gündemde olan bitkilerle yapılan bir çalışmada 347 bitki ekstresi doza bağlı olarak nöroblastoma hücrelerine uygulanmış ve sonuçlar değerlendirilmiştir. *A. vulgaris* bitkisinin de bu çalışmada orta derecede antikanser aktivite gösterdiği belirtilmiştir (72).

*A. erythropoda*, *A. ikizdereensis*, *A. oriturcica* ve *A. trabzonica* türlerinin hazırlanan bitki ekstraları HeLa hücrelerine uygulandığında düşük konsantrasyonlarda düşük

toksik etki gözlenirken, yüksek konsantrasyonlarda toksik etkinin arttığı gözlenmiştir. Aynı şekilde ekstrelerin apoptotik ve nekrotik etkileri olduğunda kaydedilmiş olup özellikle *A. trabzonica* diğer türlerden daha yüksek toksik, apoptotik ve nekrotik etki göstermiştir. Bu çalışma ile *Alchemilla* türlerinin gelecekte kanser çalışmalarında önemli bir yere sahip olabileceği vurgulanmıştır (73).

**Zayıflatıcı Etki:** *Alchemilla vulgaris*, *Olea europaea* L., *Mentha longifolia* L. yaprakları ile *Cuminum cyminum* L. tohumlarından hazırlanan bitkisel karışım önce hayvanlara sonrada insanlara uygulanmış ve belirgin şekilde kilo kaybı sağladığı gözlenmiş ve herhangi bir yan etki oluşmadığı kaydedilmiştir (74).

**Antibiofilm Etkisi:** Bakteriyel biofilmler enfeksiyonların büyüklüğü ile alakalı yapılardır ve biofilm üreten bakteriler genellikle antibiyotik dirençli organizmalardır. Yapılan çalışmalarda yeşil çayda bulunan elajik asitin *Streptococcus dysgalactiae*'nin biofilm oluşumunu inhibe ettiği gözlenmiştir. *Alchemilla* türlerinde de bulunan elajik asitle birlikte yine bu cinsin türlerinden izole edilen eskuletinin *Staphylococcus aureus*'un biofilm yapısını önlemede oldukça etkili olabileceği belirtilmiştir (75).

**Hepatotoksisiteye karşı koruyucu etki:** Kumarin ve kumarin türevi bileşiklerin hepatotoksisiteyi indükleyen karbontetraklorüre karşı koruyucu etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada antienflamatuvar aktiviteye sahip *Alchemilla* türlerinden izole edilen eskuletinin koruyucu etkisinin kısmen de olsa 5-lipoksijenaz inhibitor aktivitesi ile alakalı olduğu literatürde belirtilmiştir (76).

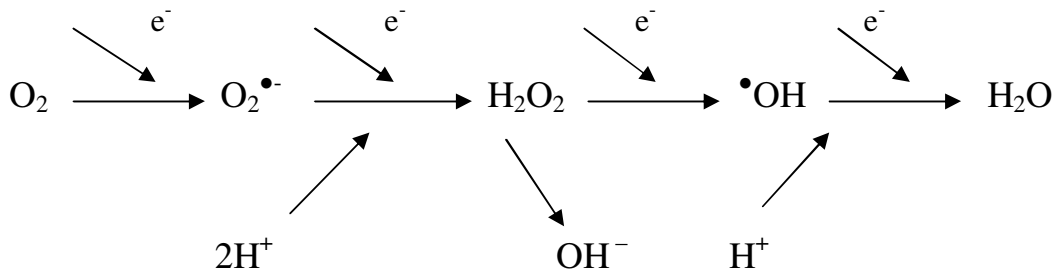
## 2.6. ANTIOKSİDANLAR

Antioksidanlar son yıllarda oldukça fazla araştırılan ve yazılan bir konu olarak karşımıza çıkmaktadır. Antioksidan maddelerin serbest radikallerle savaştığı, yaşlanmayı geciktirdiği ve birçok tipteki hastalığı önlediği en çok bilinen özelliklerindedir. Serbest radikallerin verdiği hasarın neden olduğu, aralarında kanser ve kalp rahatsızlıkları gibi önemli hastalıklarında bulunduğu 60'ın üzerinde hastalık mevcuttur. Antioksidanların hastalıklardan korunmada nasıl anahtar rol oynadığını anlayabilmek için serbest radikallerin ve oksijenin vücudumuz üzerine olan etkilerini ve antioksidanların çalışma mekanizmasını bilmemiz gerekmektedir (77).

### 2.6.1. Oksijen ve Önemi

Hayvan, bitki ve bakteri gibi aerobik organizmaların enerji ihtiyaçlarını karşılamak için son derece gerekli ve hayati öneme sahip oksijen elementi, aynı zamanda bu organizmalar için toksik, zararlı, mutajenik ve hatta ölümcül olabilir (78).

Soluduğumuz havanın % 21'ini oluşturan oksijen, solunum olayı sonucunda mitokondrielerde bulunan elektron taşıma sistemlerinde birtakım enzimsel olaylar ve indirgenme reaksiyonları ile suya çevrilmekte ve zararsız hale getirilmektedir. (Şekil 2.3) Ancak bazı durumlarda oksijen suya kadar indirgenmeden ortamdaki ayrılır. Henüz reaksiyonunu tam olarak gerçekleştiremeyen oksijen, yarım kalan bu reaksiyonunu diğer hücre materyalleriyle tamamlama eğilimine girer. Bu olay 'Oksijen Paradoksu' olarak adlandırılır (79).



Şekil 2.3. Oksijenin suya indirgenmesi

Oksijenin vücut için zararlı olan molekülleri oluşturması karşısında, vücutta kendi antioksidan savunma mekanizmasını geliştirmiştir. Bu sistem pek çok endojen ve ekzojen kaynaklara bağlı kompleks bir sistemdir (79).

### 2.6.2. Serbest Radikaller

Biyolojik sistemlerde normal oksidasyonun işleyişi sırasında yüksek oranda serbest radikal oluşur (80). Serbest radikaller eşleşmemiş elektrona sahip moleküllerdir. Eğer bir molekül eşleşmemiş elektrona sahip ise stabil değildir ve sürekli reaksiyona girme eğilimindedir (77). Bu noktada da serbest radikallerin zararlı etkileri ortaya çıkmaktadır.

Serbest radikaller vücudun normal fonksiyonları sırasında oluşan ya da vücudun dış faktörlerle etkileşmesi sonucu açığa çıkan moleküllerdir. Vücut besinleri ve oksijeni enerji elde etmek üzere kullanırken, eşleşmemiş elektronlara sahip olan oksijen

molekülleri serbest radikalleri oluşturur. Normal metabolizmanın oluşturduğu bu ürünler ise DNA, lipid ve proteinlere büyük ölçüde zarar vermektedir. Hava kirliliği, X-ray, güneş ışınlarından dolayı maruz kaldığımız radyasyon da serbest radikallerin oluşumuna neden olmaktadır (77).

Serbest radikallerin tamamen zararlı olması gibi bir durum söz konusu değildir. Aslında vücudumuzun serbest radikallere ihtiyacı vardır. Örneğin bazı yaşamsal hormonların üretiminde, belli başlı öneme sahip bazı hormonların aktivasyonunda serbest radikallere ihtiyaç vardır (77). Enfeksiyon gibi bazı istenmeyen durumlarda ve yabancı maddeleri uzaklaştırmak için de vücut serbest radikalleri kullanır, ancak bu sırada kendi hücrelerine zarar verebilir; örnek olarak bu hasar DNA üzerinde oluşursa kanser oluşabilir. İşte antioksidanlarda, hücreler kendine zarar vermeden önce oksidasyonu azaltarak oluşabilecek hasarı azaltır (80).

### **2.6.2.1. Oksijen Türevi Serbest Radikaller**

#### **2.6.2.1.1. Süperoksit Anyon Radikali**

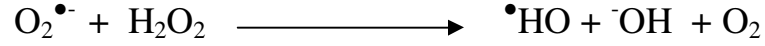
Süperoksit radikali ( $O_2^{\bullet-}$ ) moleküler oksijene ekstra bir elektron bağlanmasıyla meydana gelir. Milisaniyelik yarı ömrü ile zayıf bir oksidan ancak güçlü bir redüktandır. Bu radikal oksijen toksisitesinde önemli bir faktördür. Süperoksit dismutaz (SOD) enzimi ise organizmayı bu radikalın etkilerine karşı korur (81).

Süperoksit radikalının en muhtemel kaynağı, aerobik hücrelerde mitokondriler içinde bulunan elektron taşıma sisteminde meydana gelen kaçaklardır. Sistemden çıkan elektronlar moleküler oksijenle birleşerek süperoksit radikalini oluştururlar (82).

Ayrıca süperoksit radikali aktive olmuş fagositik hücreler tarafından oluşturulurlar. Bu hücreler istilacı mikroorganizmalara karşı savunma amacıyla NADPH enzimatik sistemini kullanarak doğrudan süperoksit radikalini oluşturabilir (78).

Zayıf bir oksidan olarak süperoksit radikalının hücreye kendi başına önemli bir hasar vermesi muhtemel görülmemektedir. Ancak  $O_2^{\bullet-}$  radikali oluşuktan sonra tiyol gruplarıyla reaksiyon verebilir, bu durumda ya GSH (Glutatyon peroksidaz) tüketilmesine yol açar ve hücreyi ileri derecede oksidatif strese sokar ya da diğer hücrel proteinler üzerindeki tiyol grupları ile reaksiyon vererek proteinleri inaktive eder. Aynı zamanda  $O_2^{\bullet-}$  oksidatif strese sebep olabilecek bir dizi reaksiyonun başlamasına da sebep olabilir. Bu reaksiyonlara örnek olarak Haber-Weiss reaksiyonu

verilebilir. Bu reaksiyonda  $O_2^{\bullet-}$  ve  $H_2O_2$  radikalleri demir varlığında etkileşerek son derece reaktif olan  $\bullet HO$  radikalini verir (Şekil 2.4). Üretilen bu  $\bullet HO$  radikali son derece önemli hücrel hasarlara yol açar (81).

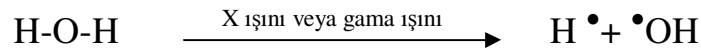


Şekil 2.4: Haber-Weiss reaksiyonu ( $O_2^{\bullet-}$  Süperoksit anyonu,  $H_2O_2$ : Hidrojen peroksit,  $\bullet HO$ : Hidroksil)

### 2.6.2.1.2. Hidroksil Radikali

$\bullet HO$  radikali kimyada bilinen en reaktif oksijen radikalidir. Hemen hemen tüm hücrel makro moleküllerle reaksiyona girebilir. Fakat en önemli etkileri lipitler, proteinler, sitokromlar ve nükleik asitler üzerinedir (83). Hidroksil radikalının en tehlikeli olduğu durum DNA bileşenleri yerine (örnek olarak deoksiriboz şekeri ) DNA ile eşleşmesi durumunda gerçekleşir. Bu durumda DNA mutasyonları gerçekleşir ve kanser gibi birçok önemli hastalığın oluşmasına neden olur (77).

Haber-Weiss reaksiyonunda görüldüğü gibi demir iyonu varlığında  $O_2^{\bullet-}$  ve  $H_2O_2$ 'in reaksiyonu ile  $\bullet HO$  radikali oluşur. Ayrıca canlı hücrelerin başlıca bileşenleri su olduğu için bu hücrelerin iyonize edici radyasyona maruz kalmaları durumunda su molekülünden hidrojen radikali ve hidroksil radikali meydana gelir (Şekil 2.5).



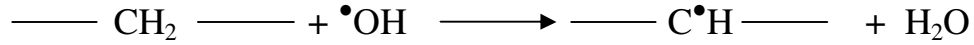
Şekil 2.5: Su molekülünden hidrojen radikali ve hidroksil radikali oluşumu

Hidroksil radikali reaksiyonları genelde 3 başlık altında özetlenebilir. Bunlar hidrojen verilmesi, eklenmesi ve elektron transferidir. Bu reaksiyonlar sonucu radikal olmayan bir türle, serbest radikallerin etkileşimi değişik radikalleri oluşturur. Genellikle oluşan bu yeni radikaller orijinal radikale eşit veya daha az reaktif özellik gösterir (82).

Hidroksil radikalını süpürücü etkiye sahip spesifik bir molekül geliştirilememiştir. Flavonoidler, karotenoidler gibi antioksidanlar yüksek seviyelerde uygulansalar bile  $\bullet OH$  radikalını *in vivo* olarak uzaklaştırmaları pek olası değildir. Bu nedenle antioksidanlar  $\bullet OH$  radikalının verdiği zararı ya onun prekürsör formlarını bloke edip uzaklaştırarak ya

da süperoksit ve hidrojen peroksit formları için ihtiyaç duydukları metal iyonlarını bağlayıp değiştirerek karşılamaya çalışırlar (78).

$\bullet\text{OH}$  radikali ile hidrojen verilmesi ayrıca, canlılar için önemli bir reaksiyon olan lipid peroksidasyonunu da başlatır (Şekil 2.6) (79).

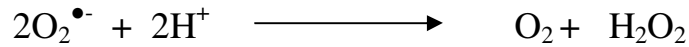


Şekil 2.6: Hidroksil radikali ile H çıkartılması ve lipid peroksidasyonunun başlaması

## 2.6.2.2. Oksijen Türevi Serbest Olmayan Radikaller

### 2.6.2.2.1. Hidrojen Peroksit

Hidrojen peroksit radikali son derece güçlü bir oksitleyici ajan olsa da nisbeten yavaş reaksiyon verir. Kimyasal olarak radikal özellik göstermez ancak serbest radikal kimyasında önemli rol oynar.  $\text{O}_2^{\bullet-}$  in dismutasyon reaksiyonu ile veya doğrudan oksijenin indirgenmesi ile meydana gelir (Şekil 2.7) (81).



Şekil 2.7. Süperoksit anyonunun dismutasyonu

Hidrojen peroksit radikali, flavin koenzim katalizli reaksiyonlarda, kinonların oksidasyonunda, sülfidril içeren bileşiklerin oksidasyonlarında ve süperoksit dismutaz aktivitesi sırasında oluşur. Bununla beraber hücrelerde hidrojen peroksit oluşumunun en önemli kaynağı mitokondriyeldeki elektron taşıma zinciridir. Buna göre canlı dokunun her bir gramında dakikada 82 nmol hidrojen peroksit üretimi olur. Yani bir memelinin gözlerindeki hidrojen peroksit miktarı konsantrasyonu mikromolar cinsinden ölçüldüğünde soluduğu havadaki ile aynı seviyelerdedir (83).

Hidrojen peroksit radikali moleküler yapısı bakımından suya oldukça benzemektedir, hücre içi ve dışında yayılabilir özellik gösterir (82). Ayrıca bazı metabolik rollere de sahip olan bu radikal tiroid bezleri tarafından fiziksel homeostasiyi sağlamak amacıyla kullanılır (78).

### 2.6.2.2.2. Singlet O<sub>2</sub>

Oksijen molekülünün daha reaktif bir türü olan singlet O<sub>2</sub>'ler moleküler oksijenin enerji alması ile oluşurlar. Ömrü oldukça kısadır ancak bu süre zarar verici etki yaratmak için oldukça yeterli bir süredir (81, 83).

Singlet O<sub>2</sub>, çoklu doymamış yağ asitleri, hidrokarbonlar ve kolestrollerle reaksiyona girebilme özelliğine sahiptir (83). Göz retinası sürekli ve yoğun şekilde ışığa maruz kalır. Retinada bulunan retinal pigmentin ışığa maruziyeti ile bu bölgede yoğun olarak bulunan doymamış lipitlere O<sub>2</sub>'nin atak yapması singlet O<sub>2</sub> üretilmesine neden olur ve retinanın önemli derecede harabiyeti ile sonuçlanır. Ayrıca singlet O<sub>2</sub>'lerin biyolojik olarak önemli olan proteinlerle ve metiyonin, triptofan, histidin ve sistein gibi aminoasitlerin kalıntıları ile reaksiyon vermesi de önemli hasarlar oluşturur (81).

**Tablo 2.3:** Reaktif Oksijen Türleri (82)

Radikal türler	Radikal olmayan türler
Moleküler oksijen, O <sub>2</sub>	Hidrojen peroksit, H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
Süperoksit, O <sub>2</sub> <sup>•-</sup>	Hipoklorik asit, HOCl
Hidroksil, •OH	Ozon, O <sub>3</sub>
Peroksil, RO <sub>2</sub> <sup>•</sup>	Singlet oksijen, <sup>1</sup> Δg
Alkoksil, RO <sup>•</sup>	Peroksinitrit, ONOO <sup>-</sup>
Hidroksiperoksil, HO <sub>2</sub> <sup>•</sup>	

### 2.6.2.3. Oksijen Türevi Olmayan Reaktif Azot Türleri

#### 2.6.2.3.1. Nitrojen oksit

Nitrik oksitin canlı organizmalarda hem fizyolojik hem de patolojik birçok görevi vardır. Buna rağmen kolaylıkla serbest radikal olaylarına katılabilmektedir. Nitrik oksit aynı süperoksit radikali gibi limitli olarak reaktivite gösterir. Yani hidroksil radikali gibi bütün biyolojik moleküllerle reaksiyona girmez. Önemli fizyolojik görevlerinin yanı sıra aşırılık durumunda toksik etki gösterir (82).

Yaşayan organizmalarda başlıca nitrik asit sentetaz tarafından sentezlenir. Oksijene ihtiyaç vardır ve 4 temel ko-faktörü; FAD, FMN tetrahidrobiopterin ve HEM'dir (82).

### 2.6.2.3.2 Peroksinitrit

Peroksinitrit, nitrik oksitten veya süperoksit anyon radikalinden meydana gelmekte ve -SH gruplarını kolaylıkla hasara uğratabilmesi nedeniyle tehlikeli olmaktadır. Peroksinitritin protein yapılarını ve mitokondrial elektron taşıma sistemindeki bazı enzimlerin yapılarını bozduğu, ayrıca DNA da kırılmalara yol açtığı bilinmektedir. Çok çabuk bozularak kendisinden çok daha tehlikeli olabilecek hidroksil radikaline dönüşür (79).

**Tablo 2.4:** Reaktif Nitrojen Türleri (82)

<b>Radikal türler</b>	Nitrik oksit ( NO <sup>•</sup> ) ve nitrojen dioksit ( NO <sup>•</sup> <sub>2</sub> )
<b>Radikal olmayan türler</b>	Nitrik asit (HNO <sub>2</sub> ), dinitrojen trioksit (N <sub>2</sub> O <sub>3</sub> ), dinitrojen tetraoksit (N <sub>2</sub> O <sub>4</sub> ), peroksinitrit (ONOO <sup>-</sup> ), peroksinitrik asit (ONOOH), alkil peroksinitriller (ROONO), Nitroksil anyonu (NO <sup>-</sup> ), Nitroksil katyonu (NO <sup>+</sup> ), nitril klorit

### 2.6.3. Oksidatif Stres

Oksidatif stres antioksidanların tamamen veya kısmen eksik olması durumunda meydana gelen antioksidan dengesizliğidir. Sağlıklı bir organizmada üretilen reaktif oksijen türleri (ROS) ve reaktif nitrojen türleri (RNS) antioksidan mekanizmalar tarafından oldukça mükemmel olarak denge halinde tutulurlar. Bu dengenin bozulması durumunda oksidatif stres durumu ortaya çıkar. Örnek olarak antioksidan savunma enzimlerinin mutasyonlardan etkilenmesi ve miktarının azalması veya ROS/RNS üretim miktarının oksijen molekülünü yükseltmesi ya da ROS/RNS üretmek için metabolize edilmiş toksinlerin artması gibi durumlarda oksidatif stres meydana gelir. Bunun yanı sıra iyonize radyasyon, ilaç yan etkileri veya toksik kimyasallar, geçiş elemetlerinin aşırı derecede kullanılabilir olması gibi durumlarda oksidatif strese neden olan diğer ekzojen kaynaklı olaylardır (82, 84).

**Tablo 2.5:** Oksidatif strese neden olan faktörler

Ekzojen Faktörler	Endojen faktörler
1. Diyetsetel <ul style="list-style-type: none"> <li>• çoklu doymamış yağ asitlerince beslenme</li> <li>• alkol</li> <li>• hayvansal proteinlerce zengin beslenme</li> <li>• aşırı demir ve bakır alınması</li> <li>• az sebze ve meyve yenmesi</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Bilinçsiz yapılan veya yetersiz fiziksel egzersiz</li> <li>• Stres</li> <li>• Yaşlılık</li> <li>• Doku hasarı ve kronik hastalıklar (damar tıkanıklığı, kanser, kronik enflamasyon, iskemi gibi)</li> <li>• Diyetsetel antioksidanların sağlanmasını etkileyen olumsuz koşullar</li> </ul>
2. Çevresel <ul style="list-style-type: none"> <li>• sigara dumanı</li> <li>• hava kirliliği (O<sub>3</sub>, NO<sub>2</sub>, SO<sub>2</sub>)</li> <li>• diğer kirleticiler (Asbest, Pestisitler)</li> <li>• radyasyon</li> </ul>	

#### 2.6.4. Lipit Peroksidasyon

Oksidasyon olayı oksijen moleküllerinin hidrojen alarak, oksijen ekleyerek ya da elektron alarak diğer molekülleri okside etmesi olayıdır. Bu olayın ardından oksidanlar ve serbest radikaller oluşur ki bu radikaller tıpkı bir makine gibi hücre hücre, doku doku vücudun bozulmasına neden olur (77).

Hücre membranlarını oluşturan doymamış yağ asitlerinin oksidasyonu insan vücudunda sıklıkla rastlanan bir durumdur. Oksijen molekülünün doğrudan lipit molekülü ile reaksiyonuna otooksidasyon denir. Bu olay oksidasyon başladıktan sonra kendi kendini tetikleyen bir olaydır. Lipitlerle reaksiyona giren oksijenin oksidasyon ve peroksidasyon terimlerini kullanarak açıklanması aşamasında otooksidasyon; eksternal bir indükleyen olmadan lipit sisteminde olan oksidasyon, peroksidasyon ise yine lipit sisteminde peroksil kısım tarafından indüklenen oksidasyon olarak tanımlanabilir. Oksidasyon ise oksijenle reaksiyona giren lipitler anlamında kullanılan genel bir terimdir (78).

##### 2.6.4.1. Lipit Peroksidasyonunun Mekanizması

Lipit peroksidasyonu üç temel aşamada incelenmektedir.

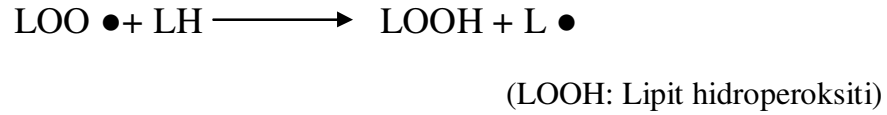
Serbest radikalın, bir yağ asidinin (LH) metilen kısmından bir hidrojen atomu kopararak lipit radikali oluşturur. Bu safha lipit peroksidasyonu, **başlama safhası** olarak bilinir (80).



Bu reaksiyonu serbest radikallerden başka değişik demir-oksijen kompleksleri de başlatabilir ve reaksiyon mevcut olan okside olmamış yağ asitleri ve oksijen kaynakları tükeninceye kadar devam edebilir (78). Lipit radikaline O<sub>2</sub> ilavesi ile lipit peroksil radikali oluşmaktadır. Bu aşamada **çoğalma safhası** başlamaktadır (79).

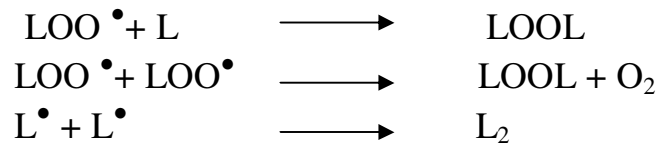


Oluşan lipit peroksil radikali başka yağ asitleri ile reaksiyona girerek yeni lipit radikallerini oluştururken kendisi de lipit hidroperoksiti haline geçer. Lipit peroksil radikalleri sadece yağ asitleri ile etkileşime girmekle kalmaz aynı zamanda karbonhidratlar ve peptitler gibi diğer biyolojik moleküllerle de reaksiyona girerek yapılarını bozarlar (79).



