

Malva Neglecta Wallr. Bitkisinin Kimotripsin, Üreaz İnhibe Edici ve Antioksidan Aktivitesi *

Chymotrypsin, Urease Inhibitory and Antioxidant Activities of *Malva Neglecta* Wallr Tuğba Günbatanⁱ, Ece Miser Salıhoğluⁱⁱ, Sevgi Akaydınⁱⁱⁱ, Galip Akaydın^{iv}, İlhan Gürbüz^v

ⁱDr. Öğr. Üyesi, Gazi Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Farmakognozi AD. <https://orcid.org/0000-0002-1138-3145>

ⁱⁱDr. Arş. Gör. Gazi Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Biyokimya AD.

<https://orcid.org/0000-0003-0681-3566>

ⁱⁱⁱProf. Dr., Gazi Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Biyokimya AD. <https://orcid.org/0000-0002-0927-5188>

^{iv}Prof. Dr., Hacettepe Üniversitesi Eğitim Fakültesi, Matematik ve Fen Bilimleri Eğitimi Bölümü

<https://orcid.org/0000-0003-3728-0176>

^vProf. Dr., Gazi Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Farmakognozi AD. <https://orcid.org/0000-0002-3670-0899>

ÖZ

Amaç: Bu çalışmada *Malva neglecta* Wallr.'nin kimotripsin ve üreaz enzimlerini inhibe edici aktivitesinin tespiti ve ayrıca antioksidan aktivitesi, toplam fenol ve flavonoid içeriğinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

Yöntem: 2021 yılı Nisan-Haziran ayları arasında bitkinin çiçekli ve meyveli toprak üstü kısımlarından metanol ve su ekstresi hazırlanmış ve bu ekstraların in vitro üreaz ve kimotripsin inhibitör aktivitesi belirlenmiştir. Antioksidan aktivitenin tespiti için ABTS, CUPRAC ve DPPH yöntemleri kullanılmıştır. Toplam fenol ve flavonoid içerikleri ise sırasıyla Folin Ciocalteu ve alüminyum klorür kolorimetrik yöntemleri kullanılarak belirlenmiştir.

Bulgular: Metanol ekstresi önemli düzeyde kimotripsin inhibe edici aktivite göstermiştir (IC₅₀: 67.67 µg/mL); üreaz enzimi üzerinde ise hem su hem metanol ekstresi orta düzeyde inhibe edici etki göstermiştir (sırasıyla %36.52 ve 34.38 inhibisyon). DPPH ve CUPRAC testlerinde metanol ekstresi daha yüksek antioksidan aktivite sergilerken; ABTS testinde su ekstresi daha yüksek radikal süpürücü aktivite göstermiştir. DPPH ve CUPRAC testlerinde elde edilen sonuçlarla paralel olarak metanol ekstresinin flavonoid içeriğinin daha yüksek olduğu anlaşılmıştır (42.93 mg rutin eşdeğeri/g).

Sonuç: Sonuç olarak *M. neglecta* kuvvetli kimotripsin inhibe edici aktivitesi ile dikkat çekmiştir. Üreaz inhibe edici aktivitesi ve flavonoid içeriğiyle paralel antioksidan aktivitesi de dikkate alındığında bitki üzerinde daha kapsamlı çalışmaların yapılması gerektiği sonucuna varılmıştır.

Anahtar Kelimeler: *Malva Neglecta*, Kimotripsin, Üreaz, Antioksidan, Tıbbi Bitki.

ABSTRACT

Objective: In this study, determining the chymotrypsin and urease inhibitory activities as well as antioxidant activity, total phenol and flavonoid content of *Malva neglecta* Wallr. were aimed.

Method: Between April-June 2021, methanol and water extracts were prepared from the flowering and fruiting aerial parts of the plant. Then, in vitro urease and chymotrypsin inhibitory activity were determined. ABTS, CUPRAC and DPPH methods were used to determine the antioxidant activity. Total phenol and flavonoid contents were determined using Folin Ciocalteu and aluminum chloride colorimetric methods, respectively.