Lipit hidroperoksiti, lipit peroksidasyon olayının ilk oluşan kararlı bileşimidir ve Fe<sup>+2</sup> ve Cu<sup>+</sup> gibi geçiş elementlerinin varlığında kolaylıkla bozulabilmektedir. Lipit hidroperoksitleri oksidasyon düzeyini belirlemede de kullanılır (79).

Sonlanma aşamasında iki serbest radikal birbirleri ile reaksiyona girerek radikal olmayan ürünlere dönüşürler (82).



### 2.6.5. Antioksidanlar ve Savunma Mekanizmaları

Antioksidanların tanımlanması çeşitli şekillerde olmaktadır. Genel terim olarak antioksidanlar lipit peroksidasyonunu engelleyen inhibitörler olarak belirtilirler. Halliwell ve ark'na göre, antioksidanlar düşük konsantrasyonlarda okside edici ajanlarla karşılaştıklarında bu ajanlarla yarışarak substratın oksidasyonunu geciktiren veya engelleyen maddeler olarak tanımlanmışlardır (78).

Antioksidanlar etkilerini başlıca şu şekillerde gösterirler:

1. Reaktif oksijen türlerinin enzimsel reaksiyonlar aracılığı ile veya doğrudan temizlenmesi
2. Reaktif oksijen türlerinin baskılama yoluyla engellenmesi
3. Metal iyonlarının bağlanması ve böylece radikal oluşum reaksiyonlarının engellenmesi
4. Hedef moleküllerin hasar sonrası tamiri veya temizlenmesi (79).

Antioksidanlar çeşitli şekillerde sınıflandırılabilir;

- 1) Yapılarına göre
  - a) Enzimler
  - b) Enzim olmayan proteinler, küçük moleküller
- 2) Kaynaklarına göre
  - a) Organizmaya ait olanlar (endojen antioksidanlar)
  - b) Dışarıdan alınanlar (ekzojen antioksidanlar)
- 3) Çözünürlüklerine göre
  - a) Suda çözünenler
  - b) Lipitlerde çözünenler
- 4) Yerleşimlerine göre
  - a) Hücre içinde bulunanlar
  - b) Ekstraselüler sıvılarda bulunanlar (85).

Canlı organizmada normal metabolizma sırasında ya da patolojik yollarla ortaya çıkan serbest radikallerin oksidatif strese neden olmadan antioksidanlar aracılığıyla ortadan kaldırılması aşamasında çeşitli savunma mekanizmaları geliştirilmiştir (82).

Antioksidan savunma mekanizmalarını kısaca özetleyecek olursak;

- a) Ajanlar serbest radikalleri ve diğer reaktif türlerini katalitik olarak uzaklaştırırlar. Süperoksit dismutaz, katalaz ve peroksidaz enzimleri bu kısımda yer alır.
- b) Demir, bakır ve hem gibi pro-oksidanların varlığında proteinler yapar. Transferrinler, heptaglobinler, hemopeksinler ve metalloproteinler bu kısımda yer alır.
- c) Proteinler farklı mekanizmalarla biyomolekülleri oksidatif hasara karşı korurlar.

d) Küçük molekülü ajanlar reaktif oksijen ve reaktif azot türlerini (ROS/RNS) süpürürler. Glutasyon, askorbik asit ve  $\alpha$ - tokoferol örnek olarak verilebilir (80).

Biyolojik sistemlerdeki antioksidan savunma sistemi elemanları aşağıdaki Tablo 2.5'te verilmiştir (79).

**Tablo 2.6:** Antioksidan savunma sistemi elemanları (81)

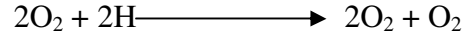
Enzimatik antioksidanlar	Enzimatik olmayan antioksidanlar
<b>Birincil olanlar</b>	Vitamin E
Süperoksit dismutaz	Vitamin C
Se bağımlı glutasyon peroksidaz	Glutasyon
Glutasyon S- transferaz	Flavonoitler
Katalaz	Butillenmiş hidroksianizol
	Butillenmiş hidroksitoluen
	Ebselen
<b>İkincil olanlar</b>	$\beta$ - karoten
NADPH- kinon oksidoretüktaz	Ürat
Glutasyon S-transferaz	Seruloplazmin
Epokist hidrolaz	Transferin
UDP- Glukuronil transferaz	Albumin
Sulfonil transferaz	Haptogloblin
Glutasyon redüktaz	Likopen
Glukoz -6- fosfat dehidrogenaz	Metallotiyonein
6-fofoglukonat dehidrogenaz	Bilirubin
İzositrat dehidrogenaz	Ubikinon
GSSG ve Konjugat taşıyıcılar	Deferoksamin
	Melatonin
	Sistein
	Ferritin
	Mannitol
	Oksipurinol
	Probukol

### 2.6.5.1. Enzimatik Olan Koruyucu Sistemler

#### *Süperoksit dismutaz (SOD)*

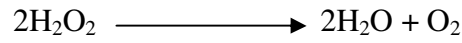
Hücre membranlarında ve DNA üzerinde doğrudan veya dolaylı olarak hasar yapan süperoksit anyon radikalinin aerobik organizmalarda ortamdan uzaklaştırılmasının hayati önemi vardır. Süperoksit anyon radikalinin organizmadan uzaklaştırılması işleminden sorumlu olan süperoksit dismutaz enzimidir. Süperoksit dismutaz enziminin 3 farklı tipi vardır: metal içeren süperoksit dismutaz enzimi (Fe-SOD), manganez içeren süperoksit dismutaz enzimi (Mn-SOD), bakır/çinko içeren süperoksit dismutaz enzimi

(Cu, Zn-SOD)(80). Bu enzim süperoksit anyon radikalini hidrojen peroksit radikaline dönüştürerek etkisiz hale getirir (82).



### ***Katalaz (CAT)***

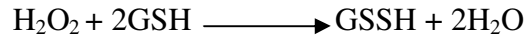
H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> biyolojik sistemler için zararlıdır ve •HO oluşumunu arttırmaktadır. Bu yüzden oluşan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'nin uzaklaştırılması hücreler için gereklidir. Bu amaçla hücre içinde H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'yi yıkan enzimlerden birisi de katalazdır (81).



Genellikle peroksizomlarda, sitozolde ve mikrozomal fraksiyonlarda da az da olsa bulunmaktadır (86).

### ***Glutasyon peroksidaz (GSH-Px)***

Glutasyon peroksidazlar selenoenzimlerdir yani fonksiyonları bu minerallerin varlığına bağlıdır. Herbir glutasyon peroksidaz enzimi 4 selenyum atomu içerir (77). Bu enzim hidrojen peroksitin suya dönüşmesinden sorumludur. Glutasyon peroksidaz bu reaksiyon sonucu yükseltgenmiş glutatyona dönüşür (82).



Glutasyon peroksidazın bazı tipleri yalnızca sitozolde bulunmaktadır. Bununla beraber diğer tiplerinin membran üzerinde koruyucu etkileri vardır. Bu enzim aynı zamanda mitokondride de bulunmaktadır (78).

### **2.6.5.2 Enzimatik Olmayan Koruyucu Sistemler**

Enzimatik olmayan koruyucu ajanlar ekzojen ve endojen kaynaklı olabilirler. Bunlardan en önemlileri C vitamini, E vitamini, fenolik bileşikler ve karotenoitlerdir (79).

#### **E Vitamini**

E vitamini tokoferol yapısında olup ilk olarak 1922 yılında izole edilmiştir. α, β, γ ve δ olarak adlandırılan 4 tokoferol karışımıdır. Doğada dağılımı en geniş ve biyolojik aktivitesi en yüksek olan α-tokoferol'dür. Bu nedenle güçlü bir antioksidandır.

Yapısında bulunan fenolik hidroksil gruplu aromatik halka, vitaminin kimyasal olarak aktif olan kısmını oluşturur (81).

$\alpha$ - tokoferol dokularda değişik konsantrasyonlarda bulunmaktadır. Özellikle mitokondri ve mikrozom gibi membrandan zengin hücre kısımlarında bulunur. Bitkisel yağlar ve tohumlar zengin E vitamini kaynaklarıdır (81).

E vitamini hücre membran fosfolipitlerinde bulunan çoklu doymamış yağ asitlerini serbest radikallerin etkisinden koruyan ilk savunma elemanıdır. E vitamini  $O_2^{\bullet-}$ ,  $\bullet HO$ , singlet  $O_2$ , lipit peroksi radikallerini ve diğer radikalleri temizler (81).

### **C Vitamini**

C vitamini suda çözünebilen, optikçe aktif, beyaz kristalize bir madde olup genellikle askorbik asit olarak bilinmektedir. Güçlü bir antioksidan olarak doğada yaygın halde bulunur. Vücutta sentezlenemez ve diyetle dışarıdan alınır (87).

C vitamini hücrede birçok hidroksilasyon reaksiyonlarında indirgeyici ajan olarak görev yapar. Güçlü indirgeyici aktivitesinden dolayı aynı zamanda güçlü bir antioksidandır (81). Askorbik asit, E vitamini ile birlikte Düşük Yoğunluklu Lipoproteinlerin (LDL) oksidasyonunu engellemektedir. C vitamini bazı durumlarda prooksidan özellik gösterir. Ortamda C vitamini ile birlikte  $Fe^{+3}$  iyonları da varsa C vitamini bu iyonları  $Fe^{+2}$  formuna indirger.  $Fe^{+2}$  iyonları ise hidrojen peroksit ile etkileşime girerek süperoksit radikalinin oluşmasına neden olur ve prooksidan özellik bu şekilde ortaya çıkar (82).

### **Karotenoitler**

A vitamininin metabolik ön maddesi olan  $\beta$ -karoten en önemli karotenoitlerdendir. Bitkilerdeki kloroplast membranının bir bileşenidir. Son derece güçlü bir singlet  $O_2$  temizleyicisi olup ayrıca  $\bullet HO$ , peroksi ve alkoksi radikalleriyle de doğrudan reaksiyon vererek lipit peroksidasyon zincir reaksiyonunu önleyebilir (81).

$\beta$ -karoten sahip olduğu uzun konjuge çifte bağlarından dolayı radikal ataklar için oldukça mükemmel bir substrattır. Işığa maruz kaldıklarında derhal parçalanırlar. Bu nedenle çeşitli antioksidan deneylerinde oksidasyona bağlı olarak ışık ve renge bağlı oluşan absorbanlar kullanılarak aktivite ölçümü yapılır (78).

$\beta$ -karoten şartlara bağı olarak hem antioksidan hem de prooksidan özellikler gösterebilir. Tokoferollerle birlikte lipit peroksidasyonunun inhibisyonunda sinerjistik etki gösterebilir (78).

### **Polifenoller**

Aromatik halkasında bir ya da daha fazla hidroksil grubu taşıyan maddeler fenolik maddelerdir. Fenolik maddelerin bir araya gelmesi ile polifenolik maddeler oluşur. Polifenollerden antioksidan etkisi C ve E vitamininden bile daha güçlü olan bir grup vardır ki, bu grup flavonoidler olarak adlandırılır ve C6-C3-C6 yapısına sahiptirler ve bitkilerde genellikle glikozit halinde bulunmaktadır. Flavonoidler serbest radikal süpürücü etkileri yanında metallerle şelat oluşturarak muhtemel serbest radikal oluşumlarının da önüne geçerler (79).

### **Ürik asit**

İnsan dokuları urat oksitaz içermez ve bu nedenle pürin metabolizmasında son ürün olarak ürik asit oluşur. Ürik asit singlet  $O_2$ , peroksil radikalleri,  $\bullet HO$ , ozon ve HOCl için güçlü bir temizleyicidir ve *in vivo* antioksidan olarak kabul edilir (81)

### **Melatonin**

Melatonin  $\bullet HO$  temizleyen güçlü bir antioksidandır. Lipofilik bir madde olduğu için kan-beyin bariyeride dahil olmak üzere bir çok kompartımana girerek geniş bir alanda antioksidan aktivite gösterir. Bu özelliği ile diğer antioksidanlara karşı üstünlük sağlamaktadır. Diğer bazı antioksidanlar gibi prooksidan özellik göstermez (81).

### **Ubikinon**

Ubikinon lipofilik bir antioksidandır ve soya yağı ile balık başlıca doğal kaynaklarıdır. En önemli ubikinon, ubikinon-10 (koenzim-Q) dur. Çok güçlü bir antioksidan değilse de E vitamini gibi güçlü bir antioksidan maddenin rejenerasyonunda rol oynar (79).

### **3. GEREÇ VE YÖNTEM**

#### **3.1. ÇALIŞMALARDA KULLANILAN MATERYAL VE KİMYASAL MADDELER**

##### **3.1.1. Bitkisel Materyal**

Deneyel çalışmalarda kullanılan *Alchemilla mollis* (Buser) Rothm. Kayseri: Kıranardı Bölgesinden 2012 yılı Haziran ayında çiçeklenme mevsiminde toplandı. Bitkinin herbaryum örnekleri Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Herbaryumu'nda muhafaza edilmektedir (AEF 26256).

##### **3.1.2. Kimyasal Maddeler**

Deneylerde kullanılan tüm kimyasal maddeler analitik kalitededir. Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi analizlerinde YBSK kalitesinde çözücüler ve standart maddeler kullanılmıştır. Tüm deneylerde kullanılan su ise distile sudur.



Şekil 3.1: *Alchemilla.mollis*'in herbarium örneği (AEF 26256).

### 3.1.3. Kullanılan Aletler

Santrifüj cihazı ( Nüve ST 402)

Ultrasonik banyo (Elma S 100H Elmasonic)

Vorteks karıştırıcı (Velp scientifica )

pH metre (Inolab pH 720 WTW )

Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi Cihazı (Agilent Technologies 1200 Series)

Mantolu ısıtıcı (Wise TERM )

Mikroskop (Zeiss Primo Star)

Kül fırını (Nüve MF 120)

Spektrofotometre (Shimadzu UV-1800 )

Mikroplaka okuyucu ( Biotek Synergy HT )

Taramalı Elektron Mikroskobu (Leo 440, Polaron SC7620 Sputter Coater)

### 3.2. ANATOMİK VE MORFOLOJİK ÇALIŞMALAR

Morfolojik çalışmada çiçek örneklerinin elemanları incelenerek mikroskop görüntüleri fotoğraflanmıştır.

Anatomik çalışma için *A. mollis* türünün yaprak yüzeysel ve enine kesitleri ile gövde enine kesitleri alınarak Sartur ve kloralhidrat reaktifleri ile preparatları hazırlandı (87). Daha sonra 4×, 10× büyütme ile genel ve 40× büyütme ile de anatomik görüntüleri için ışık mikroskobuna bağlı tam otomatik fotoğraf makinesi kullanılarak (ZEISS Primostar 415500 ) fotoğrafları çekildi.

Ayrıca Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM-Scanning Electron Microscopy) ile herbaryum materyalinden alınan yaprak alt ve üst yüzeyleri, üzerinde iki taraflı yapıştırıcı bant bulunan metal numune taşıyıcı olan stap üzerine ve binoküler mikroskop altına yerleştirildi. Yaprak örneklerinin iletken duruma geçebilmesi ve elektron mikroskop ekranında görüntü verebilmesi için altınla kaplandı.

İncelenen yaprakların genel görünüşleri ile yüzey ayrıntıları (stoma, tüyler gibi) gösteren mikrofotoğrafları Erciyes Üniversitesi Teknoloji Araştırma ve Uygulama Merkezi (TAUM)'da bulunan LEO 440 Polaron SC7620 Sputter Coater marka SEM mikroskobunda çekildi.

### 3.3. DENEYSEL ÇALIŞMA

Bu bölümde *A. mollis* toprak üstü kısımları üzerinde yapılan ekstraksiyon işlemleri, farmakope analizleri, ekstrele yapılan miktar tayini ve antioksidan aktivite çalışmaları hakkında bilgi verilmektedir.

#### 3.3.1. Ekstrelerin Hazırlanışı

Bitkisel materyallerin kurutulmuş toprak üstü kısımları kaba toz edildikten sonra bir kısmı (100 g) Soxhlet (devamlı ekstraksiyon) apareyinde çözücü olarak sırasıyla hekzan, etilasetat, metanol ve bütanol kullanılarak 8'er saat süreyle ekstre edildi. Elde edilen ekstratlar vakum altında rotavaporda (< 40 °C ) yoğunlaştırıldı. Diğer yandan 100 g toz edilmiş bitki geri çeviren soğutucuda 1 saat boyunca kaynatılarak su ekstresi elde edildi ve rotavaporda yoğunlaştırıldı. Diğer bir kısmı da (100 g) çalkalayıcı su banyosunda %70'lik metanolla 3 gün boyunca ekstre edildi ve yine rotavaporda yoğunlaştırıldı. Tüm ekstratlar liyofilize edildi ve analiz anına kadar -18 °C de saklandı.

### 3.3.2. Kompozisyon Analizleri

Bitkisel materyallerden elde edilen ekstreler fenolik bileşikler bakımından spektrofotometrik ve kromatografik olarak incelendi.

#### 3.3.2.1. Toplam Fenol Miktar Tayini

Ekstrelerin içerdikleri toplam fenol miktarı gallik asite eşdeğer olarak Folin-Ciocalteu yöntemi kullanılarak hesaplandı (89). 6 mL distile su içeren 10mL'lik kap içerisine 100 µL örnek çözeltisi ve 500 µL Folin-Ciocalteu reaktifi ilave edildi. 1 dakika sonra 1.5 mL %20'lik sulu Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> ilave edilip 10 mL'ye su ile tamamlandı. Kontrol olarak ekstre içermeyen reaktif karışımı kullanıldı. 25 °C'de 2 saat inkübe edildikten sonra 760 nm'de absorbansı ölçüldü ve gallik asit kalibrasyon eğrisi ile karşılaştırıldı. Toplam fenolik madde miktarı gallik asite eşdeğer olarak hesaplandı. Deneyler üç paralel olacak şekilde yapıldı ve sonuçlar ortalama değerler olarak verildi.

#### 3.3.2.2. Toplam Flavonoit Miktar Tayini

Ekstrelerin içerdikleri toplam flavonoit miktarları rutine eşdeğer olarak (RE) mg<sub>RE</sub>/g<sub>ekstre</sub> olarak hesaplandı (90). 1mL metanolde hazırlanmış ekstre (10g/L), 1mL etanolik alüminyum triklorit (20 g/L) ile karıştırıldı. 25 mL'ye etanolla seyreltildi. Çözeltilerin absorbansları 20 °C'de 40 dakika bekletildikten sonra 415 nm de ölçüldü. Kontrol olarak 1mL ekstre ve 1mL asetik asetin 25mL etanolik çözeltisi hazırlandı. Rutinin kalibrasyon eğrisi aynı şekilde etanol kullanılarak hazırlandı. Bütün ölçümler 3 paralel olacak şekilde yapıldı ve ortalama değerler alındı.

#### 3.3.2.3. Toplam Flavonol Miktar Tayini

Ekstrelerin içerdikleri toplam flavonol miktarları rutine eşdeğer olarak (RE) mg<sub>RE</sub>/g<sub>ekstre</sub> olarak hesaplandı (90). 2 mL bitki ekstresi (10g/L) 2 mL etanolik alüminyum triklorit (20 g/ L) ve 6mL sodyum asetat (50 g/L) karıştırıldıktan sonra 20 °C de 2.5 saat bekletildi ve 440 nm'de ölçüm yapıldı. Aynı işlemler kalibrasyon eğrisi hazırlamak üzere 0.5-0.015 mg/mL konsantrasyonlardaki etanolik rutin çözeltileri ile gerçekleştirildi. Bütün ölçümler üç paralel olarak yapıldı ve ortalama değerler kullanıldı.

### 3.3.2.4. Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografisi ile Analiz

YBSK çalışma şartları:

Cihaz : Agilent sıvı kromatografisi sistemi

Dedektör : PDA dedektör (200-500 nm arası)

Kolon : Inertsil ODS-3 (4.6 × 150 mm. 5µ partikül çapı )

Sıcaklık : 22 °C

Akım hızı : 1mL/dak

Hareketli faz : A) % 0,5'lik ortofosforik asit (H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>), B) Asetonitril (AcCN)

Gradient akış :

Zaman (dk)	Hareketli faz A (%)	Hareketli faz B (%)
0	90	10
2	90	10
5	85	15
7	85	15
10	80	20
13	75	25
20	70	30
25	60	40
30	60	40
35	50	50
38	25	75
40	25	75
42	90	10
50	90	10

YBSK'da ayrılan bileşiklerin tutunma zamanları ve UV spektrumları standartlarla karşılaştırılarak tanımlanmıştır. Bütün standart ve örnek çözeltiler üçer kez analiz edilerek ortalama değerler verilmiştir.

### **3.3.3. Farmakope Analizleri**

Bitkinin kurutulmuş toprak üstü kısımlarına Türk Farmakopesi'ne ve Avrupa Farmakopesi'ne göre çeşitli kalite analizleri uygulanmıştır.

#### **3.3.3.1. Toplam Kül ve Asitte Erimeyen Kül Miktar Tayini**

Sabit tartıma getirilen krozeye 1-2 g kadar bitki örneği konulduktan sonra tam olarak tartımı alındı ve açık alevde duman çıkmayana kadar yakıldı. Daha sonra 800°C de kül fırınında tamamen yanıcaya kadar bırakıldı ve desikatörde soğutulup tartımı alındı. Ağırlık farkı % olarak hesaplandı (91).

Bütün kül olarak kroze kalan miktar üzerinden asitte erimeyen kül miktarı bulunmak üzere krozeye 6mL su ve 4ml HCl ilave edildi. Karışım 10 dakika su banyosunda kaynatıldıktan sonra yakıldığında kül bırakmayan filtre kâğıdından süzülde. Kağıt ve bakiye, yıkama suları nötr reaksiyon verene kadar sıcak su ile yıkandı. Filtre kağıdı, üzerindeki bakiye ile birlikte kroze alınıp kül fırınında 800°C de yakıldı. Desikatörde soğutuldu ve tartıldı. Boş kroze ağırlığı çıkarılarak yüzde miktarı hesaplandı (91).

#### **3.3.3.2. Volümetrik Yöntemle Su Miktar Tayini**

Uçucu yağ taşıyan droglara uygulanan bu yöntemde drogdaki suyun su tayin apareyi kullanılarak ksilen buharı ile sürüklenmesi ve soğutucu da ayrılan suyun dereceli kısımda toplanıp ölçülmesiyle tayin edildi (29). 20 g kaba toz haldeki bitki numunesi bir balona aktarılıp su ile doyurulmuş ksilen ile 3 saat kaynatıldı. Apareyin dereceli kısmında toplanan su-ksilen karışımının ayrılması beklendikten sonra tüpün dip kısmında toplanan su miktarı mL cinsinden okunup % (h/a) olarak hesaplandı.

### 3.3.4. Antioksidan Aktivite Çalışmaları

#### 3.3.4.1. İndirgenme Gücünün Belirlenmesi

Ekstrelerin demir (III)'ü indirgeme kapasiteleri Oyaizu 1986 yöntemine göre yapıldı. 1 mL ekstre çözeltisi 2.5 mL 0.2 M fosfat tamponu (pH 6.6 ) ve 2.5 mL %1' lik potasyum heksaziyanoferrat çözeltisi ile karıştırıldı. 50 °C'de 30 dakika inkübe edildikten sonra 2.5 mL % 10'luk trikloro asetik asit (TCA) ilave edildi ve karışım 10 dakika santrifüj edildi. Son olarak, 2.5 mL üst kısım, 2.5 mL su ve 0.5 mL %1'lik FeCl<sub>3</sub> ilave edilip karıştırılarak 700 nm'de absorbansları okundu. Ekstrelerin indirgenme güçleri askorbik asite eşdeğer olarak (AscAE) mmol askorbik asit/g örnek olarak verildi (92). Büyük AscAE değeri zengin indirgenme kapasitesini göstermektedir. Tüm analizler üç paralel olarak çalışıldı ve ortalama değerler olarak verildi.

#### 3.3.4.2. 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH<sup>•</sup>) Radikalini Süpürücü Etki Tayini

Ekstrelerin DPPH<sup>•</sup> radikalini süpürücü etkileri Gyamfi ve ark.'nın metoduna 1999 göre yapılmıştır (93). Tris-HCl tamponu (50 nM, p.H 7.4) ve 1mL 0.1 mM metanolde hazırlanmış 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil çözeltisi (DPPH<sup>•</sup>) ile karıştırıldı. Kontrol olarak ekstre içermeyen reaktif karışımı ve pozitif kontroller (BHT, BHA, askorbik asit ve gallik asit) kullanıldı. Oda sıcaklığında ve karanlıkta 30 dakika inkübe edildikten sonra absorbanslar 517 nm'de okundu. İnhibisyon yüzdesi aşağıdaki eşitlik kullanılarak hesaplandı. IC<sub>50</sub> değerleri nonlinear regregasyon eğrileri kullanılarak (Sigma Plot 2001 versiyon7.0, SPSS Inc., Chicago IL) hesaplandı. Analizler 3 paralel olarak hesaplandı ve ortalama dğerler kullanıldı.

$$\% \text{ inhibisyon} = [(Abs_{\text{kontrol}} - Abs_{\text{örnek}}) / Abs_{\text{kontrol}}] \times 100$$

#### 3.3.4.3. $\beta$ -karoten / linoleik asit Birlikte Oksidasyonunu İnhibe Edici Etki Tayini

Ekstrelerin antioksidan aktivitesi  $\beta$ -karoten soldurma deneyine göre yapıldı (94-95). Tween 20 (1200mg) ve linoleik asit (120mg) tartılıp kloroformla yıkanarak bir kaba alındı daha sonra bu kaba 1.2 mL  $\beta$ -karoten (1mg/mL kloroform içerisinde) eklendi ve karışımdaki kloroform rotavoporda uçurularak uzaklaştırıldı. 300 mL distile su eklenerek yavaşça karıştırıldı. Kontrol, standart ve örnekler konulmadan aynı prosedürle hazırlandı. Kontrol ve örneklerin şahitleri ise aynı şekilde  $\beta$ -karotensiz olarak ayrıca hazırlandı. Ekstreler ve standartlar ve kontroller hazırlanan emülsiyonlarla beraber

tüplere aktarıldı ve 470 nm'de spektrofotometrede ölçümleri alındı. Daha sonra tüplerdeki bu örnekler otooksidasyon için 50 °C'de 105 dakika su banyosunda bekletildi ve her 15 dakikada bir ölçüm yapılarak solma derecesi izlendi. Deneyler üç paralel olarak tekrarlandı ve ortalama değerleri hesaplandı.

$$AA\% = [1 - (\text{Abs}^0_{\text{örnek}} - \text{Abs}^{105}_{\text{örnek}}) / (\text{Abs}^0_{\text{kontrol}} - \text{Abs}^{105}_{\text{kontrol}})] \times 100$$

### 3.3.4.5. 2,2'-azino-bis (3- etilbenzotiazolin-6- sulfonik asit) (ABTS<sup>•+</sup>) Radikalini Süpürücü Etki Tayini

Ekstrelerin ABTS<sup>•+</sup> radikalini süpürücü etkilerine bakıldı (96). ABTS<sup>•+</sup> radikali (7 mM) ABTS' in sulu çözeltisi ile K<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub> ( 2.45 mM, son konsantrasyon)'un karanlıkta 12-16 saat bekletilmesiyle meydana getirildi ve absorbansı oda sıcaklığında 734 nm'de 0.700 (±0.030) olacak şekilde ayarlandı. Bu şekilde hazırlanan radikal çözeltisi (990 µL) ile ekstre çözeltileri ( 10 µL ) karıştırıldı ve 734 nm'de 1 dakikalık aralıklarla 15 dakika süresince reaksiyon kinetiği ölçüldü. Konsantrasyona karşı ölçülen inhibisyon yüzdeleri Troloks'a eşdeğer olarak (TEAC) hesaplandı

### 3.3.4.6. Askorbat –Fe (III)-Katalizli Fosfolipit Peroksidasyonunun İnhibisyonu

Ekstrelerin hidroksil radikalini süpürücü etkilerine bakıldı (97). Sığır beyin ekstresi (Bovine brain extract, Folch VII) 10 mM PBS (pH 7.4) ile karıştırılıp buz banyosu içerisinde şeffaf bir süspansiyon olana kadar ( 5mg/ mL fosfolipit lipozomu) tutuldu. 0.2 mL lipozom, 0.5 mL PBS tamponu, 0.1 mL 1 mM FeCl<sub>3</sub> ve 0.1 mL ekstre çözeltisi ile karıştırıldı. Peroksidasyon reaksiyonunu hızlandırmak için 0.1 mL askorbat çözeltisi ilave edildi. Karışım 37 °C'de 60 dakika inkübe edildi. İnkübasyondan sonra öncelikle 50 µL %2'lik (a/h) butillenmiş hidroksi toluen (etanol içerisinde) daha sonra da 1 mL % 2.8 (a/h) trikloroasetik asit ve 1 mL % 1(a/h) 2-tiyobarbitürik asit (TBA, 0.05 M NaOH içerisinde) ilave edildi. Karışım 100 °C'de su banyosunda 20 dakika ısıtıldı. Reaksiyon sonucunda oluşan (TBA)2-MDA kromojenleri 2 mL bütanolle ekstre edildi. Bütanol fazlarının absorbansı 532 nm'de okundu. İnhibisyon yüzdeleri aşağıdaki formülle hesaplandı. Deneyler üç paralel olarak çalışıldı ve ortalama değerler verildi.

$$\% \text{ inhibisyon} = [( \text{Abs}_{\text{kontrol}} - \text{Abs}_{\text{örnek}} ) / \text{Abs}_{\text{kontrol}}] \times 100$$

### **3.3.5. Hücre Kültürü Çalışmaları**

Bu çalışmada Erciyes Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü'nden temin edilen MCF-7 (human breast adenocarcinoma cell line) hücreleri kullanıldı. Çalışmalar süresince bu hücreler +37 °C' de CO<sub>2</sub>'li inkübatörde delikli kapaklı hücre kültür kapları içinde tutuldu ve düzenli olarak takip edilip besiyerleri iki gün ara ile değiştirilerek kültür sürdürüldü. Çoğalan hücrelerin bir kısmı dondurulup -80 °C'de muhafaza edildi.

#### **3.3.5.1. MCF-7 Hücrelerinin Kültüre Edilmesi**

Ticari olarak satın alınan MCF-7 hücreleri, +37 °C' de çözülüp, hücrenin üzerine 5mL PBS ekleyerek 1600 rpm'de 5 dakika 20 °C'de santrifüj edildi. Süpernatant kısmı atıldıktan sonra hücre pelleti üzerine 5mL kadar taze besiyeri ekleyip yavaşça pipetleyerek homojenize edildi ve delikli hücre kültür kabına aktararak CO<sub>2</sub>'li inkübatöre kaldırıldı.

#### **3.3.5.2. MCF-7 Hücrelerinin Pasajı**

Flask içerisinde kültüre edilen hücreler iki günlük inkübasyon süresi sonunda, 15 mL' lik ependorf tüplere aktarıldı ve 800g'de +20 °C'de 5 dakika santrifüj edilip süpernatant kısmı uzaklaştırıldı. Pellet, penisilin içeren yaklaşık 5 mL PBS (pH;7,3) tamponu içinde hücrelere zarar vermeyecek şekilde çözülüp aynı koşullarda tekrar santrifüj edildi. Süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra oluşan pellet önceden hazırlanmış besiyeri içinde çözülerek kültür kabına aktarıldı.

Pasajlama işleminin iki gün arayla yapılma nedeni olası kontaminasyonlardan ve ölü hücre kalıntılarının zararlı etkilerinden canlı hücrelerin etkilenmesini önlemektir.

#### **3.3.5.3. Hücre Dondurma ve Saklama**

Hücreler besiyeri değiştirirken olduğu gibi santrifüj ve yıkama işlemlerine tabi tutuldu. Hücreler santrifüj edildikten sonra süpernatant atıldı. Hücreler 1 mL PBS ile süspand edilerek, steril tüpe aktarıldı ve üzerine 1mL krio çözeltisi karışımından eklendi (% 10 DMSO) ve hazırlanan krioların kademeli olarak donmalarını sağlamak için ilk olarak +4 °C'de yarım saat, -20 °C'de 3 saat bekletildikten sonra -80 °C'ye kaldırıldı -80'de donduruldu.

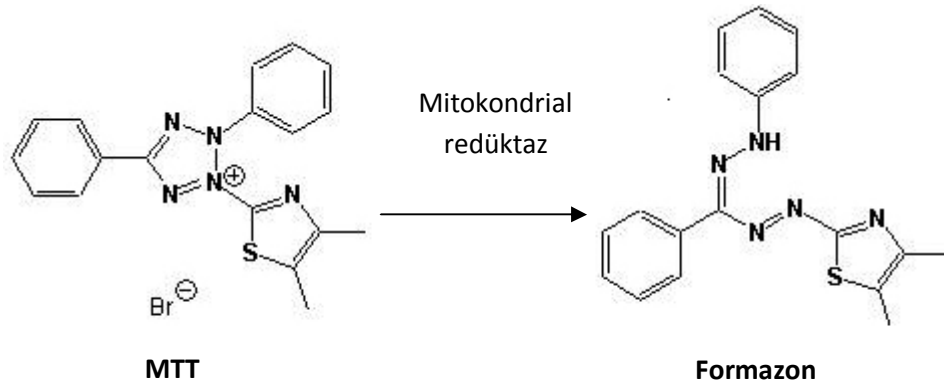
### 3.3.5.4. FCS'nin İnaktivasyonu

FCS besiyerinin en önemli besin kaynağıdır. İnaktivasyon işlemi ile ısıya duyarlı komplement proteinler denatüre edildi. Ayrıca 0,22 µm'lik filtreden geçirilmelerine rağmen mikoplazma gibi mikroorganizmalar hala ortamda mevcut olabileceği için ısıyla gerçekleştirilen bu inaktivasyon prosesi sayesinde besiyeri kontaminasyon riski azalmış oldu.

İNaktivasyon işleminde □ 20 °C'de muhafaza edilen FCS alınıp 37 °C'lik su banyosuna konuldu ve burada aralıklarla çalkalanarak erimesi sağlandı. Tamamen eridikten sonra 15 dakika kadar yine aralıklı olarak karıştırıldı ve FCS'nin ısısının 37 °C'ye gelmesi beklenip su banyosunun ısısı +56 °C'ye çıkarıldı. 5 dakika su banyosunu ısısının +56 °C'ye gelmesi beklenip ısı tamamen yükselince her 10 dakikada bir karıştırmak suretiyle yarım saat su banyosunda bekletildi süre sonunda steril tüplere bölünüp □ 20 °C'de saklandı.

### 3.3.5.5. Sitotoksik Etkinin Tetrazolyum Tuzu (MTT) Kolorimetrik Gelişme İnhibisyonu Testi ile Belirlenmesi

*Alchemilla* ekstrelerinin hücre canlılığı üzerine etkisi sarı renkli 3-(4,5dimethylthiazol-2yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromide (MTT) tuzunun mitokondriyal enzimler tarafından mor formazon kristallerine indirgenmesi prensibine dayanan MTT testi ile araştırılmıştır. Çözünebilir özellikteki MTT boyası, metabolik olarak aktif olan hücrelerin mitokondrilerinde bulunan süksinat dehidrogenaz (SDH) enzimi ile koyu mavi renkli çözünmez özellikteki formazan ürününe dönüşür (Şekil 3.2). Oluşan formazan ürünü çözünür hale getirilir ve oluşan mor renk spektrofotometrik olarak ölçülür (98).



Şekil 3.2: MTT boyasının formazana dönüşümü

İlk olarak  $5 \times 10^4$  hücre/kuyu yoğunluğunda hücre alınıp steril 96 kuyucuklu mikro plaka içine yerleştirildi. Farklı konsantrasyonlarda hazırlanan bitki ekstreleri hücreler üzerine uygulanarak 48 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyonun ardından kuyucuklardan üst kısımdaki ekstreler uzaklaştırıldı ve her bir kuyucuğa 20  $\mu$ L PBS içinde hazırlanmış MTT (5mg/mL) ve 180  $\mu$ L taze besiyer eklenerek 37°C, CO<sub>2</sub>'li etüvde 4 saat inkübasyona devam edildi. İnkübasyonun ardından yeniden hücrelerin üst kısımları uzaklaştırıldı ve 200  $\mu$ L DMSO eklenerek 5-10 dk sonra 570 ve 690 nm'de mikroplaka okuyucu ile spektroskopik ölçüm yapıldı. Çalışmada oluşabilecek varyasyonları azaltmak üzere eşzamanlı üç adet 96 kuyucuklu mikroplakaya uygulama yapıldı. Kontrol grubu hücrelerine çözücü olarak kullanılan DMSO uygulandı.

% Hücre canlılık = (Konsantrasyon O.D. / Kontrol O.D.)\*100 olarak hesaplandı.

## 4. BULGULAR

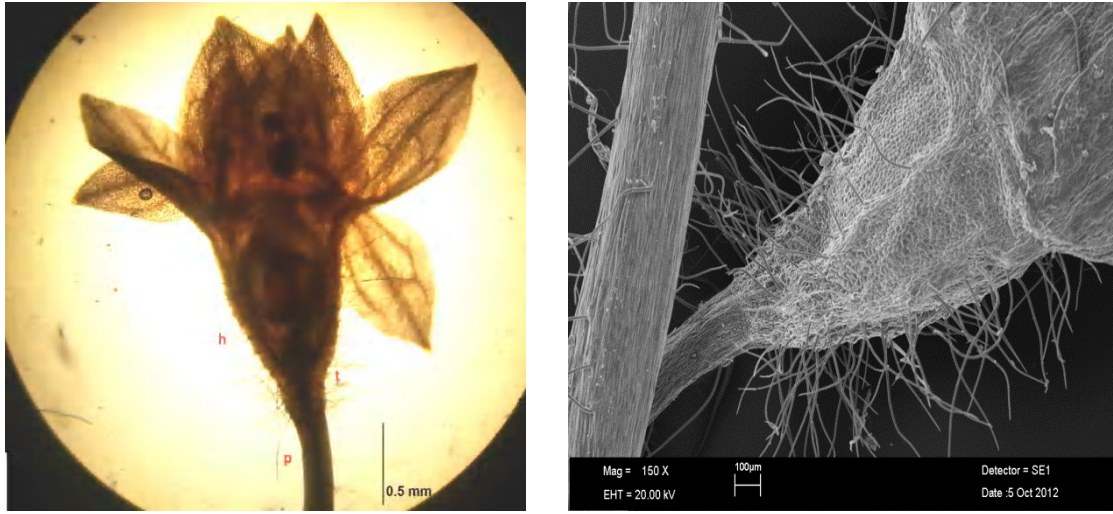
### 4.1. ANATOMİK VE MORFOLOJİK BULGULAR

Anatomik çalışmada türün yaprak ve pedisel gövdesinden enine kesitler alınmıştır. Ayrıca yaprakların üst ve alt yüzeyinden kesitler alınarak hazırlanan preparatların fotoğrafları çekilmiştir. Çiçeklerin morfolojik özellikleri incelenmiş ve fotoğraflanmıştır.

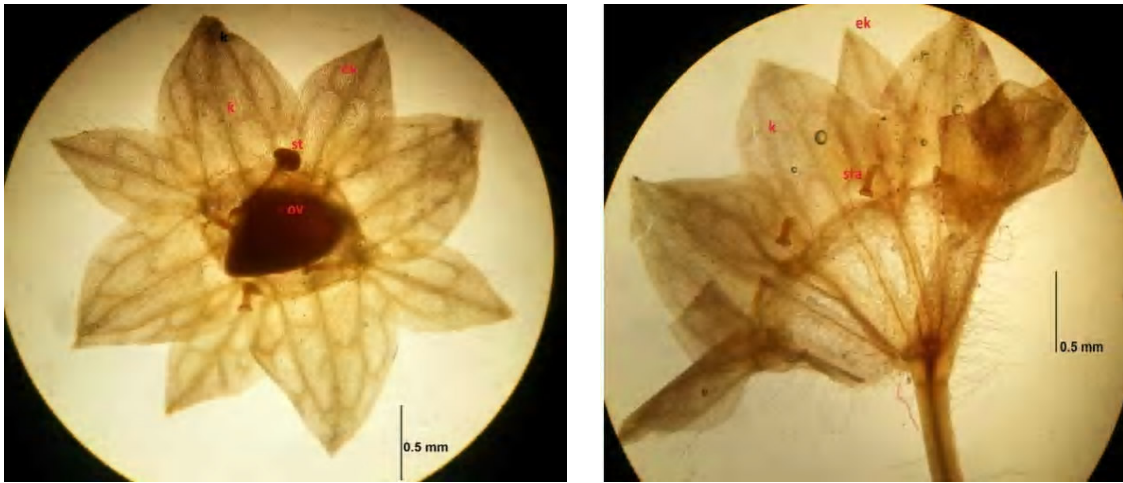
#### 4.1.1. *Alchemilla mollis* Türünün Çiçek Morfolojisi

Çiçekler 3,5-4 mm genişliğinde hipantiyum (perigin çiçekte yayık ve çukur şeklindeki çiçek tablası, reseptakulum) genellikle belirgin, pedisel ise nadiren tüylüdür (Şekil 4.1).

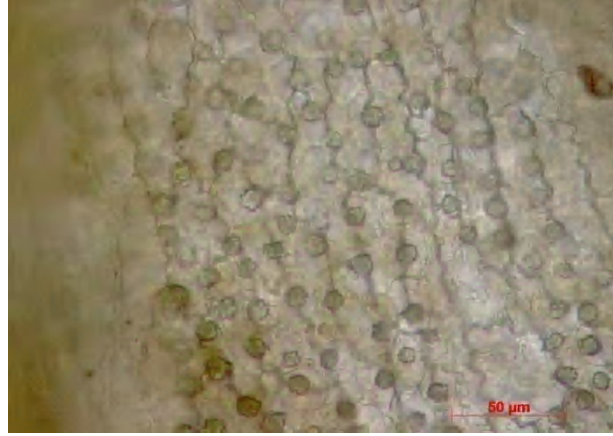
Epikaliks lobları ovat ya da ovat lanseolat, genellikle 1 dişli ve ovat şekilli sepallerden daha kısadır. Her ikisi de akut ve genellikle tüysüzdür. Petaller yoktur. Kaliks değişebilen şekilde 4 büyük segmentli olup, epikaliksin 4 küçük segmentinin yaklaşık iki katıdır (Şekil 4.2). Kaliks üzerinde bol miktarda druz kristalleri gözlenmiştir (Şekil 4.3).

**A****B**

**Şekil.4.1:** *A. mollis* çiçeği **A)** mikroskopik görüntüsü **B)** elektron mikroskobu ile hipantiyumun görüntüsü (h: hipantiyum, p: pedisel, t: tüyler)

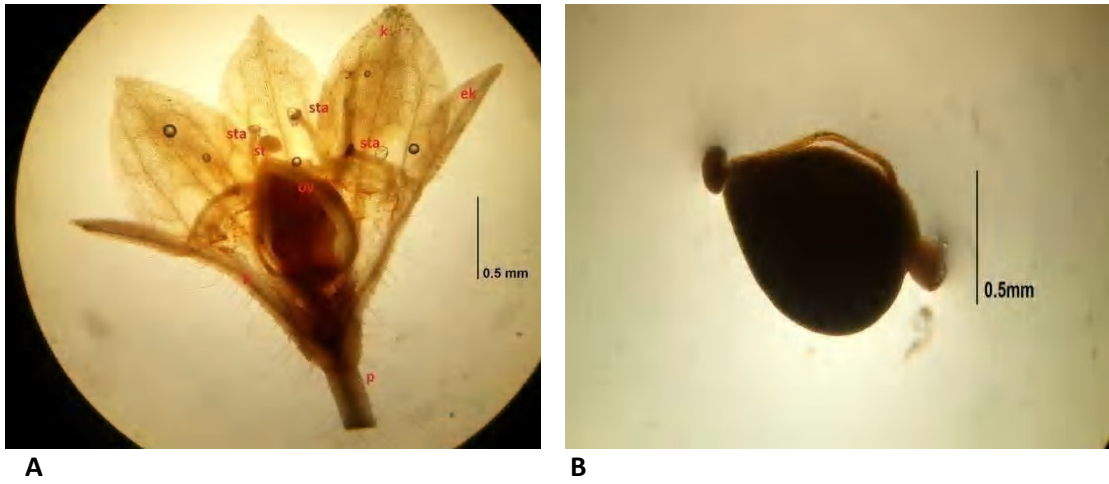
**A****B**

**Şekil 4.2:** **A)** Epikaliks ve kaliksin üstten görünüşü **B)** Epikaliks ve kaliksin yandan görünüşü (k: kaliks, ek: epikaliks, ov: ovaryum, sta: stamen)

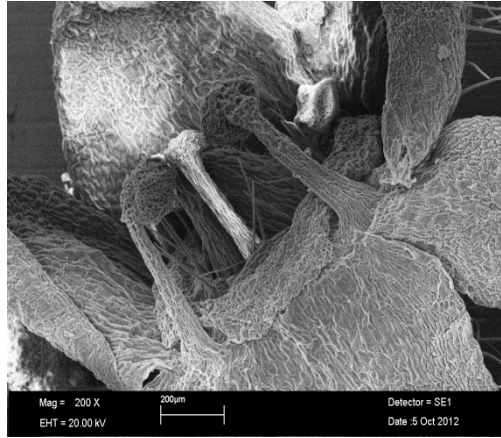


**Şekil 4.3:** *A. mollis* çiçeğinde kalikte druz kristalleri

Çiçekte 4 kısa stamen ve tek karpelli bir kapitat stigma mevcuttur (Şekil 4.4).



**Şekil 4.4:** *A. mollis* çiçeği **A)** stamenlerin mikroskopik görüntüsü **B)** kapitat stigmanın mikroskopik görüntüsü (sta: stamen, ov: avaryum, k: kaliks, ek: epikaliks, p: pedisel )



Şekil 4.5: *A. mollis* çiçeğinin ovaryum ve stamenleri (SEM)

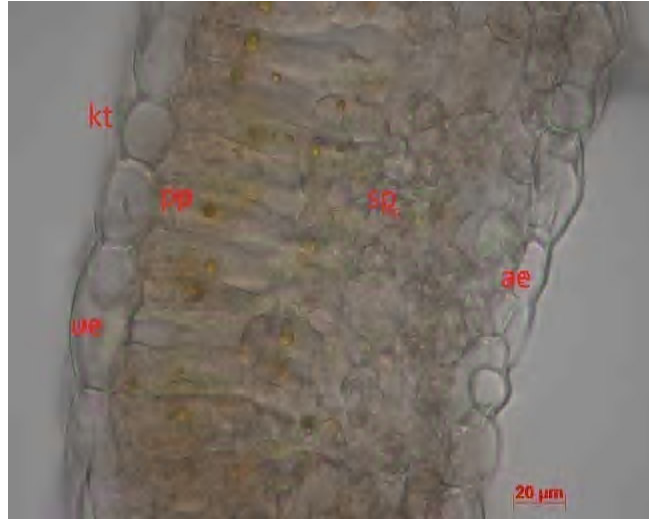
## 4.1.2. *Alchemilla mollis* Türünün Yaprak Anatomisi

### 4.1.2.1. Yaprak Ayası

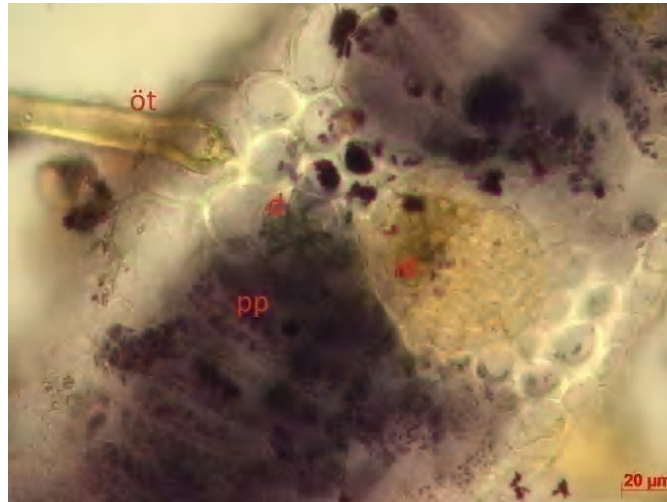
Bifasiyal bir yapraktır. Kütikula ince çeperlidir. Kütikulanın hemen altında üst epiderma hücreleri kare ya da dikdörtgeni şekilde olup dik duvarlı ve yer yer kalınlaşmıştır. Epiderminin altında yer alan palizat parankiması hücreleri genellikle iki sıralı olup ilk sıradakiler silindirik ve uzun, hücreler arası boşlukları çok azdır. İkinci sıradakiler ise daha kısa, düzensiz ve hücrelerarası boşlukları fazladır. Sünger parankiması hücreleri ince duvarlı farklı şekillerde ve hücrelerarası boşlukları vardır. Alt epiderma hücreleri tek sıralı ve ince çeperlidir (Şekil 4.6).



Şekil. 4.6: Yaprak ayası enine kesiti



**Şekil 4.7:** *A. mollis* yaprak ayası enine kesiti (kt: kütikula, ue: üst epiderma, pp: palizat parenkiması, sp: sünger parenkiması, ae: alt epiderma)



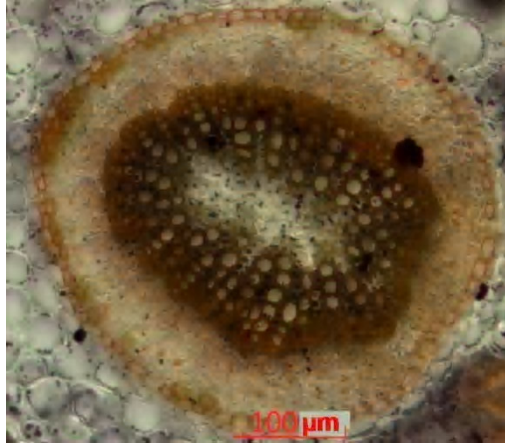
**Şekil 4.8:** *A. mollis* yaprak ayası enine kesiti (öt: örtü tüyü, d: druz, pp: palizat parenkiması, id: iletim demetleri)

#### 4.1.2.2. Yaprak Orta Damarının Enine Kesiti

Üst epiderma hücreleri tek sıralı ve ince çepmelidir. Epidermisin altında 1-2 sıralı kollenkima hücreleri yer alır. Merkezi iletim demetlerinin her biri 1-2 sıralı endodermis hücreleri ile çevrilidir. Floem hücreleri birbirlerinden farklı boyutlarda ve sık dizilişli olup, özdeki hücrelerle benzerdir. Floem hücrelerinin ardında genellikle tek sıralı olan sklerenkimatik hücreler ksilemi halka şeklinde çevrelemiştir. İletim demetleri dar primer ışınlarla ayrılmıştır (Şekil 4.9).



**Şekil 4.9:** *A. mollis* orta damar enine kesit (kt: kütikula, ue: üst epiderma, pp: palizat parenkiması, öt: örtü tüyü, e: endodermis, f: floem, ks: ksilem, ko: kollenkima )

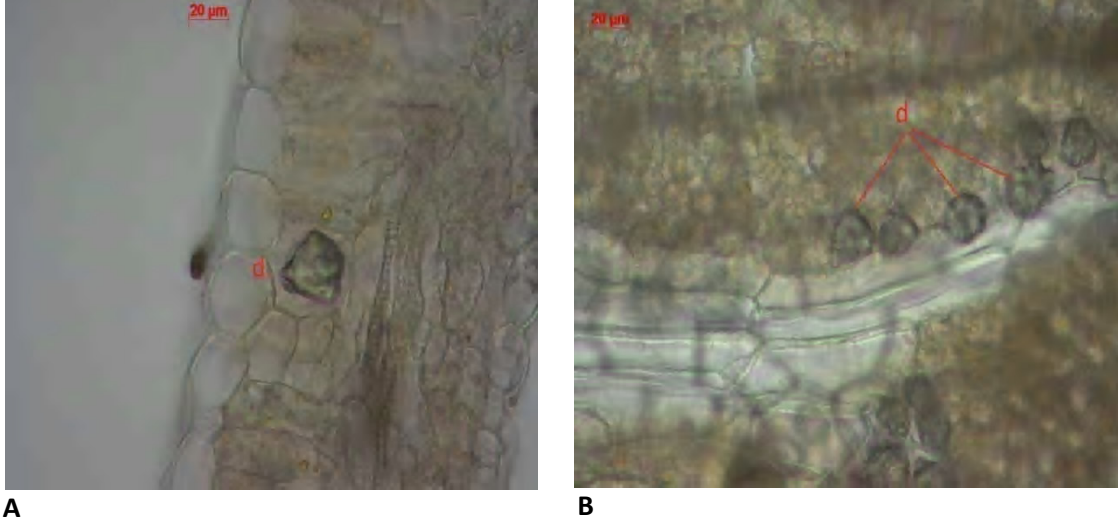


**Şekil 4.10:** Yaprak orta damarı enine kesitte merkezi iletim demetleri

#### 4.1.2.3. Yaprak Üst ve Alt Epiderması

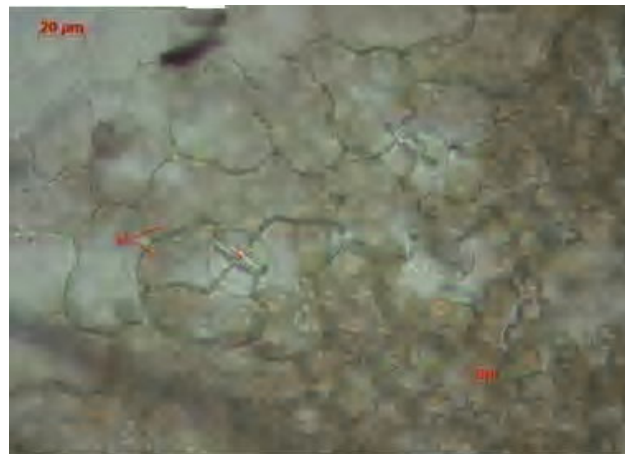
Alt epiderma hücreleri güçlü bir şekilde kıvrımlı hücre duvarlarına sahip olup mikroskop altında incelendiğinde zikzag şeklinde düzenlendiği tespit edilmiştir. Üst epidermis hücreleri düzensiz şekilli, yan duvarları orta derecede dalgalıdır. Bifasiyal bir yaprak olmasından dolayı üst epidermadan alınan kesitlerde epiderma hücreleri altında palizatlar görülmektedir. Epiderma altındaki palizat sayısı 4-10 arasında değişmektedir. Druz kristalleri, ince duvarlı parenkima hücreleri üzerinde tek bazen de diziler halinde gözlenmiştir. Alt epidermadan alınan kesitlerde de damarlar üzerinde druz kristal dizileri tespit edilmiştir (Şekil 4.11).

Stoma komşu hücreleri diğer epiderma hücrelerinden genellikle farklılık göstermeyen (anomositik) Ranunculaceae tipi stomaya sahiptir. Stomalar genellikle 4-5 komşu hücrelidir. Stoma komşu hücreleri kıvrımlı ve düzensiz bir yapıya sahiptir (Şekil 4.12).

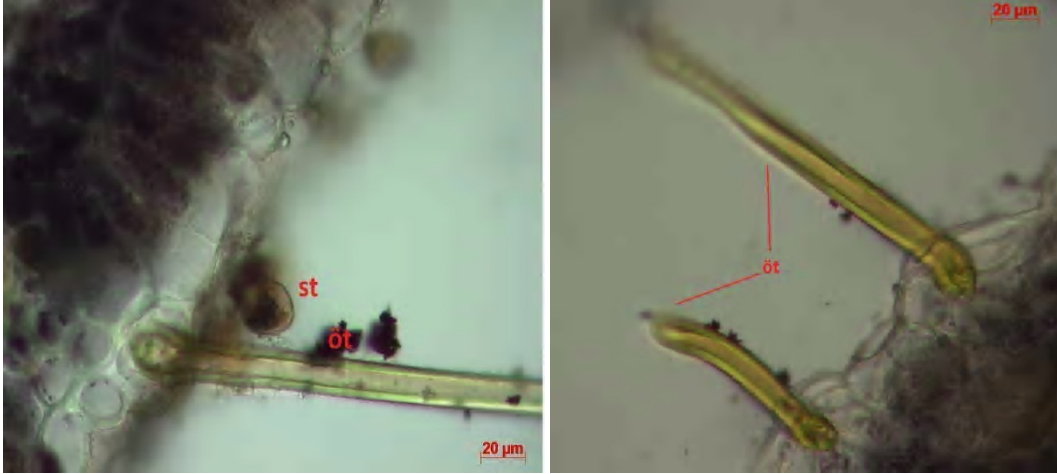


**Şekil 4.11:** Druz kristalleri **A)** Parenkima hücreleri üzerinde **B)** Alt epiderma orta damarda

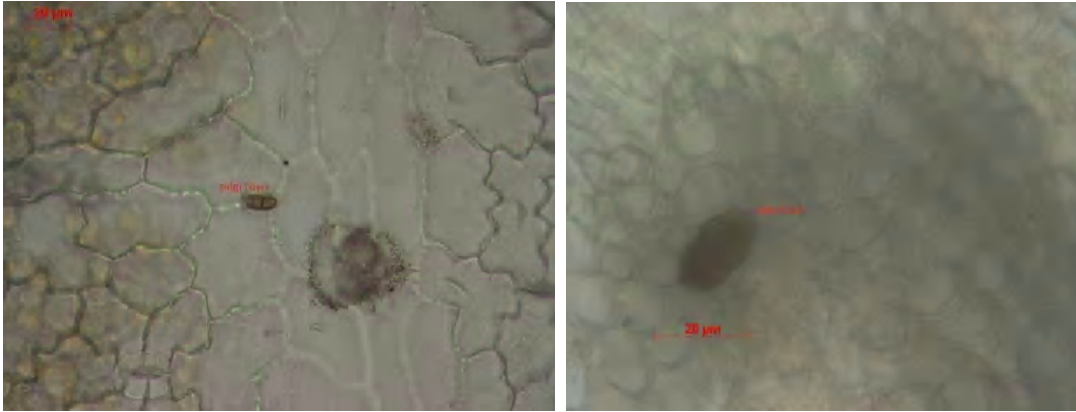
Ayrıca alt epidermada yine damarlar üzerinde yoğun, tek hücreli, dar, ince, ligninleşmiş çeperli, tepesi küt ve tabanı çukurlaşmış örtü tüyleri mevcuttur (Şekil 4.13). Üst ve alt epidermadaki örtü tüylerinin yapısı aynıdır. Fakat üst epidermadaki örtü tüyleri alt epidermaya göre daha seyrek olarak görülmüştür. Ayrıca üst epidermada stomalar alt epidermaya göre çok daha seyrek. Sapı ve başı tek hücreli salgı tüyleri hem alt hem de üst epidermada nadir olarak tespit edilmiştir (Şekil 4.14). Dokularda genel olarak küçük yağ damlalarına rastlanmıştır.



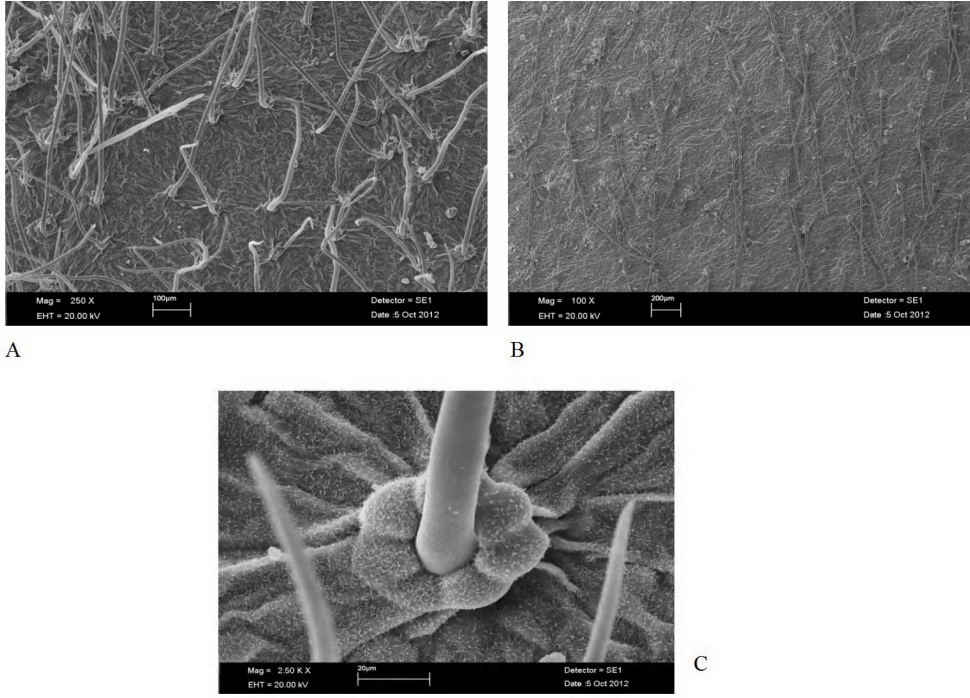
**Şekil 4.12.** Üst epidermada Ranunculaceae tipi stoma ve komşu hücreleri (kh: komşu hücreler, s:stoma, pp palizat parenkiması)



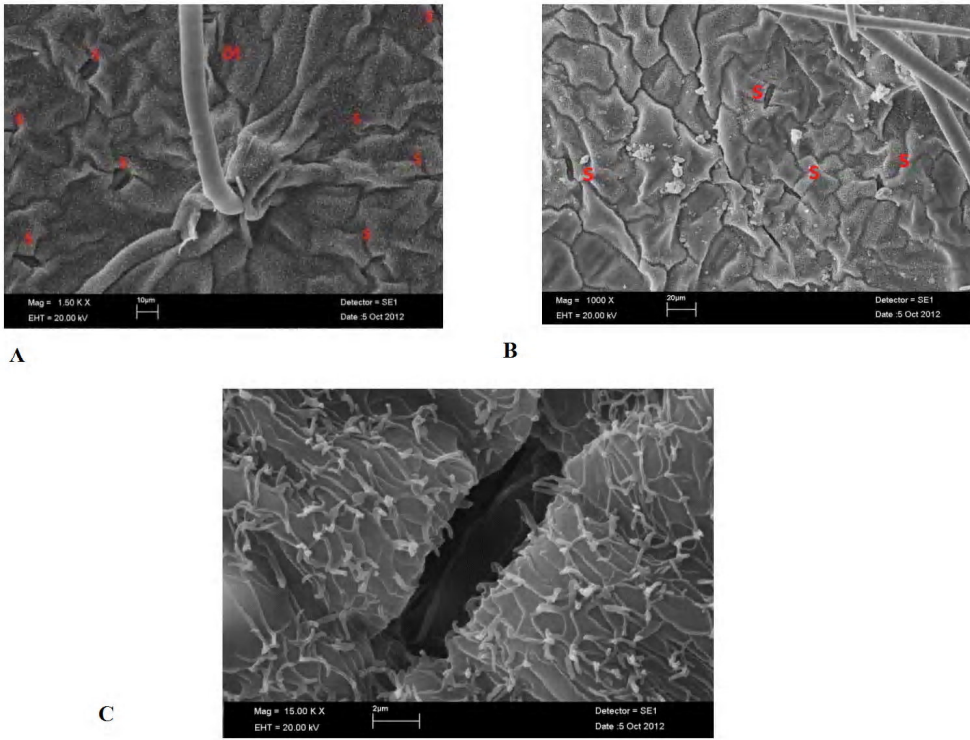
Şekil 4.13. Yaprakta örtü ve salgı tüyleri (st: salgı tüyü, öt: örtü tüyü)



Şekil 4.14. Yaprak üst ve alt epidermasında salgı tüyelerinin görüntüsü



Şekil 4.15. A) Alt epidermada örtü tüyleri B) Üst epidermada örtü tüyleri C) Örtü tüyünün taban hücreleri



Şekil 4.16: Yaprakta stomaların görünümü A) Üst epidermada B, C) Alt epiderma stomaların (s: stoma, öt: örtü tüyü)



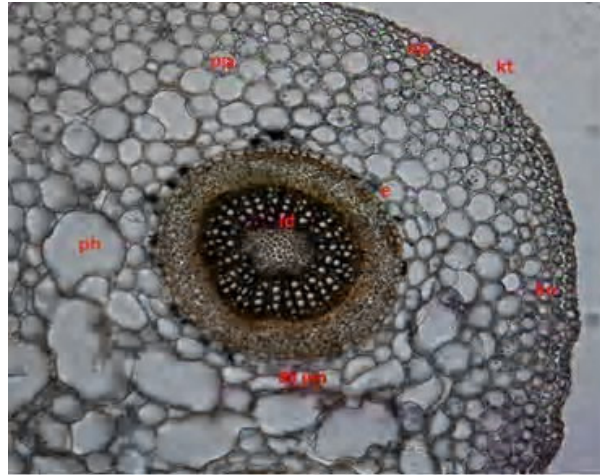
Şekil 4.17: Yaprak enine kesitte stomanın yan yüzeyden görünüşü (s: stoma)

#### 4.1.2.4. Petiyol Enine Kesiti

Enine kesitte üçgen şeklindedir (Şekil 4.18). Dış duvar çizgili ve kalınlaşmış bir kutikulaya sahiptir. Epidermis hafif köşeli küçük hücrelerden oluşur. Epidermisin altında 1-2 sıralı kollenkimatik hücreler yer alır. Üst epidermisin karşısında iki küçük, alt epidermisin karşısındaki üçüncü iletim demeti daha büyük olup tamamı üçgeni oluşturur. Bunlar tek sıralı hücrelerden oluşan endodermis ile çevrilmiştir. Özde parenkimatik hücreler mevcut olup yapısal olarak gövdedekine benzerlik gösterir (Şekil 4.19). Petiyolde gövdedeki örtü tüylerine benzer yapıda örtü tüyleri tespit edilmiştir.

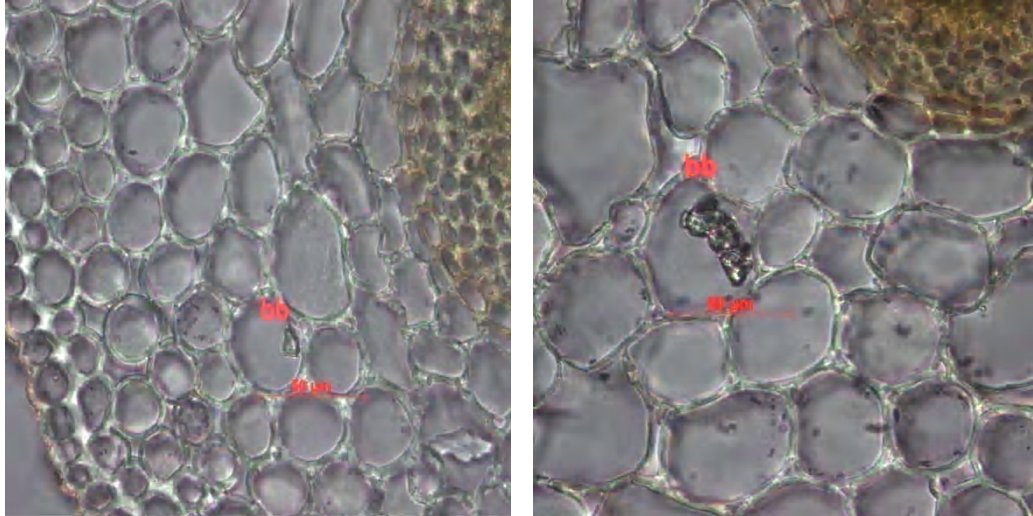


Şekil 4.18: Petiyol enine kesitte şematik görünüm



**Şekil 4.19:** Petiyolde iletim demetlerinin görünüşü ( ph: parenkima hücreleri, ko: kollenkima, id. İletim demetleri, e: endodermis)

Ayrıca parenkimatik hücrelerde bazen tek, bazende kümeleşmiş halde basit billur kristalleri görülmüştür (Şekil 4.20).



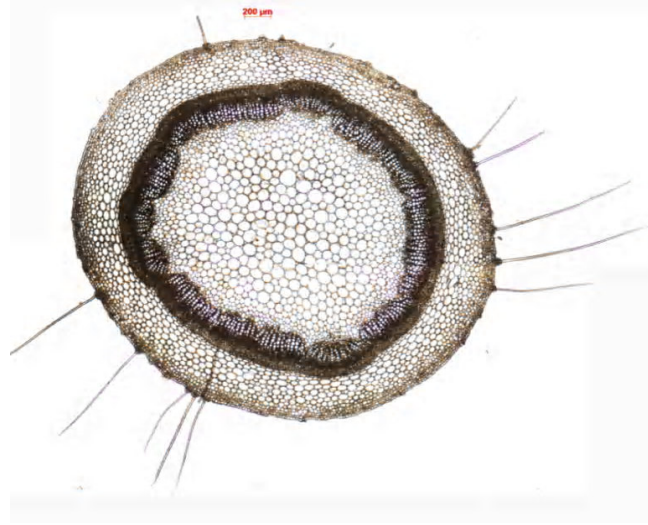
**Şekil 4.20:** Petiyol enine kesitte gözlenen basit billur kristalleri (bb: basit billurlar)

### 4.1.3. *Alchemilla mollis* Türünün Gövde Anatomisi

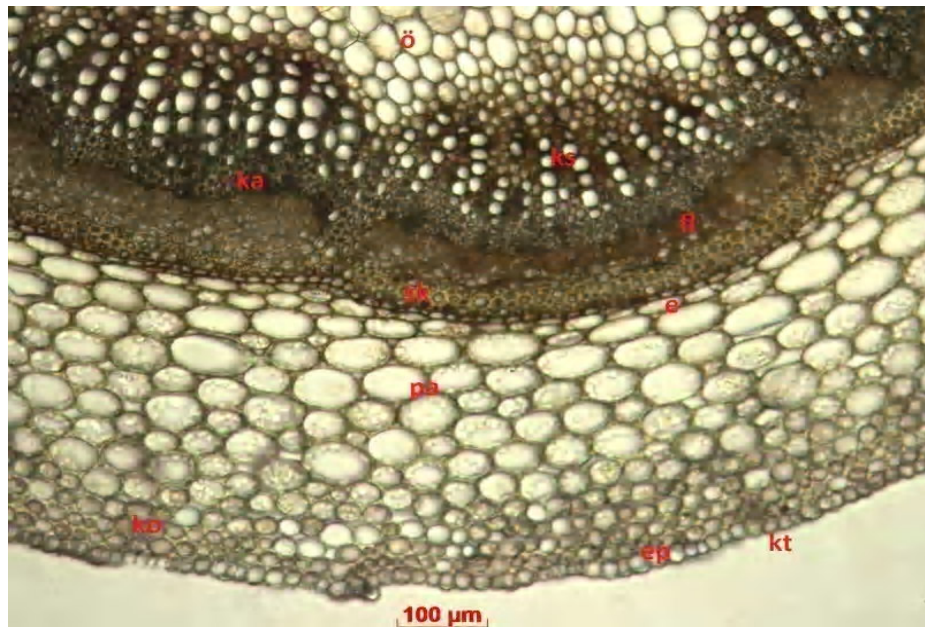
#### 4.1.3.1. Gövde Enine Kesiti

İnce bir kütikula tabakası altında tek sıralı küçük izodiametrik epiderma hücreleri yer alır. Epiderma hücrelerinin altında 3-4 sıralı kollenkima hücreleri onun altında da 4-5 sıralı çok köşeli-dairesi büyük, hücreler arası boşlukları olan parenkima hücreleri

tespit edilmiştir. Endodermis hücreleri tek sıralı ve oldukça belirgindir. Perisikl sklerenkima demetleri ya da sklerenkimatik halka şeklindedir. Sklerenkima hücreleri 3-4 sıralıdır. Floem çok sıralı irili ufaklı hücrelerden oluşmuştur. Ksilemin etrafı çok belirgin olmayan genellikle 1-2 sıralı sklerenkimatik bir halka ile çevrilmiştir. Dışta floem içte ise ksilem yani trake ve trakeitler yer alır. İletim demetleri daralan öz ışınları ile ayrılmıştır. Bunları takiben parenkimatik hücreler ve öz gelir (Şekil4.21).

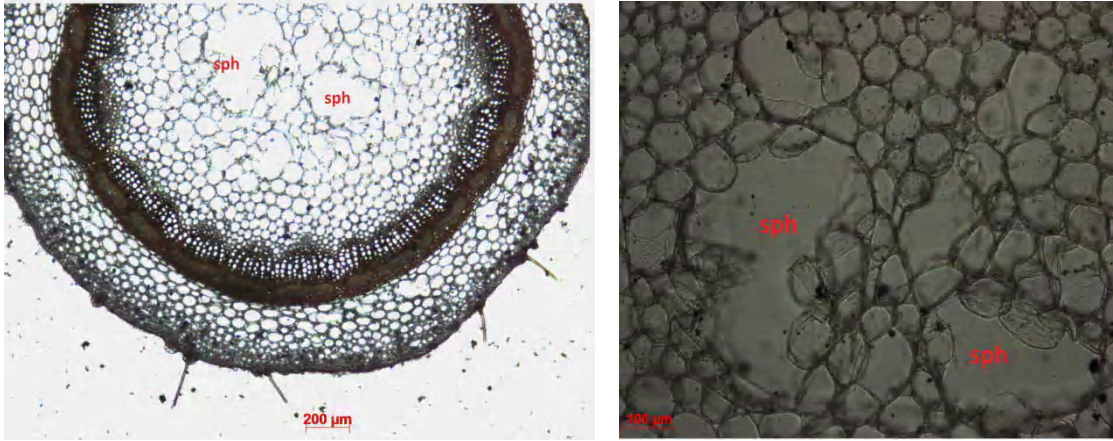


Şekil 4.21: Gövde enine kesitte şematik görünüm



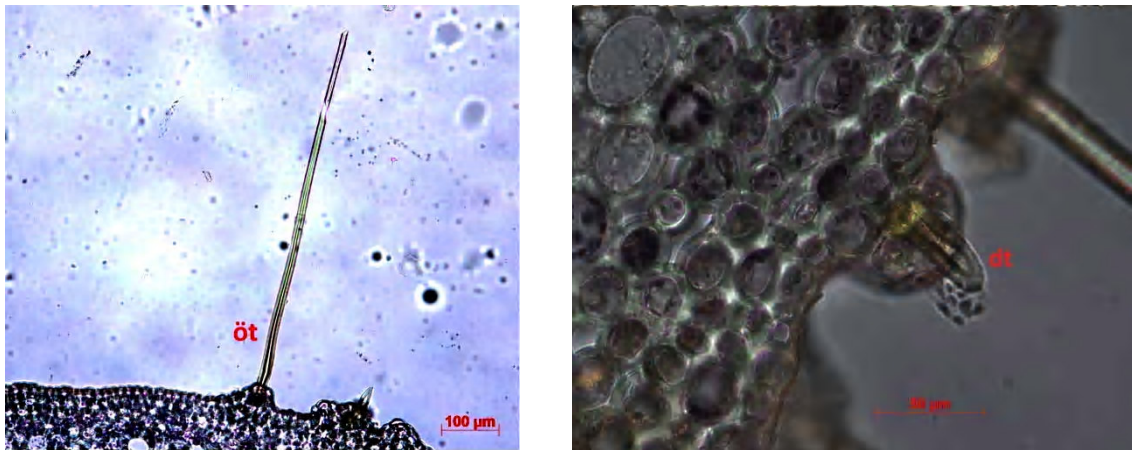
Şekil 4.22: Gövde enine kesitinde anatomik özellikler (kt: kütikula, ep: epiderma, ko: kollenkima, pa: parenkima, e: endodermis, sk: sklerenkima, fl: floem, ka: kambiyum, ks: ksilem, ö: öz)

Alınan enine kesitlerin bazılarında özde büyük selülozik parenkima hücreleri görülmüştür (Şekil 4.23).

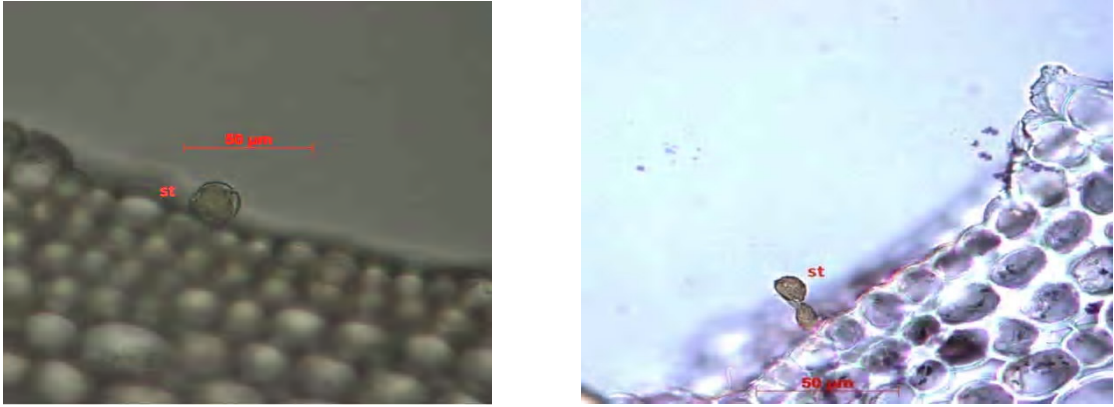


**Şekil 4.23:** Gövde enine kesitte selülozik parenkima hücreleri (sph: selülozik parenkima hücreleri)

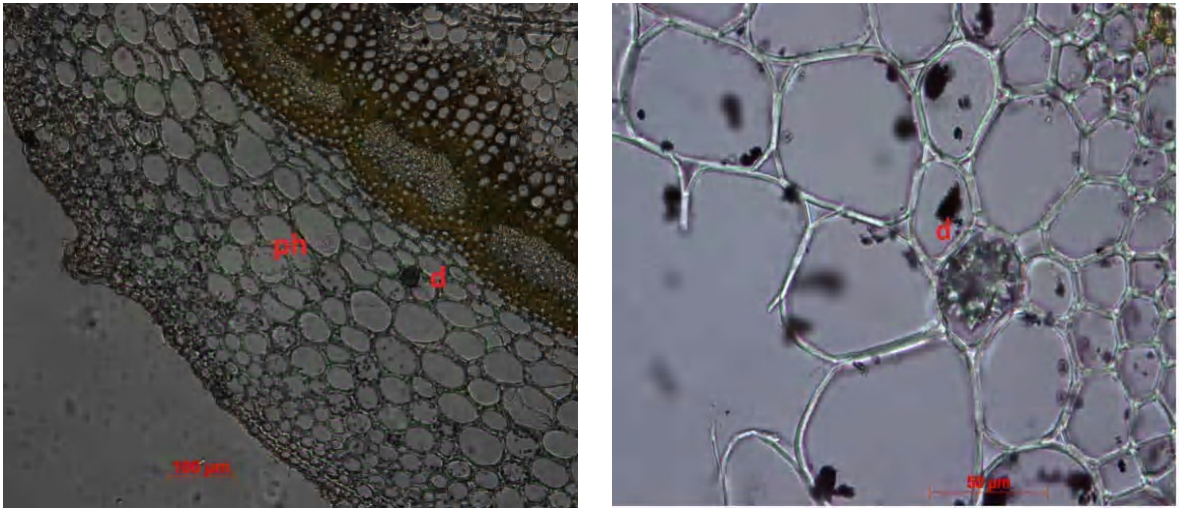
Uzun ya da kısa tek hücreli uçları küt örtü tüyleri gözlenmiştir (Şekil 4.24). Örtü tüylerinden daha seyrek olmak üzere başı tek sapı çok hücreli salgı tüyleri de tespit edilmiştir (Şekil 4.25). Ayrıca gövde parenkima hücrelerinde ve özde bulunan parenkima hücrelerinde de nadir olarak druz kristali görülmüştür (Şekil 4.26).



**Şekil 4.24:** Gövdede örtü tüyleri (öt: örtü tüyü)

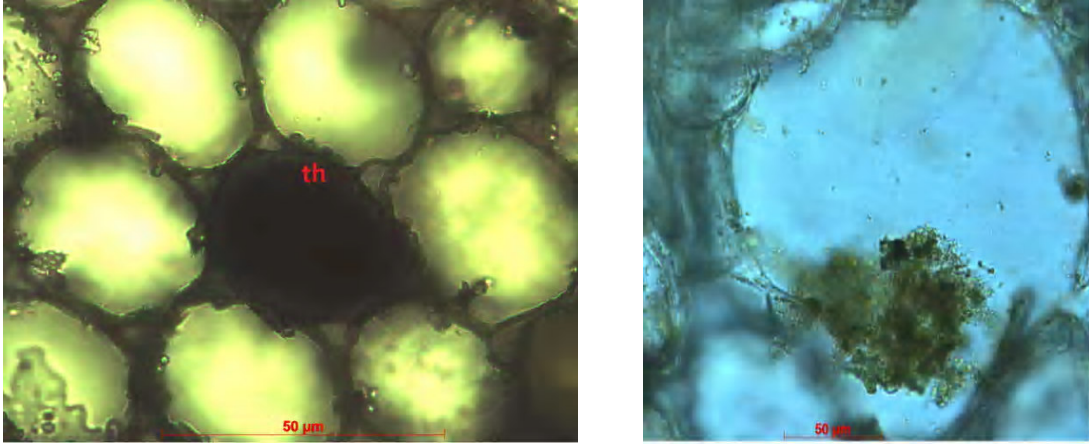


**Şekil 4.25:** Gövdeden alınan enine kesitlerde salgı tüylerinin görünüşü (st: salgı tüyü)



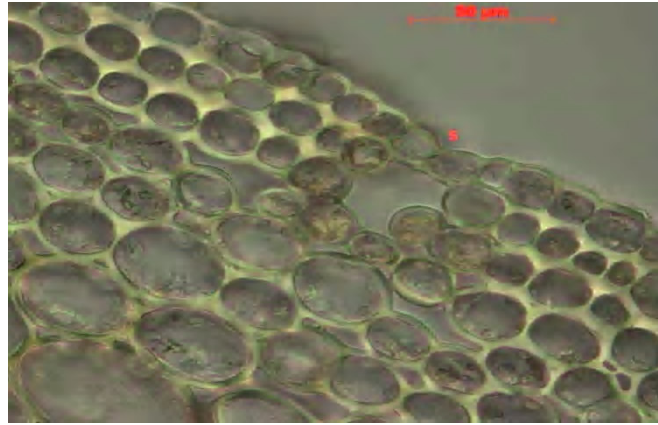
**Şekil 4.26:** Gövde enine kesiti A) Parenkimada druz kristali B) öz bölgesinde druz kristali (ph: parenkima hücreleri, d: druz kristali)

Kuru drogtan alınan gövde enine kesitlerine demir III klorür ( $Fe_3Cl$ ) damlatılarak özellikle parenkimatik dokularda tanen birikimi gözlenmiştir (Şekil 4.27) (29-98).



**Şekil 4.27:** Kuru drogtan alınan kesitlerde tanen hücreleri (th: tanen hücreleri)

Ayrıca alınan enine kesitlerde stoma görülmüştür. (Şekil 4.28)



**Şekil 4.28:** Gövde enine kesitte stoma hücresi (s:stoma)

## **4.2. EKSTRELERİN HAZIRLANIŞI, SPEKTROFOTOMETRİK VE KROMATOGRFİK BİLEŞİM ANALİZLERİ**

### **4.2.1. Ekstrelerin Hazırlanışı**

*A. mollis* bitkisi toprak üstü kısımlarından sırasıyla hekzan, etilasetat, metanol ve n-butanol ekstreleri hazırlandı. Bunun yanı sıra bitkinin geri çeviren soğutucu altında su ekstresi ve çalkalayıcı su banyosunda üç gün süre bekletilerek %70'lik metanol ekstresi hazırlandı. Ekstreler çözücülerinden uzaklaştırıldıktan sonra antioksidan aktivite analizleri ve kompozisyon analizlerinde kullanılmak üzere hazır hale getirildi. Elde edilen ekstre verimleri Tablo 4.1'de vermiştir. Tablo 4.1'de görüldüğü gibi bitki ekstrelerinde en yüksek verim su ekstresinden en düşük verim ise hekzan ekstresinden elde edilmiştir.

### **4.2.2. Toplam Fenol, Flavonoit ve Flavonol Miktar Tayini**

Ekstrelerin toplam fenol, toplam flavonoit ve toplam flavonol miktarları deneysel kısımda verilen yöntemler kullanılarak spektrofotometrik olarak belirlenmiştir. Toplam fenol miktarları gallik aside, toplam flavonoit ve toplam flavonol miktarları ise rutine eşdeğer olarak hesaplanmıştır. Sonuçlar Tablo 4.1' de verilmiştir. Bitkinin % 70'lik metanol ekstresinin diğer ekstrelere göre fenolik bileşikler bakımından zengin olduğu bulunmuştur. Toplam fenol miktarları bakımından ekstreler % 70 metanol > su > metanol > n-butanol > etilasetat > hekzan şeklinde sıralanmıştır. Toplam flavonoit miktarı bakımından en zengin ekstre ise metanol ekstresi iken hekzan ve etilasetat ekstrelerinin toplam flavonoit miktarı belirlenememiştir. Toplam flavonol miktarı karşılaştırıldığında ise en yüksek etilasetat ekstresinin flavonol miktarı açısından zengin olduğu görülmektedir. Su ve hekzan ekstreleri ise etilasetattan sonra yüksek flavonol miktarına sahip diğer ekstrelerdir.

**Tablo 4.1:** Ekstre verimleri, toplam fenol, toplam flavonoit ve toplam flavonol miktarları

Ekstreler	Verim [%]	Toplam Fenolikler [mgGAE/gekstre]	Toplam Flavonoitler [mgRE/gextract]	Toplam Flavonoller [mgRE/gekstre]
(A)	0.65	3.26 ± 4.05*	d.e.	71.93 ± 2.46
(B)	1.2	34.79 ± 0.33	d.e.	107.96 ± 8.65
(C)	7.93	122.93 ± 0.58	50.63 ± 0.59	42.65 ± 0.28
(D)	4.37	63.50 ± 1.17	13.40 ± 0.20	6.84 ± 1.27
(E)	28.78	184.79 ± 0.33	34.63 ± 0.59	63.21 ± 0.34
(F)	31.12	172.60 ± 1.26	47.34 ± 0.39	84.09 0.76g

\*ortalama ± SD; (A), hekzan; (B), etilasetat; (C), metanol; (D), .bütanol; (E), %70 metanol; (F), su ekstrere (d.e.: detekte edilemedi)

#### 4.2.3. Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi Analizi

Ekstrelerin Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi (YBSK) sistemi ile yapılan analizlerinde PDA dedektör kullanılmış ve miktar tayinleri benzoik asit türevleri için 280 nm'de, hidroksisinnamik asit türevleri için 320 nm'de ve flavonoitler için ise 360 nm'de yapılmıştır. Elde edilen sonuçlar Tablo 4.2'de verilmiştir. *A. mollis* ekstrere ait YBSK kromatogramları Şekil 4.29'de verilmiş, aydınlatılmış bileşiklere ait kimyasal yapılar ise Şekil 4.30'da verilmiştir.

Ekstreler içerisinde gallik asit, epikateşin, metilgallat, kafeik asit, gentisik asit, rutin luteolin-7-*O*-glikozit ve apigenin-7-*O*-glikozit kalitatif ve kantitatif olarak belirlenmiştir. Gallik asit, epikateşin, kateşin ve metilgallat 280 nm'de kafeik asit ve gentisik asit 320 nm'de, rutin, luteolin-7-*O*-glikozit ve apigenin-7-*O*-glikozit ise 360 nm'de analiz edilmişlerdir. Ekstrelerin içerisindeki tanımlanan bu bileşiklerin miktarları standart maddelerden hazırlanan kalibrasyon eğrileri (Tablo 4.3) kullanılarak hesaplanmış ve sonuçlar Tablo 4.2'de verilmiştir. Maddelerin tanımlanmasında hem tutunma zamanları hem de UV spektrumları kullanılmıştır.

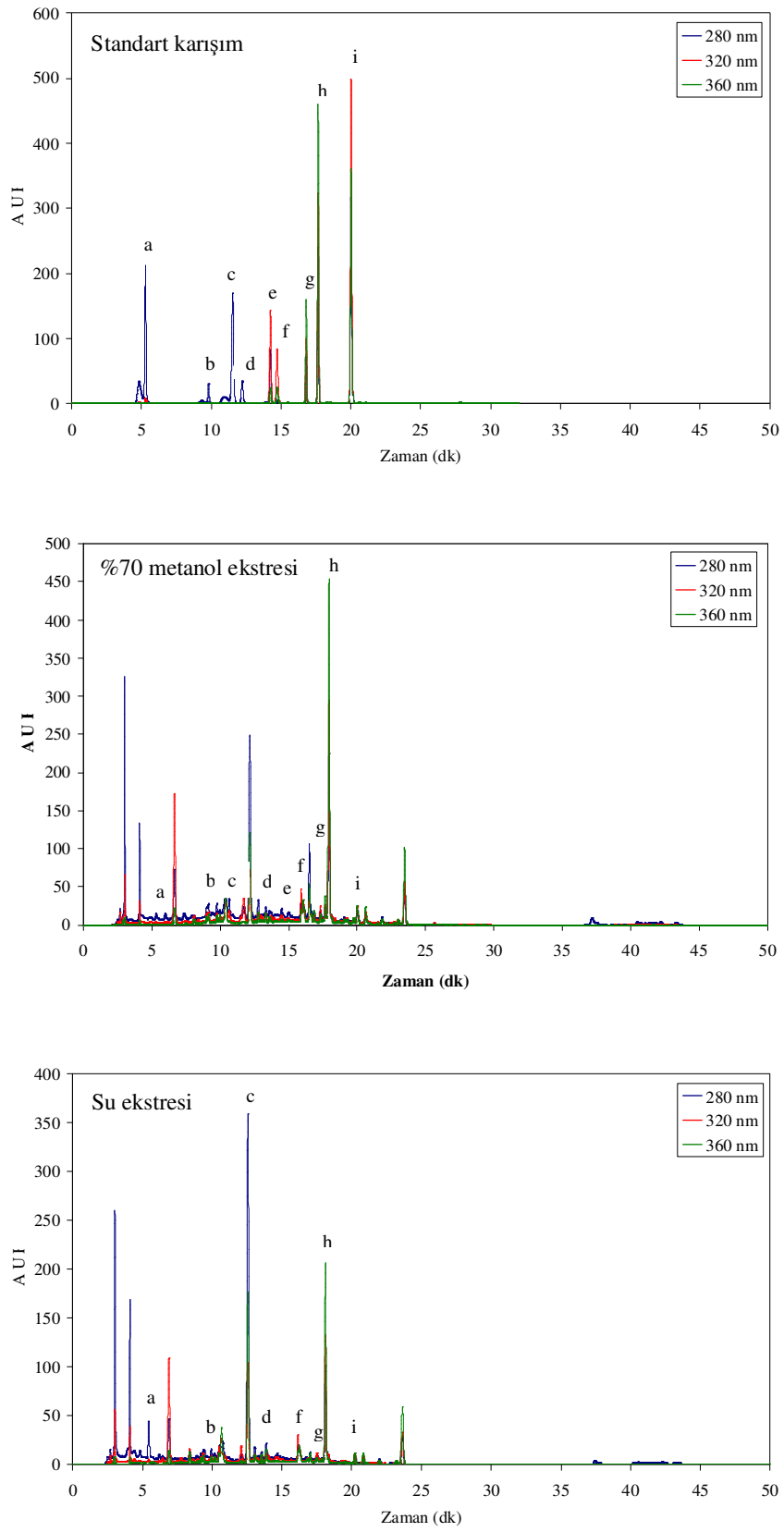
**Tablo 4.2:** *Alchemilla mollis* ekstrelerinin YBSK sonuçları

Maddeler	Ekstreler <sup>a</sup>				
	(B)	(C)	(D)	(E)	(F)
Gallik asit	0.63 ± 0.00 <sup>b</sup>	0.85 ± 0.03	1.16 ± 0.00	0.8 ± 0.02	<b>2.10 ± 0.05</b>
Epikateşin	1.41 ± 0.00	4.21 ± 0.85	3.43 ± 0.40	<b>6.63 ± 0.87</b>	6.09 ± 0.48
Kateşin	1.09 ± 0.01	<b>7.39 ± 0.13</b>	3.41 ± 0.23	3.57 ± 0.28	1.86 ± 0.07
Metil gallat	d.e.	4.00 ± 0.02	1.17 ± 0.02	5.99 ± 0.03	<b>12.18 ± 0.01</b>
Kafeik asit	d.e.	d.e.	0.00 ± 0.00	<b>0.04 ± 0.00</b>	0.00 ± 0.00
Gentisik asit	0.28 ± 0.04	0.23 ± 0.01	0.44 ± 0.01	0.24 ± 0.03	<b>0.54 ± 0.01</b>
Rutin	0.12 ± 0.00	0.80 ± 0.03	<b>0.84 ± 0.00</b>	0.72 ± 0.00	0.68 ± 0.00
Luteolin-O-glikozit	0.22 ± 0.00	6.04 ± 0.42	<b>23.04 ± 0.22</b>	16.78 ± 0.13	11.63 ± 0.03
Apigenin-O-glikozit	0.06 ± 0.00	<b>2.08 ± 0.00</b>	1.36 ± 0.02	1.20 ± 0.00	0.74 ± 0.00

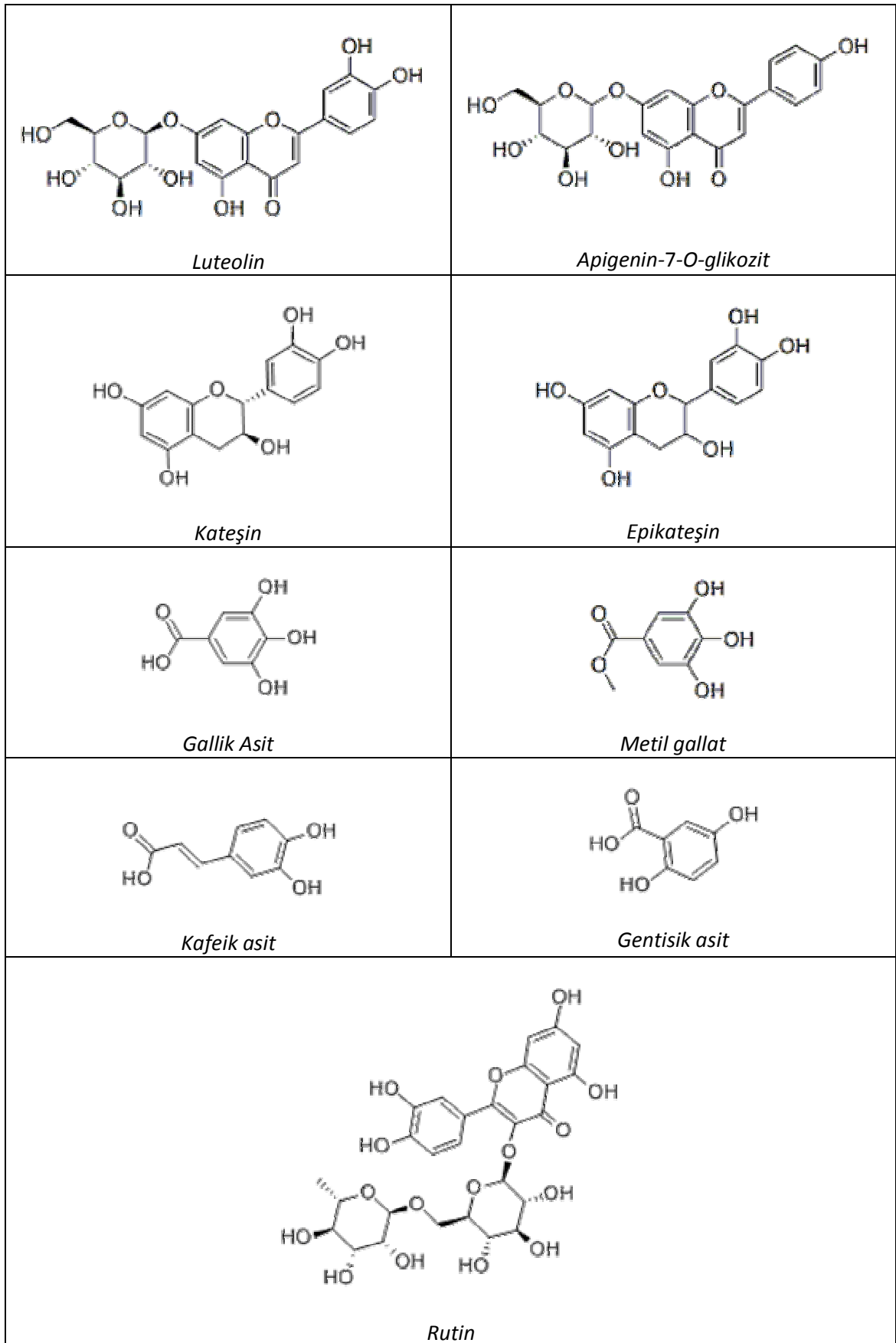
<sup>a</sup> (B), etilasetat; (C), metanol; (D), n-butanol; (E), %70 metanol; (F), su ekstreleri; <sup>b</sup>mg/g, Ort± SD; d.e., dedekte edilemedi

**Tablo 4.3:** Standartlara ait kalibrasyon denklemleri ve korelasyon katsayıları

Kod	Madde	Kalibrasyon Denklemi [ y=ax+b]	Korelasyon Katsayısı [r]
A	Gallik asit	y = 33155 x - 210.31	0.996
B	Epikateşin	y = 1297 x - 1.337	0.999
C	Kateşin	y = 5758 x - 13.27	0.999
D	Metil gallat	y = 32810 x + 27.28	0.999
E	Kafeik asit	y = 1297 x - 1.337	0.999
F	Gentisik asit	y = 5758 x - 13.27	0.999
G	Rutin	y = 32810 x + 27.28	0.999
H	Luteolin-O-glikozit	y = 58143 x + 32.05	0.999
İ	Apigenin-O-glikozit	y = 14858x - 25,77	0,999



Şekil 4.29: *Alchemilla mollis* örnek ekstrilerine ve standartlara ait YBSK kromatogramları



Şekil 4.30: *Alchemilla mollis*'in bileşimindeki maddelerin kimyasal formülleri

### 4.3. FARMAKOPE ANALİZLERİ

#### 4.3.1. Toplam kül ve asitte erimeyen kül miktar tayini

Toplam kül miktarı ve asitte erimeyen kül miktarı bitkisel drogların saflıklarını belirlemek amacıyla yapılan analizlerdendir. Toplam kül, bitkinin kendisinden kaynaklı olan fiziksel kül ve çevresel etmenlerden kaynaklı fiziksel olmayan kül miktarını kapsamaktadır. Toplam kül miktarı drog kalitesini belirlemek üzere tek başına yeterli olmamaktadır. Çünkü droglar büyük çoğunluğunu kalsiyum okzalat kristallerinin oluşturduğu fiziksel kül içermektedir. Bu nedenle toplam kül miktarının yanısıra asitte erimeyen kül miktar tayini de yapılması gereklidir (100).

Bitkisel drogların kalite standartları farmakope ve monograflarda belirtilmiştir. *Alchemillae herba*'nın Avrupa Farmakopesi'ndeki monografında kayıtlı olan sınır test değerlerine göre toplam kül miktarının % 12' den az olması gerekmektedir. Tez materyali olarak kullanılan *Alchemilla mollis*' in toplam kül miktarı % 11.8 ve asitte erimeyen kül miktarı % 4.45 olarak hesaplanmıştır.

#### 4.3.2. Volümetrik su miktar tayini

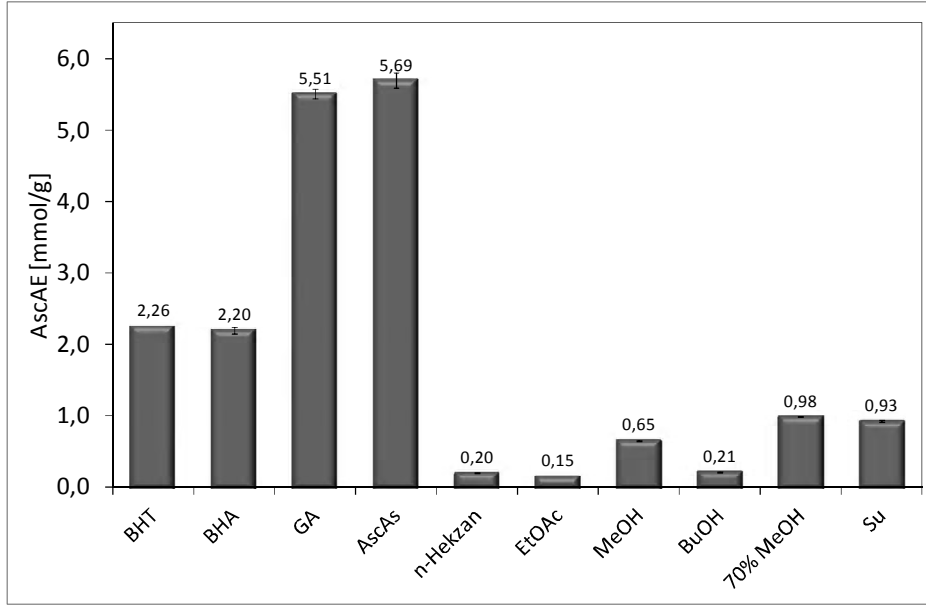
Birçok madde yüzeylerinde tutunmuş olarak ya da moleküllerine bağlı şekilde su içerir. Bu suyun miktarı sabit olmayıp havanın nemine ya da diğer dış etkenlere bağlı olarak farklılık göstermektedir. Bitkisel droglarında toplanıp saklanması aşamasında su miktarında değişiklikler görülebilir. Drogdaki fazla su droğun kalitesini olumsuz olarak etkilemektedir (mikroorganizma üremesi gibi...) ve bu açıdan önemlidir. Farmakopelerde belirtilen değerlere göre "*Alchemillae herba*" droğunda bulunması gereken su miktarı en fazla % 10'dır (h/h). Yapılan volümetrik su tayini analizde droğumuzdaki toplam su miktarı % 4 (h/h) olarak bulunmuştur.

### 4.4. ANTİOKSİDAN AKTİVİTE ÇALIŞMALARI

#### 4.4.1. İndirgeme Gücünün Belirlenmesi

Maddelerin indirgeme güçleri ile antioksidan aktivite arasında genellikle doğrusal bir bağlantı vardır. Bu nedenle indirgeme kapasitesinin belirlenmesi o maddenin antioksidan aktivitesi hakkında bilgi verebilir. Bu amaçla *A. mollis* türünden elde edilen ekstraların ve standartların demiri indirgeme kapasiteleri incelenmiş ve sonuçlar Şekil 4.30'da verilmiştir. Burada verilen sonuçlar askorbik asite eşdeğer olarak hesaplanmıştır. Yüksek değer yüksek aktiviteyi gösterir.

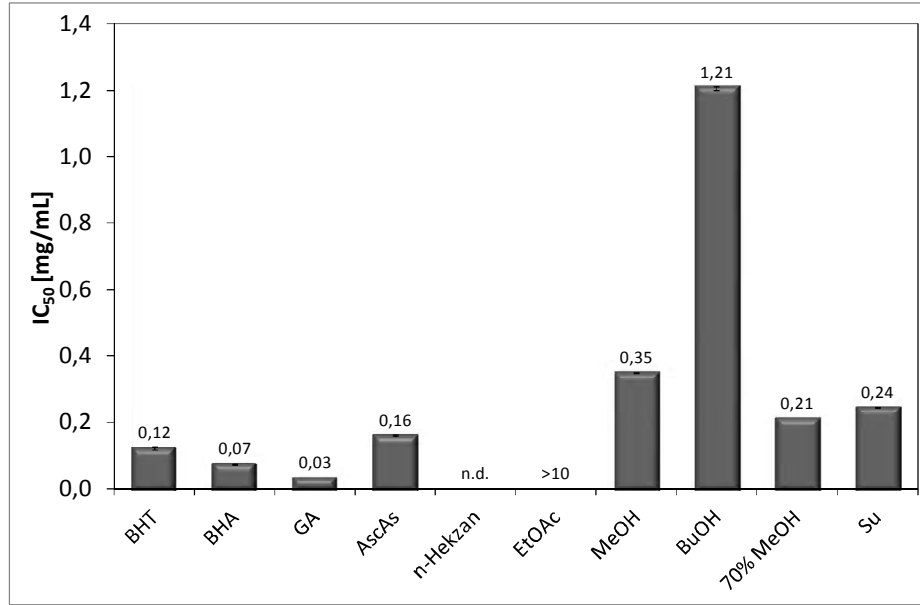
*A. mollis* 'in toprak üstü kısımlarından elde edilen ekstrelerin hiçbirisinin demir(III) ü indirgeme gücü pozitif kontrol olarak kullanılan askorbik asit, BHT, BHA ve gallik asit kadar yüksek bulunamamıştır (Şekil 4.31). %70'lik metanol ekstresi ve su ekstrelerinin demir(III)'ü demir(II)'ye indirgeme güçleri en yüksek olarak bulunmuştur.



Şekil 4.31: *A. mollis* ekstrelerinin ve standartların demir(III)'ü demir(II)'ye indirgeme kapasiteleri

#### 4.4.2. 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH<sup>•</sup>) Radikalini Süpürücü Etki Tayini

Vücuttan zararlı ve hastalık yapıcı radikallerin uzaklaştırılması oldukça önemlidir. Bu amaçla azot merkezli stabil bir radikal olan DPPH<sup>•</sup> radikali kullanılmıştır. Bütün ekstreler DPPH<sup>•</sup> radikalini fizyolojik pH'da konsantrasyona bağlı olarak süpürmüşlerdir. IC<sub>50</sub> değerleri, radikalın % 50'sini süpürebilecek gerekli konsantrasyon olarak tanımlanır. Küçük değer yüksek aktiviteyi gösterir. Ekstrelerin IC<sub>50</sub> değerleri hazırlanan doğrusal olmayan eğriler kullanılarak hesaplanmış ve sonuçlar Şekil 4.32'de verilmiştir.

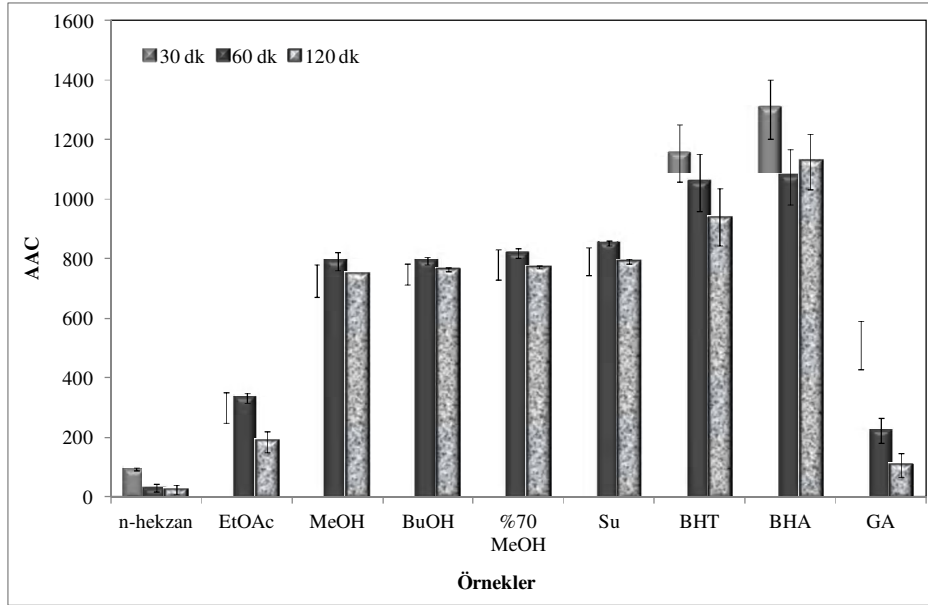


Şekil 4.32: *Alchemilla mollis* ekstralarının DPPH• radikali süpürücü etkileri

*A. mollis* ekstraları ile yapılan çalışmalar sonucunda hekzan ve etilasetat dışındaki ekstraların fizyolojik pH'da süpürücü etki gösterdikleri belirlenmiştir. Şekil 4.32'ye göre *A. mollis*'in % 70'lik metanol ekstresi diğerlerinden daha aktif bulunmuştur. Ancak bitkiden elde edilen hiçbir ekstrenin kullanılan pozitif kontroller kadar etkili süpürücü etkiye sahip olmadığı tespit edilmiştir. Ekstrelerinin DPPH• radikal süpürücü aktiviteleri şöyle sıralanabilir: % 70 metanol > su > metanol > n-butanol.

#### 4.4.3. $\beta$ -Karoten/Linoleik Asit Birlikte Oksidasyonu İnhibe Edici Etki Tayini

Gıda lipitleri ve hücre membranları oksidatif ajanlarla kolaylıkla okside olabilen doymamış yağ asitleri, linoleik ve araşidonik asitleri içerirler. Bu nedenle doymamış yağ asitleri üzerinden yapılan oksidasyon deneyleri önem taşımaktadır. Beta-karoten/linoleik asit soldurma deneyi özellikle hücre duvarındaki ve gıdalardaki doymamış yağ asitlerinin oksidasyonunun tanımlanmasında sıklıkla kullanılır. *A. mollis* ekstralarının  $\beta$ -karoten/linoleik asit oksidasyonunu engelleme dereceleri Şekil 4.32'de verilmiştir. Şekil 4.33'de görülebileceği gibi elde edilen ekstralar belli oranlarda inhibitör aktivite göstermiştir. Su, % 70'lik metanol, n-butanol ve metanol ekstraları BHT ve BHA standartlarına yakın etkili olarak aktivite gösterirken hekzan ve etilasetat ekstralarının daha düşük aktivite göstermiştir. Ekstrelerin aktivitesi zamana bağlı olarak değişim göstermemiştir.

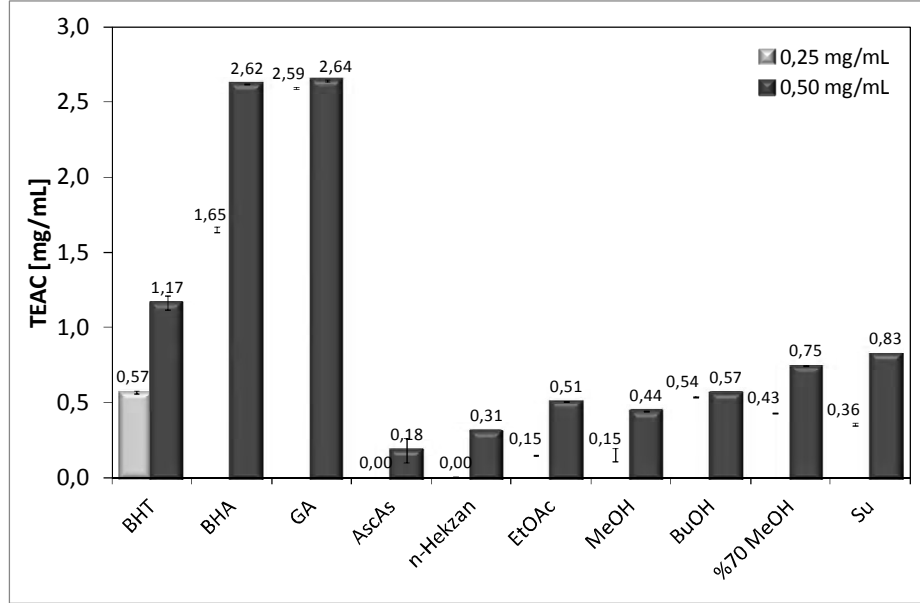


Şekil 4.33: *A. mollis* ekstre ve standartların  $\beta$ -karoten-linoleik asit peroksidasyonuna etkileri

#### 4.4.4. 2,2'- azino-bis (3- ethylbenziazoline-6- sulphonic acid) (ABTS<sup>•+</sup>) radikalinin süpürücü etki tayini

Bu yöntem mavi/yeşil renkli bir bileşik olan ABTS<sup>•+</sup> radikali katyonu tarafından antioksidatif maddelerin miktarının spektroskopik olarak ölçülmesi esasına dayanmaktadır. Bu yöntem ile; flavonoidler, hidroksisülik asitler, karotenoidler gibi hidrofilik ve lipofilik antioksidanlar ölçülebilmektedir

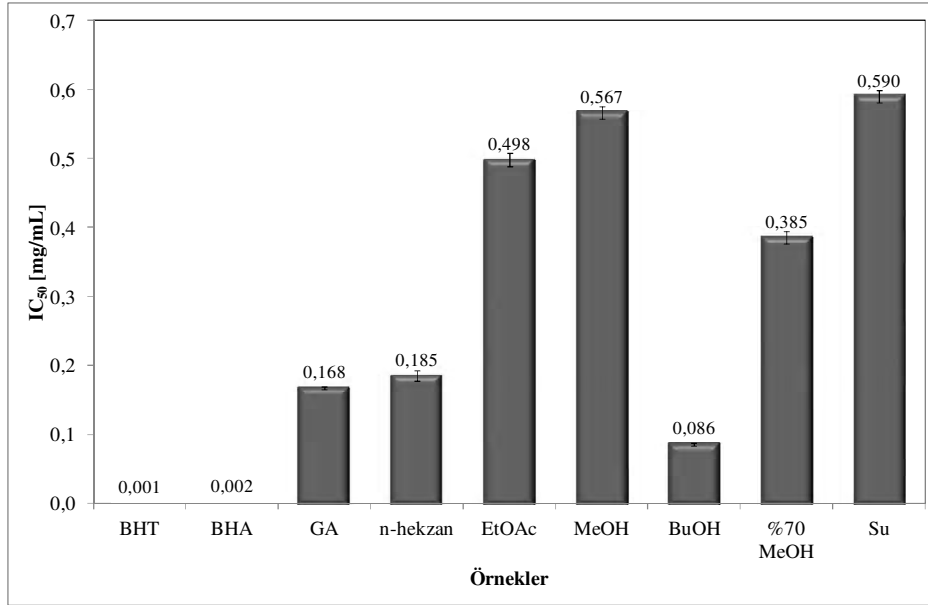
Tüm ekstraların ABTS<sup>•+</sup> radikalini süpürücü etkileri değerlendirilmiş ve sonuçlar Şekil 4.34'te verilmiştir. En yüksek aktivite su ekstresinde gözlenirken, en düşük aktivitenin hekzan ekstresinde olduğu tespit edilmiştir. Ekstrelerin askorbik asit haricindeki diğer pozitif kontrollerin hiçbiri kadar yüksek aktivite gösteremediği belirlenmiştir.



Şekil 4.34: *Alchemilla mollis* ekstralarının ABTS<sup>•+</sup> radikalini süpürücü etkileri

#### 4.4.5. Askorbat –Fe (III)-katalizli fosfolipit peroksidasyonunun inhibisyonu

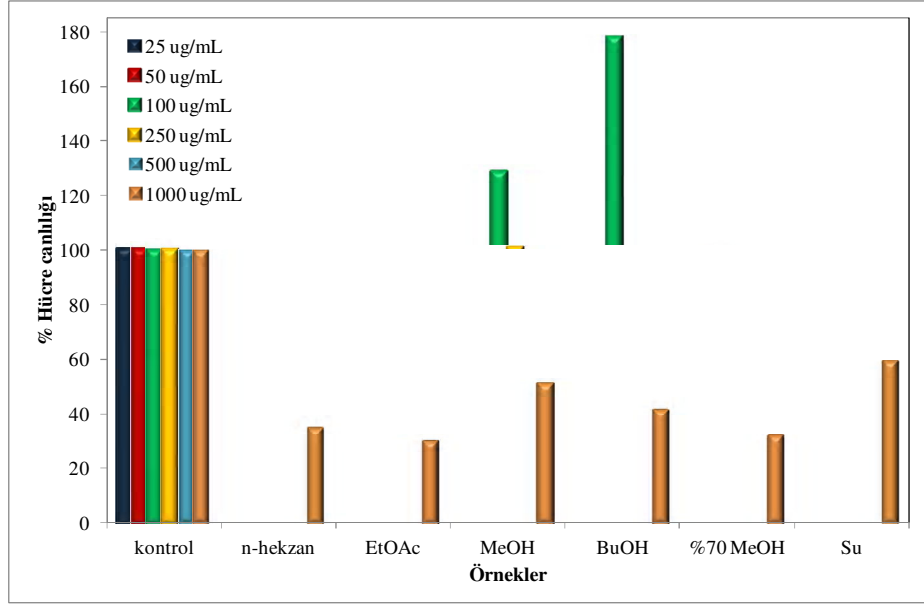
Çoklu doymamış yağ asitlerince zengin fosfolipitler biyolojik olarak önemli moleküllerdir ve hidroksil radikali kaynaklı bozulmaya açıktırlar. Ayrıca lipitlerin oksidatif bozulması yağlarca zengin ürünlerin acılaşmasının da temelini oluşturur. Bu nedenle bu oksidatif hasarı engelleyici yeni doğal maddelerin bulunması önem kazanmıştır. Bovine-brain kaynaklı fosfolipit lipozomlarının askorbat-Fe(III)-katalizli hidroksil radikalli bozunmasında hidroksil radikalini süpürücü etki esasına göre fizyolojik pH da TBA-reaktif bileşiklerin formasyonunun inhibisyonu ölçülür. Şekil 4.35’ de görüldüğü gibi ekstralar kullanılan doğal ve sentetik standartlar kadar aktivite göstermemiştir. n-butanol ekstresinin diğer ekstralara göre daha aktif olduğu bulunmuştur (IC<sub>50</sub> 0.086 mg/mL).



Şekil 4.35 : *Alchemilla mollis* ekstrelerinin fosfolipit peroksidasyonunu inhibisyonu

#### 4.5. SİTOTOKSİK ETKİNİN TETRAZOLYUM TUZU (MTT) KOLORİMETRİK GELİŞME İNHİBİSYONU TESTİ İLE BELİRLENMESİ

Sitotoksisite deneyleri ilaç endüstrisinde sıkça kullanılan deneylerdendir. Maddelerin hücreler üzerindeki sitotoksik etkileri hücre canlılığı deneyleri ile ölçülmektedir. Bu deneylerde ise hücre membranlarının farklı boyalarla boyanması ile sayımlar yapılmaktadır. *A. mollis*'den elde edilen ekstrelerin sitotoksik özellikleri MCF-7 (insan meme kanser hücre serisi) hücreleri ile MTT deneyi kullanılarak ölçülmüştür. Bu deneyde pozitif standartlar olarak hem sentetik hem de organik maddeler kullanılmıştır. Sonuçlar % hücre canlılığı olarak Şekil 4.36' da verilmiştir. Ekstreler 25-1000 µg/mL konsantrasyon aralığında test edilmiştir. Küçük değerler yüksek aktiviteyi göstermektedir. Tüm ekstreler yüksek konsantrasyonlarda hücre canlılığını inhibe etmiştir. Hekzan, etilasetat, n-butanol ve % 70 metanol ekstreleri 1000 µg/mL konsantrasyonda hücre canlılığını % 50'in üzerinde inhibe etmiştir. Metanol ve n-butanol ekstreleri 100 µg/mL konsantrasyonlarda hücre canlılığını arttırmıştır.



Şekil 4.36: *Alchemilla mollis* ekstralarının sitotoksosite sonuçları

## 5. TARTIŞMA VE SONUÇ

*Alchemilla* cinsi Rosaceae familyasının bir üyesi olarak birçok Avrupa ve Asya ülkesinin florasında kayıtlıdır. Avrupa Farmakopesi'nde de kayıtlı olan bu cinsin *A. xcanthochlora* türü ile birlikte diğer birçok türü tıbbi amaçla dünya genelinde kullanılmaktadır. Literatürde *Alchemilla* türleri ile ilgili etnobotanik çalışmalar yoğunlukla bulunmaktadır(37,38,41,44,45,46,47,50,51). Bunun yanısıra *Alchemilla* türlerinin içerdiği bileşiklerin izolasyonu ve yapı tayinleri, bitkinin ekstrelerinin aktivite çalışmaları da bu cinsin türleri ile ilgili yapılan diğer çalışmaları kapsamaktadır (39,47,53,54,58). Ayrıca ülkemizde Karadeniz Teknik Üniversitesi'nin yürüttüğü Türkiye'de yayılış gösteren *Alchemilla* türlerinin taksonomik ve sistematik açıdan değerlendirilmesi ile ilgili birçok çalışma yürütülmekte ve yeni türler tanımlanmaktadır(3).

### 5.1. MORFOLOJİK VE ANATOMİK ÇALIŞMALAR

*A. mollis* türünün gövde, yaprak ve pedisel enine kesitleri ile yaprak yüzeyel kesitleri alınarak karakteristik özellikleri tespit edilmiştir. Herbaryum örnekleri ve % 70' lik alkol numuneleri kullanılarak hazırlanan preparatlardan bitkinin elemanları ayrıntılı olarak incelenmiş ve bulgular mikrofotograflarla desteklenmiştir.

Araştırma konumuz olan *A. mollis* türünün çiçeklerinin morfolojik deskripsiyonu Davis'in "Flora of Turkey and the East Aegean Islands" eserindeki *Alchemilla* cins ve tür özellikleri dikkate alınarak yapılmıştır. Türkiye Florası'nda *A. mollis* türünün çiçek boyutlarının 3-6 mm genişliğinde olduğu belirtilmiştir. Bizim çalışmamızda çiçeklerin 3-4 mm genişliğinde oldukları tespit edilmiştir. Ayrıca Flora'da pediselin tüysüz olduğu belirtilmiş olup yaptığımız çalışmada seyrekte olsa tüyler görülmüştür. *Alchemilla* türlerinde korolla halkası yoktur. Epikaliks tüm türlerde mevcuttur (15). Epikaliks boyut olarak kaliksin yaklaşık yarısıdır. Kapitat stigmalı ovaryum ve 4 kısa stamen tespit edilmiştir. Bu özelliği ile de Avrupa Farmakopesi'nde belirtilen *A. xanthochlora* ile benzerlik göstermektedir.

2009 yılında Hayiroğlu ve İnceer'in yapmış olduğu bir çalışmada Türkiye'den üç yeni *Alchemilla* türü tanımlanmıştır (3). Bu türlerden *A. fissa* Ginther & Schummel türünde hipantiyum tüysüz, *A. haraldi* Juz. türünde alttaki çiçeklerde tabanda hipantiyumda tek tek tüyler, *A. pseudomollis* Juz. türünde ise hipantiyumun oldukça tüylü olduğundan bahsedilmiştir. Bizim çalışmamızda *A. mollis* türünün literatürde belirtilen *A. pseudomollis* türü ile benzerlik gözlenmektedir. Yapraktan alınan enine kesitte yaprağın bifasiyal tipte olduğu tespit edilmiştir. Orta damardan alınan enine kesitte üst yüzeyde belirgin olarak oluklu ve alt yüzeyde dış bükey olduğu görülmüştür. Yaprığın alt yüzeyinde daha yoğun olmak üzere, her iki yüzeyde de stoma görülmüştür (amfistomatik). Alt ve üst epiderma hücreleri şekil olarak birbirlerinden farklıdır (alt epidermis hücreleri zikzak, üst epidermis hücreleri ise düzensiz şekillidir).

Violeta'nın 2011 yılında *A. flabellata* Buser. ve *A. glaurescens* Wallr. türleri üzerinde yapmış olduğu yaprak morfo-anatomik çalışmalarında elde ettiği bulgularla *A. mollis* ile ilgili bizim bulgularımız genellikle paraleldir (101,102). Ancak bu çalışmalarda yaprakta herhangi bir kristal varlığından bahsedilmemiştir. *A. mollis* türünde özellikle palizat parenkimasında tek ya da kümeler halinde druz kristalleri tespit edilmiştir. Bu elde ettiğimiz bulgu Avrupa Farmakopesi'nde belirtilen *A. xanthochlora* Rothm. türünün mikroskobik özellikleriyle paralellik göstermektedir (29). *A. mollis* türünün petiyol enine kesitlerinde bazen tek bazende kümeler halinde basit billur kristallerine rastlanmıştır. Violeta'nın *Alchemilla* türleri ile yaptığı çalışmalarda böyle bir bulguya rastlanmazken Metcalfe'nin "Anatomy of the Dicotyledones" adlı eserinde petiyoldeki kristallerin varlığından bahsedilmiştir (99).

Gövde morfolojik olarak incelendiğinde neredeyse tamamen tüylü olduğu görülmüştür. Yapılan anatomik çalışmada gövdeden el ile kesitler alınmış ve mikroskop altında detaylı olarak incelenmiştir. Gövdedeki tüylerin çoğunlukla uzun ya da kısa, tek hücreli, uçları küt örtü tüyleri olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca nadir olarak başı tek sapı çok hücreli salgı tüyleri de görülmüştür.

Rosaceae familyasındaki bazı cinslerde olduğu gibi *Alchemilla*'nın bu türünde de endodermis tabakası oldukça belirgindir. Periskıl devamlı sklerenkimatik ring şeklindedir. Özellikle parenkima hücrelerinin bazılarında tanen varlığı tespit edilmiştir. Buraya kadar tespit edilen bulgular literatürle uyum göstermektedir (99-103). Bizim çalışmamızda *A. mollis* türünün parenkima hücrelerinde druz kristaline rastlanmıştır. *Violate*'nin *A. flabellata* türünün gövde anatomisini çalışmasında kalsiyum okzalat kristali gözlenmemiştir. Ayrıca Metcalfe'nin "Anatomy of the Dicotyledone" adlı eserinde de böyle bir bulguya yer verilmemiştir. Yine *Violeta*'nın yaptığı çalışmada *A. flabellata* türünün gövde kesitinde öz, dar bir alan oluştururken *A. mollis* türünde ise öz daha geniş bir alana sahiptir. *A. flabellata* türünün gövdesinde yalnızca örtü tüyleri tespit edilmiş olup bizim çalışmamızda ise örtü tüylerinin yanı sıra salgı tüyleri de tespit edilmiştir.

Bu çalışma *A. mollis* türü ile ilgili daha önce yapılmış olan herhangi bir anatomik çalışma olmaması bakımından orjinaldir.

## **5.2. SPEKTROSKOPİK VE KROMATOĞRAFİK BİLEŞİM ANALİZLERİ VE ANTİOKSİDAN AKTİVİTE ANALİZLERİ**

Bu tez kapsamında araştırma konumuz olan *A. mollis* türünün *in vitro* antioksidan etkileri ve bu etkiden sorumlu bileşikleri kantitatif ve kalitatif olarak incelenmiştir. Bu amaçla bitkiden Soxhlet ekstraksiyonu ile hekzan, etilasetat, metanol ve butanol ekstreleri, bu ekstrelerin yanısıra % 70'lik sulu metanol ekstresi ve su ekstresi hazırlanmıştır. Bu ekstreler hem antioksidan aktivite deneylerinde hem de kompozisyon analizlerinde kullanılmıştır.

*A. mollis*'in toprak üstü kısımlarından hazırlanan ekstrelerin verimleri 0.65- 31.12 mg/g aralığında olup verimler su > % 70 metanol > metanol > butanol > etilasetat > hekzan olarak sıralanmaktadır. Bitkinin toplam fenol miktarı en yüksek % 70 metanol ekstresinde (184.79 mg<sub>GAE</sub>/g<sub>ekstre</sub>) bulunmuştur. Toplam flavonoit miktarı ise en yüksek

metanol ekstresinde (50.63 mg<sub>RE</sub>/g<sub>ekstre</sub>) hesaplanmıştır. Toplam flavonol miktarı değeri en yüksek olan ekstre ise etilasetat (107.96 mg<sub>RE</sub>/g<sub>ekstre</sub>) ekstresidir.

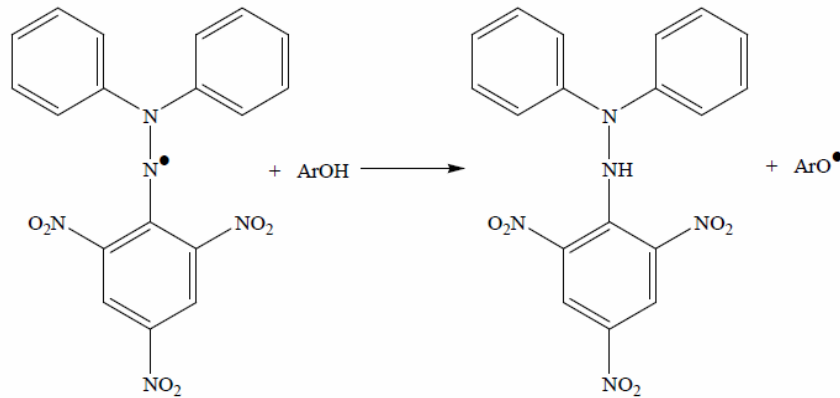
Ekstreler üzerinde yapılan YBSK analizleri sonucunda tüm ekstrelerde tanımlanan fenolik bileşikler içerisinde luteolin-*O*-glikozit butanol ekstresinde ve bitkide tanımlanan bileşenler içerisinde ana madde olarak tespit edilmiştir. Toplam luteolin-*O*-glikozit miktarı elde edilen ekstre toplamında 29.3 mg/g olarak bulunmuştur (Tablo 4.2). Ayrıca ekstrelerde kateşin, epikateşin ve metilgallat gibi tanen bileşiklerinin yapılarında bulunan maddeler de tespit edilmiştir. Literatürde *A. mollis* bitkisinden 8 flavonoit bileşiği izole edildiğinden bahsedilmekte olup bu bileşikler *cis* ve *trans*-tilirosit, rhodiolgin, hiperosit, isokersitrin, mikuelianin, gossipetin-3-*O*- $\beta$ -*D*-glikopiranosil-7-*O*- $\alpha$ -*L*-ramnopiranosit (sinnocrassoside D2), Gossipetin-3-*O*- $\beta$ -*D*-galaktopiranosil-7-*O*- $\alpha$ -*L*-ramnopiranosit'tir (11). Ayrıca "Alchemilla Türlerinde Flavonoit Bileşiklerinin Tayini ve Bu Bileşiklerin Taksomik Olarak Kullanılması" adlı doktora tezinde birçok *Alchemilla* türü ile birlikte *A. mollis* türünün flavonoitleri de çalışılmış hem YBSK hemde İTK ile kersitrin, viteksin, rutin, orientin ve isokersetin gibi bileşiklerin varlığı tespit edilmiştir (1). Çalışılan *A. mollis* ekstrelerinde ana bileşenler olarak flavonoitlerin ve tanen türevlerinin bulunması literatürle uyum göstermektedir.

Resmi farmakopemiz olan Avrupa Farmakopes'inde kayıtlı olan Alchemillae herba drogunun toplam kül ve asitte erimeyen kül miktarları farmakopede belirtildiği şekilde hesaplanmış, bitkinin sahip olduğu toplam kül miktarının % 11.8 ve asitte erimeyen kül miktarının ise % 4.45 olduğu bulunmuştur. Değerlerin farmakopede belirtilen aralıklar arasında olduğu görülmektedir. Ayrıca bitkinin volümetrik olarak taşıdığı nem miktarı ölçülmüş % 10'dan az olması gereken değer % 4 olarak bulunmuştur.

Ekstrelerin demir(III)'ü demir(II)'ye indirgeme kapasitesi hidrojen verme kapasiteleri olarak değerlendirilir. İndirgeme kapasitesi radikal zincir reaksiyonlarının başlangıç safhasında oldukça önemlidir (104). Literatürde, sulu ekstrelerin demir(III)'ü demir(II)'ye indirgeme kapasiteleri ile antioksidan aktiviteleri arasında yüksek korelasyon bulunmasına rağmen, bunun her zaman doğru olmadığı kayıtlıdır (92,105,106). Ekstrelerin demir(III)'ü demir(II)'ye indirgeme gücü test edilmiştir. Sonuçlar askorbik asite eşdeğer olarak hesaplanmış (AscAE) ve bu değerler kullanılmıştır. AscAE değeri büyüdükçe aktivite de artmaktadır. *A. mollis* ekstrelerinin

indirgeme kapasiteleri 0.15- 0.98 mmol/g AscAE değerlerinde ve en aktif ekstre de % 70 metanol ekstresi (0.98 mmol/g AscAE) olarak bulunmuştur. Fenolik asitler ve flavonoidler doğal antioksidanlar olarak bilinirler. Fenolik asitler, özellikle hidroksisinnamatlar, antioksidan aktivitelerini hidrojen vererek gösterirler (107-108). Bu tez kapsamında incelenen ekstraların içerisinde flavonoidler ve fenolik asitler tanımlanmıştır. En yüksek elektron verici ekstre olarak tespit edilen % 70 metanol ekstresinin kimyasal bileşiminin fenolik maddelerce de zengin olduğu belirlenmiştir. Fenolik asitler ve flavonoidler polar çözücülerde çözünürler ve polar sistemlerde güçlü aktivite gösterirler. Demir(III)'ü indirgeme reaksiyonu ve DPPH<sup>•</sup> radikal süpürücü etki testleri polar ortamlarda yapılmaktadır. Bu nedenle de bu bileşiklerce zengin fraksiyonlar bu deney sistemlerinde etkili olarak bulunmuşlardır. Tez kapsamında incelenen sonuçlarda indirgeme kapasitesi ile toplam fenolik madde içeriği arasında yüksek korelasyon bulunmuştur ( $y=155,9x+27,993$ ;  $R^2 = 0,9929$ ).

1,1-Difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH<sup>•</sup>) radikali, 517 nm de maksimum absorban veren stabil bir radikaldır. Antioksidan özellikli maddeler tarafından elektron ve hidrojen atom transferi ile DPPH<sup>•</sup> radikalinin hidrazin türevlerine indirgendiğinde absorban düşer (Şekil 5.1) (82).



DPPH<sup>•</sup> (antioksidant, örn. fenolik)

(DPPH-H) (antioksidant serbest radikali)

Şekil 5.1: DPPH<sup>•</sup> radikali ile antioksidan arasındaki reaksiyon

Ekstrelerin azot merkezli stabil bir radikal olan DPPH<sup>•</sup> radikalini süpürme kapasiteleri fizyolojik pH da incelenmiş ve sonuçlar IC<sub>50</sub> değerleri olarak (mg/mL) verilmiştir. IC<sub>50</sub> değeri küçüldükçe aktivite artmaktadır. Bitkiden elde edilen hekzan ekstraları

çözünürlük problemi nedeniyle bu polar deney sisteminde test edilememiştir. *A. mollis* ekstrelerinin IC<sub>50</sub> değerleri 0.21–1.21 mg/mL arasında değişmektedir. *A. mollis* bitkisinden elde edilen % 70 metanol ekstresinin DPPH radikalini süpürücü etkisi (IC<sub>50</sub>: 0.21 mg/mL) diğer ekstrele göre daha yüksek olarak bulunmuştur. Su ekstresinin IC<sub>50</sub> değeri (IC<sub>50</sub>: 0.24 mg/mL) % 70 metanol ekstresinin IC<sub>50</sub> değerine oldukça yakın olarak hesaplanmıştır. Gallik asitin IC<sub>50</sub> değeri ise 0.03 mg/mL olarak belirlenmiştir. Gallik asitin radikal süpürücü etkisi BHA, BHT ve askorbik asitten daha yüksek olarak bulunmuştur. En yüksek aktivite gösteren % 70 metanol ve su ekstrelerinin bileşimlerinin hem flavonoidler hem de tanen türevleri bakımından zengin olması nedeniyle etkiden sorumlu olarak bu bileşikler belirlenmiştir. Ekstrelerin indirgeme kapasiteleri ve DPPH• radikalini süpürücü etkileri arasında yüksek korelasyon bulunmuştur ( $y = -0,7096x + 1,0491$ ;  $R^2 = 0,9141$ ).

Hücre membranlarında bulunan lipitler linoleik asit ve araşidonik asit gibi oksidasyona oldukça müsait doymamış yağ asitleri bakımından zengindirler (109,110). Bu nedenle, bu tez kapsamında incelenen *Alchemilla* ekstrelerinin antioksidan etkileri taranırken doymamış yağ asitli deney ortamlarının kullanılması önemlidir. Bu amaçla en çok kullanılan deney modellerinden birisi  $\beta$ -karoten-linoleik asit beyazlama testidir (111). Bu emülsiyon bazlı sistemde, linoleik asitten hidrojen çıkması sonucu oluşan pentadienil serbest radikalının yüksek konjugasyona sahip olan  $\beta$ -karotene hücum etmesi sonucu reaksiyon emülsiyonunun renginin açılması esastır (112). Örneklerin  $\beta$ -karotenin renginin açılmasını inhibe etmesi ya da geciktirmesi serbest radikal süpürücü etkiyi yani antioksidan etkiyi düşündürebilir (110). *A. mollis* ekstrelerinde oksidasyonu engelleyici etki zamana bağlı olarak incelenmiş fakat zamana bağlı bir değişim gözlenmemiştir. Özellikle polaritesi yüksek olan metanol, butanol, % 70 metanol ve su ekstreleri hemen hemen benzer aktivite göstermiştir. Bu ekstreler apolar ekstrele göre daha etkin bulunmuştur. Flavonoid ve tanen içeriği fazla olan ekstrelerin aktiviteleri daha yüksek olarak tespit edilmiştir. *A. mollis* bitkisi ile yapılmış bir çalışmaya literatürde rastlanmamıştır. Diğer türlerle yapılan çalışmalarda da polar ekstrelerin aktivite gösterdiği kayıtlıdır (113).

En çok kullanılan antioksidan aktivite ölçüm metodlarından birisi ABTS<sup>•+</sup>/TEAC yöntemidir. Bu yöntem, ABTS<sup>•+</sup>'nin (2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonik asit)) oksidasyonu sonucu oluşan ABTS<sup>•+</sup> radikal çözeltisi üzerine, antioksidan içeren örneğin

eklenmesi sonucu radikalın indirgenmesi ve oluşan mavi/yeşil renkli ABTS<sup>•+</sup> radikalının renginin 600–750 nm dalga boyunda belirlenmesi ilkesine dayanmaktadır (114). Ekstrelerin ABTS<sup>•+</sup> radikalını süpürücü etkileri 0.25 ve 0.50 mg/mL dozlarda incelenmiştir. Su ve % 70 metanol ekstreleri 0.50 mg/mL dozda en yüksek aktiviteyi göstermiştir. Butanol ekstresi ise her iki dozda da benzer aktivite sergilemiştir. Hiçbir ekstre pozitif standart olarak kullanılan BHT, BHA ve gallik asit kadar aktivite gösterememiştir. *A. vulgaris*'in de su ekstresinin TEAC değeri pekçok bitki ile karşılaştırıldığında en aktif olarak literatürde kayıtlıdır (42). Bu deneyde de flavonoit ve tanen içeriği yüksek olan ekstreler yüksek aktivite göstermiş olup literatürle de uyum göstermektedir.

Yağların oksidasyonu gıdalardaki oksidatif bozulmanın ve insan vücudundaki hücrel organellerin fizyolojik fonksiyonlarının kaybının en önemli nedenidir (115). Potansiyel antioksidanlar olarak besin maddelerinin ve membran fosfolipitlerinin *in vitro* olarak değerlendirilmesi için en kullanışlı model sistemleri fosfolipitlerdir. Bu amaçla sentetik antioksidanlar serbest radikalleri uzaklaştırmak amacıyla kullanılmaktadır. Hidroksil radikali başta olmak üzere, fizyolojik olarak benzer reaktif oksijen türleri *in vivo* zincir reaksiyonlarında bozulmayı başlatır ve pek çok hastalığın oluşumunda rol oynar (116).

Bu çalışmada demir(III) ve askorbik asit varlığında fosfolipit esaslı lipozomlar hızla hidroksil radikal kaynaklı peroksidasyona tabi tutulmuş ve malondialdehit ve benzer aldehitlerin teşekkülü sağlanmıştır. Oluşan bu reaktif aldehitler 2-tiyobarbitürik asit ile reaksiyona sokularak oluşan pembe renk 532 nm de spektrofotometrik olarak ölçülmüştür. Oluşan renk şiddeti reaktif aldehit miktarı ile doğru orantılı olması nedeniyle lipit peroksidasyon miktarı ve dolayısıyla test maddelerinin antioksidan etkileri de bu şekilde tayin edilmiştir.

*A. mollis*'den elde edilen ekstreler 2-tiyobarbitürik asit reaktif türlerinin (TBARS) oluşumunu engelleyerek belli oranda antioksidan etki göstermişlerdir. Ekstrelerden butanol ekstresi en aktif (IC<sub>50</sub> 0.086 mg/mL) ekstre olarak tespit edilmiştir. Su ekstresi ise en yüksek IC<sub>50</sub> değerine sahiptir. Butanol ekstresinin bileşiminde flavonoitler ve fenolik asitler yüksek oranda bulunmaktadırlar. Ekstrelerin indirgeme kapasiteleri ile lipit peroksidasyonunu engelleyici etkileri arasında yüksek korelasyon bulunmuştur ( $y=-0,5037x+0,9493$ ;  $R^2=0,8244$ ). Ayrıca ekstrelerin toplam fenolik madde içeriği ile lipit peroksidasyonunu engelleyici etkileri arasında da yüksek korelasyon bulunmuştur

( $y=-0,0032x+1,0356$ ;  $R^2 = 0,8146$ ). Bu sonuçlara göre, ekstreler fosfolipitleri oksidasyona karşı hidroksil radikallerini lipid matriksinin içerisinde reaksiyona girmeden önce tutarak korumuşlardır. Bu nedenle ekstreler lipitçe zengin matriksi bulunan biyolojik membranlarda ve gıda ürünlerinde koruyucu olabilirler.

*A.mollis* bitkisinin antitümör etkisi literatürde çok fazla incelenmemiştir. Ancak tanen türevlerinin antikanser etkileri çeşitli kaynaklarda belirtilmektedir (72,117,118). Bitkiden elde edilen ekstrelerin sitotoksik etkileri MCF-7 (insan meme kanser hücresi) hücre dizisi üzerinde denenmiş ve hücre canlılıkları MTT ile tespit edilmiştir. Ekstreler hücelere 25-1000 µg/mL konsantrasyon aralığında 6 konsantrasyon olacak şekilde uygulanmıştır. Elde edilen sonuçlar değerlendirildiğinde tüm ekstreler yüksek dozlarda hücre canlılığını yüksek oranda inhibe etmiştir. Özellikle hekzan, etilasetat, butanol ve % 70 metanol ekstreleri 1000 µg/mL dozlarda % 50 den fazla hücre canlılığını inhibe etmiştir. Metanol ve butanol ekstreleri 100 µg/mL dozda hücre canlılığının artışı tetiklemiştir. *A. mollis* üzerine yapılmış sitotoksikite çalışması yoktur. Bazı *Alchemilla* türlerinin % 50 metanol ekstreleri ile yapılan sitotoksikite çalışmasında HeLa hücrelerinde yüksek dozlarda (200 µg/mL) hücre canlılığını inhibe ettiği kayıtlıdır (73). Yapılan çalışmamızda bulduğumuz sonuçlar literatürle uyum göstermektedir.

Sonuç olarak, *A. mollis* ekstreleri ile yapılan çalışmalar sonucunda ekstrelerin fenolik bileşim bakımından zengin olduğu ve ana bileşenlerinin flavonoidler ve tanenler olduğu tespit edilmiştir. Yapılan aktivite çalışmalarında flavonoidler ve tanenler bakımından zengin olan % 70 metanol ve su ekstrelerinin yüksek aktiviteler gösterdiği tespit edilmiştir. *A. mollis* üzerinde gerek anatomi- morfoloji gerekse kimyasal-aktivite çalışmaları çok azdır. Bu tez kapsamında bu bitki tam olarak incelenmiş ve tüm değerler karşılaştırmalı olarak verilmiştir. Burada verilen tüm sonuçlar *A. mollis* bitkisi için ilk ve orjinaldir. Bundan sonraki çalışmalarda aktivitesi yüksek ekstrelerin bileşimleri daha detaylı olarak incelenecek ve farklı aktivite çalışmaları yapılacaktır.

## 6.KAYNAKLAR

1. Kaya B. *Alchemilla* L. (Rosaceae) Cinsi Türlerinde Flavonoit Bileşiklerinin Tayin Edilmesi ve Bu Bileşiklerin Taksonomik Olarak Kullanılması, Doktora Tezi, Kırıkkale Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Kırıkkale 2009: 266.
2. Kırimer N, Köseoğlu Ç, İşcan G, Kürkçüoğlu M, Başer K.H.C. Bazı Yağaltı Sularının Uçucu Yağ Bileşikleri ve Mikrobiyal Kontrolleri. *Marmara Pharm J* 2012; 16: 23-28.
3. Ayaz HS, İnceer H. Three New *Alchemilla* L. (Rosaceae) Records From Turkey. *Pak J Bot* 2009; 41: 2093-2096.
4. İlçim A, Dığrak M. Bazı Bitki Ekstraktlarının Antimikrobiyal Etkilerinin Araştırılması. *Tr J Biol* 1998; 22: 119-125.
5. Baytop T. Türkiye’de Bitkiler İle Tedavi (2. Baskı), Nobel Tıp Kitabevi, İstanbul, 1999: 370.
6. Hamad İ, Dayı EÖ, Pekmez M, Ucar OE, Arda N. Free Radical Scavenging Activity and Protective Effects of *Alchemilla vulgaris* (L.). *J Biotechnol* 2007; 131: 40-42.
7. Choi WC, Kim CS, Hwang SS et al. Antioxidant Activity and Free Radical Scavenging Capacity Between Korean Medical Plants and Flavonoits by Assay-Guided Comparison. *Plant Sci* 2002; 163: 1161- 1168.
8. Shrivastava R, Cucuat N, John WG. Effects of *Alchemilla vulgaris* and Glycerine on Epithelial and Myofibroblast Cell Growth and Cutaneous Lesion Healing in Rats. *Phytother Res* 2007; 21: 369-373.

9. Falchero L, Coppa M, Fossi A, Lombardi G, Ramella D, Tava A. Essential Oil Composition of Lady's Mantle (*Alchemilla xanthochlora* Rothm.) Growing Wild in Alpine Pastures. *Nat Prod Res* 2010; 23: 1367-1372.
10. Vitkova AA, Yurukova PD, Evstatieva LN, Peev DR. High-mountain Medicinal Plants in Bulgaria- Protection, Phytotherapy, Reproductive Capacity and Sustainable Use, 59<sup>th</sup> International Congress and Annual Meeting of the Society for Medicinal Plant and Natural Product Research, s.1391, 4-9 Eylül 2011, Antalya, Türkiye.
11. Trendafilova A, Todorava M, Gavrilova A, Vitkova A. Flavonoit Constituents and Free Radical Scavenging Activity of *Alchemilla mollis*. *Natural Product Communications* (Vol. 6) 2011; 12: 1851-1854.
12. WEB\_1. (2008). Online Atlas of British & Irish Flora. <http://www.brc.ac.uk/plantatlas> (10.12.2012).
13. Folta MK, Gardiner ES. *Genetics and Genomics of Rosaceae* (Vol. 6), Springer Science and Business Media, New York 2009; 3-5.
14. Tanker N, Koyuncu M, Coşkun M. *Farmasötik Botanik* (3. Baskı), Ankara Üniversitesi Basımevi, Ankara, 2007: 222-223.
15. Davis PH. *Flora of Turkey and the East Aegean Islands* (Vol.4), Edinburgh University Press, Edinburgh, 1972: 81-106.
16. Akman Y, Ketenoglu O ve ark. *Angiospermae (Kapalı Tohumlular)*, Palme Yayıncılık, Ankara 2007: 281.
17. Townsend CC, Guest E, Al-Rawi A. *Flora of Iraq* (Vol. 2), Ministry of Agriculture of the Republic of Iraq, Baghdad 1966: 132-135.
18. Fröhner S. *Flora Iranica*, Akad Druck-u Verlangsat, Graz, 1969.
19. Juzepczuk SW. *Flora of the SSSR*, Izd. Akad. Nauk. SSSR, Moskva Leningrad, 1971.
20. Grossheim AA. *Flora Kavkaza*, Izdatelectvo, Akademi Nauk. SSSR, Moskva Leningrad, 1952.
21. Vitkova AA. A Comparative Assesment and Dynamic Acumulation of Flavonoids and Tannins in Species of *Alchemilla* L. (Rocaceae). *Fitologija*, Sofia 1996; 48: 11-17.
22. Post EG. *Flora of Syria, Palestine and Sinai*, American Press, Beirut, 1932

23. Mouterde P. Nouvelle Flore Du Liban Et De La Syrie,
24. Hayek A. Prodrômus Florae Peninsulae Balcanicae, Verlag Des Repertoriums, Berlin 1974.
25. Halacsy E. Florae Graecae(Vol.1), Wheldon& Wesley LTD, New York 1968.
26. Web\_2.(1998).Plant Crib. <http://www.bsbi.org.uk/Alchemilla.pdf>.(20.10.2012).
27. Türkiye Bitkileri Listesi (Damarlı Bitkiler) (2012).
28. Vitkova A, Gavrilova A, Tashev A. *Alchemilla mollis* (Rosaceae)-A critically endangered species in Bulgaria. *Phytologia Balcanica* 2011; 17 : 123-128.
29. European Pharmacopoeia 6.0 (Vol.2) *Alchemillae Herba*.01/2008: 1123.
30. Evans WC. Trease and Evans Pharmacogsy (Fifteenth Edition), W.B. Saunders Published, .Edinburg, 2002: 26- 226.
31. British Pharmacopoeia, *Alchemilla*, British Pharmacopea Publication 2009: 3328.
32. British Pharmacopoeia, *Alchemilla*, British Pharmacopea Publication, 2011: 3371.
33. Panda H. Medicinal Herbs With Uses, Asia Pasific Business Press 2004: 71-72.
34. Wood M. The Book of Herbal Wisdom, North Atlantic Books, Berkeley California 1997: 113-122.
35. Web\_3. (2006). Moosey's Country Garden. <http://www.mooseyscountrygarden.com/perennial-plants/alchemilla-mollis.html>. (21.11.2012).
36. Wood M. The Earthwise Herbal: A Complete Guide to Old World Medicinal Plants, North Atlantic Books, Berkeley California 2008: 65-69.
37. Altundağ E, Öztürk M. Etnomedicinal Studies on the Plant Resources of East Anatolia, Turkey. *Procedia Social and Behavioral Sciences* 2011; 19: 756-777.
38. Özüdoğru B, Akaydın G, Erik S, Yeşilada E. Inferences from an Etnobotanical field expedition in the selected location of Sivas and Yozgat provinces (Turkey), *J Ethnopharmacol* 2011; 137: 85-98.

39. Trouillas P, Calliste C, Allais D et al. Antioxidant, Anti-Inflammatory and Antiproliferative Properties of Sixteen Water Plant Extracts Used in the Limousin Countryside as Herbal Teas. *Food Chem* 2003; 80: 399-407.
40. D'Agostino M, Dini I, Ramundo E, Senatore F. Flavonoit Glycosides of *Alchemilla vulgaris* L. *Phytother Res* 1998; 12: 162-163.
41. Leporatti ML, Ivancheva S. Preliminary Comparative Analysis of Medicinal Plants Used in the Traditional Medicine of Bulgaria and Italy. *J Ethnopharmacol* 2003; 87: 123-142.
42. Kiselova Y, Ivanova D, Chervenkov T et al. Correlation Between the in Vitro Antioxidant Activity and Polyphenol Content of Aqueous Extracts from Bulgarians Herbs, *Phytoth Phytother Res* 2006; 20: 961-965.
43. Pawlaczyk I, Czerchawski L, Pilecki W, Lamer-Zarawska E, Gancarz R. Polyphenolic-Polysaccharide Compounds from Selected Medicinal Plants of Asteraceae and Rosaceae Families: Chemical Characterization and Blood Anticoagulant Activity. *Carbohydr Polym*; 2009; 77: 568-575.
44. Aburjai T, Hudaib M, Tayyem R, Yousef M, Qishawi M. Ethnopharmacological Survey of Medicinal Herbs in Jordan, The Ajloun Heights Region. *J Ethnopharmacol* 2007; 110: 294-304.
45. Said O, Khail K, Fulder S, Azaizeh H. Ethnopharmacological Survey of Medicinal Herbs in Israel, The Golan Heights and The West Bank Region, *J Ethnopharmacol* 2002; 83: 251-265.
46. Sarić-Kundalić B, Dobeš C, Klatter-Asselmeyer V, Saukel J. Ethnobotanical Survey of Traditionally Used Plants in Human Therapy of East, North and North-East Bosnia and Herzegovina. *J Ethnopharmacol* 2011; 133: 1051-1076.
47. Menkovića N, Savikina K, Tasića S et al. Ethnobotanical Study on Traditional Uses of Wild Medicinal Plants in Prokletije Mountains (Montenegro). *J Ethnopharmacol* 2011; 133: 97-107.
48. Culbert PT, Banez AG. Wetting The Bed: Integrative Approaches to Nocturnal Enuresis, *Pediatrics* 2008; 4: 215-220.

49. Fraisse D, Heitz A, Carnat A, Carnat PA, Lamaison LJ. Quercetin 3-arabinopyranoside, A Major Flavonoid Compound from *Alchemilla xanthochlora*, *Fitoterapia* 2000; 71: 463-464.
50. Agelet A, Valles J. Studies on Pharmaceutical Ethnobotany in the Region of Pallars (Pyrenees, Catalonia, Iberian Peninsula) Part II. New or Very Rare Uses of Previously Known Medicinal Plants. *J Ethnopharmacol* 2003; 84: 211-227.
51. Ghafoor A, Siddiqui US, Jatoi AS, Rabbani AM. Phytotherapy: Research Gaps in Pakistan, *Pak. J. Bot.* 2011; 43: 175-182.
52. Johnson T. *CRC Ethnobotany Desk Reference*, Crc Press Boca Raton London Newyork Washington D.C. 1999; 26.
53. Trendafilova A, Todorova M, Gavrilova A, Vitkova A. Flavonoid Glycosides from Bulgarian Endemic *Alchemilla achtarowii* Pawl. *Biochem Syst Ecol* 2012; 43: 156–158.
54. Nikolova MT, Dincheva I, Vitkova AA, Badjakov I. Phenolic Acids and Free Radical Activity of Bulgarian Endemic –*Alchemilla jumrukczalica* Pawl. 59 th International Congress and Annual Meeting of the Society for Medicinal Plant and Natural Product Research, s.1391, 4-9 Eylül 2011, Antalya, Türkiye.
55. Heim EK, Taglioferro RA, Bobilya JD. Flavonoid Antioxidants: Chemistry, Metabolism, and Structure-Activity Relationships. *J Nutr Biochem* 2002; 13: 572-584.
56. Kaya B, Menemen Y, Saltan FZ. 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.* 2012; 2: 595-597.
57. Moller C, Honore Hansen S, Claus C. Characterisation of Tannin- Containing Herbal Drugs by HPLC. *Phytochem Analysis* 2009; 20: 231-239.
58. Olafsdottir SE, Omarsdottir S, Jaroszewski WJ. Constituents of Three Icelandic *Alchemilla* Species, *Biochem Syst Ecol* 2001; 29: 959-962.
59. Fai MY, Tao CC. A Review of Presence of Oleanolic Acid in Natural Products. *Natura Proda Medica* 2009; 1-271.

60. Mutaftchiev K, Tzachev K. Determination of Manganese (II) in Some Medicinal Plants and Their Decoctions by A Kinetic Spectrophotometric Method. *Phytochem. Anal.* 2003; 14: 160–163.
61. Wilkes S, Glasl H. Isolation, Characterization and Systematic Significance of 2-Pyrone-4, 6-Dicarboxylic Acid in Rosaceae, *Phytochem* 2001; 58: 441–449.
62. Barbour KE, Al M, Sagherian KV et al. Screening of Selected Indigenous Plants of Lebanon for Antimicrobial Activity, *J Ethnopharmacol* 2004; 93: 1-7.
63. Buruk K, Sokmen A, Aydin F, Erturk M. Antimicrobial Activity of Some Endemic Plants Growing in The Eastern Black Sea Region, Turkey, *Fitoterapia* 2006; 77: 388–391.
64. Kaya E, Karatoprak G, Koşar M, Özbilge H, Başer KHC. Antimicrobial Properties of *Alchemilla mollis*. 9<sup>th</sup> International Symposium on Pharmaceutical Sciences (ISOPS-9), 23-26, 2009, Ankara, Türkiye.
65. Veal L. A Comparison of the Use of Complementary Therapies in Australia and Iceland, *Complementary Therapies in Nursing & Midwifery* 2001; 7: 72-77.
66. Oktyabrsky O, Vysochina G, Muzyka N et al. Assessment of Anti-oxidant Activity of Plant Extracts Using Microbial Test Systems. *J Appl Microbiol* 2009; 106: 1175-1183.
67. Shrivastava R. Clinical Evidence to Demonstrate that Simultaneous Growth of Epithelial and Fibroblast Cells is Essential for Deep Wound Healing. *Diabetes Research and Clinical Practice* 2011; 92: 92-99.
68. Shrivastava R, John GW. Treatment of Aphthous Stomatitis with Topical *Alchemilla vulgaris* in Glycerine, *Clin Drug Invest* 2006; 26: 567-573.
69. Schimmer O, Lindenbaum M. Tannins with Antimutagenic Properties in the Herb of *Alchemilla* Species and *Potentilla anserina*, *Planta Med.* 1995, 61: 141- 145.
70. Benaiges A, Marcet P, Armengol R, Betes C, Girones E. Study of Refirming of a Plant Complex. *Int J Cosmet Sci* 1998; 20: 223-230.

71. Pawlaczyk I, Czerchawski L, Pilecki W, Lamer-Zarawska E, Gancarz R. Polyphenolic-polysaccharide compounds from selected medicinal plants of Asteraceae and Rosaceae families: Chemical Characterization and Blood Anticoagulant Activity. *Carbohydr Polym* 2009; 77: 568-575.
72. Mazzio EA, Soliman FK. In vitro Screening for the Tumoricidal Properties of International Medicinal Herbs, *Phytotherapy Res* 2009, 23: 385–398.
73. Türk M, Kaya B, Menemen Y, Oğuztüzün S. Apoptotic and Necrotic Effects of Plant Extracts Belonging to the Genus *Alchemilla* L. Species on HeLa cells in vitro. *J Med Plants Res*, 5: 4566-4571.
74. Said O, Saad B, Fulder S, Khalil K, Kassis E. Weight Loss in Animals and Humans Treated with “Weighlevel” A Combination of Four Medicinal Plants Used in Traditional Arabic and Islamic Medicine, *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* 2008; 2011: 1-6.
75. Dürig A, Kouskoumvekaki I, Vejborg RM, Klemm P. Chemoinformatics-Assisted Development of New Anti-Biofilm Compounds, *Appl Microbiol Biotechnol* 2010; 87: 309–317.
76. Bilgin HM, Atmaca M, Obay DB ve ark. Protective Effects of Coumarin and Coumarin Derivatives Against Carbontetrachloride-Induced Acute Hepatotoxicity in Rats. *Experimental and Toxicologic Pathology* 2011; 63: 25–330.
77. Cooper R. Age- Reversing Free Radical Fighters Antioxidants, Woodland Publishing, Utah 1997: 5-11.
78. Peltoketo A. Oxidation and Its Prevention: In vitro Evaluation of the Antioxidant Properties of Natural Phenolic Substances Using The Free Radical DPPH• Method, Yüksek Lisans Tezi, University of Helsinki, Division of Pharmacognosy, Helsinki Finland, 2000: 20.
79. Göger F. *Salvia virgata* Jacq. ve *Salvia halophila* Hedge'nin Antioksidan Etkilerinin ve Bileşimlerinin Belirlenmesi, Yüksek Lisans Tezi, Anadolu Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Eskişehir, 2006: 98.
80. Panglossi HV. New Developments in Antioxidants Research, Nova Science Publisher, New York USA, 2006: 1.

81. Aydın A, Sayal A, Işimer A. Serbest Radikaller ve Antioksidan Savunma Sistemi. Gülhane Askeri Tıp Akademisi Basımevi, 2001; 20: 2-70
82. Bachmayer O. Antioxidant Properties of Aqueous Extracts from Selected Culinary Herbs, Yüksek Lisans Tezi, University of Helsinki, Division of Pharmacognosy, Helsinki, Finland, 2004: 85.
83. Olinescu R, Smith TL. Free Radical in Medical. ISBN 1-56072-869-8. 2002. New York 2002: 1-2.
84. Halliwell B. Free Radical Reactions in Human Disease, In. Enviromental Stressors In Health and Disease, Fuchs J. (Ed.), Marcell Dekker Incorporated, New York, 2001: 3.
85. Yalçın AS. Antioksidanlar. Klinik Gelişim1998; 11: 342-346.
86. Güneş HV, Başaran A. Hücre Yapısı, Tıbbi Biyoloji ve Genetik (1), Güler AD.(editor), Anadolu Üniversitesi Basımevi, Eskişehir 2006: 11.
87. Mukhopadhyay A.K. Antioxidants Natural and Synthetic. ISBN-13: 978-3-938054-05-5. Kiel, Almanya 2006.
88. Çelebioğlu S, Baytop T. A New Reagent for Microscopical İnvestigation of Plant. Publication of the İnstitüte of Pharmacognosy 1949; 10: 301.
89. Singleton VL, Orthofer R, Lamuela-Ravento´S RM. Analysis of Total Phenols and Other Oxidation Substrates and Antioxidants by Means of Folin-Ciocalteu Reagent. In Methods in Enzymology, Packer, L. (Ed.), Academic Press, San Diego, CA, 1999; 299: 152-315,
90. Miliauskas G, Venskutonis PR, Van-Beek TA. Screening of Radical Scavenging Activity of Some Medicinal and Aromatic Plant Extracts. Food Chem 2004; 85: 231-237.
91. Türk Farmakopesi. Milli Eğitim Basımevi, İstanbul 1974: 878.
92. Dorman HJD, Koşar M, Kahlos K, HolmY, Hiltunen R. Antioxidant Properties and Composition Aqueous Extracts from *Mentha* Species, Hybrids, Varieties, and Cultivars. J Agr Food Chem 2003; 51: 4563of -4569.

93. Gyamfi MA, Yonamine M, Aniya Y. Free-Radical Scavenging Action of Medicinal Herbs from Ghana *Thonningia Sanguinea* on Experimentally Induced Liver Injuries. *General Pharmacology* 1999; 32: 661-667.
94. Oomah BD, Mazza G. Flavonoids and Antioxidative Activities in Buckweat. *J Agr Food Chem* 1996; 44: 1746-1750.
95. Velioglu YS, Mazza G, Oomah BD. Antioxidant Activity and Total Phenolics in Selected Fruits, Vegetables, and Grain Products. *J Agr Food Chem* 1998; 46: 4113-4117.
96. Re R, Pellegrini N, Proteggente A et al. Antioxidant Activity Applying an Improved ABTS Radical Cation Decolorization Assay. *Free Radical Bio Med* 1999; 26: 1231-1237.
97. Aruoma G I, Spencer JPE, Warren QD, Jenner P, Butler P, Halliwell B. Characterization of Food Using Commercial Garlic Antioxidants, *Illustrated and Food Chemistry* 1997; 60: 149-156.
98. Yücel Ç. Doksisiklinin Lipozom ve Nanopartikül Formülasyonlarının Geliştirilmesi ve Hücre Kültüründen Geçişlerinin İncelenmesi, Yüksek Lisans Tezi, Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara 2010: 165.
99. Metcalfe CR, Chalk L. *Anatomy of the Dicotyledones*. Oxford at the Clarendon Press. 1968, 539- 543.
100. Rao Y, Xiang B. Determination of Total Ash and Acid-insoluble Ash of Chinese Herbal Medicine of *Prunellae spica* by Near Infrared Spectroscopy. *Yakugaku Zasshi* 2009; 129: 881-886.
101. Violeta B. The leaf morpho-anatomy of *Alchemilla flabellata* species. *Annals of the University of Craiova Agriculture, Montanology, Cadastre Series* 2011, 41(2): 59-65.
102. Violeta B. Morpho-Anatomical consideration on the Leaf from *Alchemilla glaurescens* species. *Annals of the University of Craiova Agriculture, Montanology, Cadastre Series* 2011, 41(2): 42-46.

103. Violeta B. Morpho-anatomical consideration on the stem from the *Alchemilla flabellata* Species. Annals of the University of Craiova Agriculture, Montanology, Cadastre Series 2011, 41: 55-58.
104. Yıldırım A, Mavi A, Oktay M, Kara AA, Algur ÖF, Bilaloğlu V. Comparison of Antioxidant and Antimicrobial Activities of Tilia (*Tilia Argentea* Desf Ex Dc), Sage (*Salvia Triloba* L.), and Black Tea (*Camellia Sinensis*) Extracts. J Agr Food Chem 2000; 48: 5030-5034.
105. Dorman HJD, Bachmayer O, Koşar M, Hiltunen R. Antioxidant Properties of Aqueous Extracts from Selected *Lamiaceae* Species Grown in Turkey. J Agr Food Chem 2004; 5: 762-770.
106. Koşar M, Dorman HJD, Hiltunen R. Effect of an Acid Treatment on The Phytochemical and Antioxidant Characteristics of Extracts from Selected *Lamiaceae* Species. Food Chem 2005; 91: 525-533.
107. Rice-Evans CA, Miller NJ, Paganga G. Structure-Antioxidant Activity Relationships of Flavonoids and Phenolic Acids, Free Radical Bio Med 1996; 20: 933-956.
108. Gu L, Weng X. Antioxidant Activity and Components of *Salvia plebeia* R.Br.-A Chinese Herb, Food Chem 200; 73: 299-305.
109. Braca A, Politi M, Sanogo R et al, Chemical Composition and Antioxidant Activity of Phenolic Compounds from Wild and Cultivated *Sclerocarya birrea* (Anacardiaceae) Leaves. J Agr Food Chem 2003; 51: 6689-6695.
110. Liyana-Pathirana CM, Shahidi F. Antioxidant Properties of Commercial Soft and Hard Winter Wheats (*Triticum aestivum* L.) and Their Milling Fractions. J Sci Food Agr 2006; 86: 477-485.
111. Koleva II, Van Beek T, Linssen JPH, De Groot A, Evstatieva LN, Screening of Plant Extracts for Antioxidant Activity: A Comparative Study on Three Testing Methods. Phytochem Analysis 2002; 13: 8-17.
112. Amarowicz R, Pegg RB, Rahimi-Moghaddam P, Barl B, Weil JA. Free-Radical Scavenging Capacity and Antioxidant Activity of Selected Plant Species from the Canadian Prairies. Food Chem 2004; 84: 551-562.

113. Filipek J. The Effect of *Alchemilla xantochlora* Water Ekstract on Lipid Peroksidation and Superoxid Anion Scavenging Activity. *Pharmazie* 1992; 47: 717-718.
114. Apaydın E. Nar Suyu Konsantresi Üretim Ve Depolama Sürecinde Antioksidan Aktivitedeki Değişimleri, Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara 2008; 64.
115. Yokoyama M. Oxidant Stress and Atherosclerosis. *Curr Opin Pharmacol* 2004; 4: 110-115.
116. Chatterjee SN, Agarwal S. Liposomes as a Membrane Model for Study of Lipid Peroxidation. *Free Radical Bio Med* 1988; 4: 51-72.
117. Okudo T. Systematics and Health Effects of Chemically Distinct Tannins in Medicinal Plants. *Phytochemistry* 2005; 66: 2012-2013.
118. Wang CC, Chen CL, Yang LL. Cuphiin D1, The Macrocyclic Hydrolyzable Tannin Induced Apoptosis in HL-60 Cell Line. *Cancer Lett* 2000; 149: 77-83.

## ÖZGEÇMİŞ

### KİŞİSEL BİLGİLER

Adı, Soyadı: Selen Ertürk

Uyruğu: Türkiye Cumhuriyeti (TC)

Doğum Tarihi ve Yeri: .26.05.1986 / KAYSERİ

Medeni Durumu: Evli

Email: erturkselen@gmail.com

Yazışma Adresi: Erciyes Üniversitesi Eczacılık Fakültesi . Farmasötik Botanik ABD.  
KAYSERİ

### EĞİTİM

Derece	Kurum	Mezuniyet Tarihi
Lisans	ErciyesÜ. Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü	2009
Lise	Sami Yangın Anadolu Lisesi	2004

### İŞ DENEYİMLERİ

Yıl	Kurum	Görev
2012-halen	Erciyes Üniversitesi	Araştırma Görevlisi

### YABANCI DİL

İngilizce