Results: The methanol extract showed significant chymotrypsin inhibitory activity (IC₅₀: 67.67 µg/mL); on the other hand, both water and methanol extracts moderately inhibited the urease enzyme (36.52 and 34.38% inhibition, respectively). While the methanol extract exhibited higher antioxidant activity in DPPH and CUPRAC tests; the water extract showed higher radical scavenging activity in the ABTS test. In parallel with the results obtained in the DPPH and CUPRAC tests, flavonoid content of the methanol extract was found to be higher (42.93 mg rutin equivalent/g).

Conclusion: In conclusion, *Malva neglecta* attracted attention with its potent chymotrypsin inhibitory activity. Also considering its urease inhibitory activity and antioxidant activity parallel to its flavonoid content, it was concluded that more comprehensive studies should needs to be done on this plant.

Keywords: *Malva Neglecta*, Chymotrypsin, Urease, Antioxidant, Medicinal Plant.

* Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Lokman Hekim Tıp Tarihi ve Folklorik Tıp Dergisi 2023; 13 (2):459-468

DOI: 10.31020/mutfd.1266561

e-ISSN: 1309-8004

Geliş Tarihi – Received: 16 Mart 2023; Kabul Tarihi - Accepted: 27 Nisan 2023

İletişim - Correspondence Author: Tuğba Günbatan < tugbagunbatan@gazi.edu.tr >

Giriş

Bitkiler, mantarlar gibi çeşitli canlılarda bulunan üreez, ürenin hidrolizini katalize eden bir enzimdir.¹ Peptik ülserlerin en önemli etkenlerinden biri olarak kabul edilen *Helicobacter pylori* de mide ve duodenumda kolonize olabilmesi için üreez enzimine ihtiyaç duymaktadır. Ayrıca üreez enziminin ürolitiazis ve akut piyelonefrit etkenlerinden biri olan *Proteus mirabilis* ve artrite neden olabilen *Yersinia enterocolitica*'nın patojenizde de rol oynadığı bilinmektedir. Dolayısıyla bu enzimin inhibisyonu ürolitiazis, akut piyelonefrit, *H. pylori* pozitif ülserler ve peptik ülser esnasında ikincil olarak görülebilen B12 vitamini eksikliği, demir eksikliği anemisi, idiyopatik trombositopenik purpura ve gastrik kanserlerin önlenmesi veya tedavisi için araştırılan mekanizmalardan biridir.²⁻⁴ İnsan sağlığı üzerindeki etkisinin yanı sıra bu enziminin aktivitesinin kontrol altında tutulması tarımsal verimlilik ve ekolojik denge açısından da gereklidir. Tarımda N-(*n*-butil) tiyofosforik triamit (NBPT) gibi üreez inhibitörleri kullanılarak hem toprağın azot içeriğinin düşürülüp pH'sının yükselmesinin, hem de üreli gübrelerin kullanımı sonucu topraktaki bakterilerin ürettiği üreez enzimi ile atmosfere amonyak salınımının önüne geçilmeye çalışılmaktadır.^{1,5} Günümüzde üreez'i inhibe eden bileşiklerin tespitine yönelik araştırmalar artmakla birlikte sadece asetohidroksamik asit klinik kullanım için onay alabilmiştir.⁶ Bu nedenle yeni üreez inhibitörlerinin keşfi ekoloji, tarım ve daha da önemlisi insan sağlığı açısından oldukça önemli bir konudur.

Kimotripsin enzimi ise başlıca protein sindiriminde rol almaktadır.^{7,8} Bilindiği üzere, yağların ve karbohidratların aksine insan vücudunda özel bir protein ve amino asit deposu yoktur. Biyolojik işlemler için kullanılmadığı takdirde, vücuttaki fazla amino asitler deaminasyona uğrayarak alfa-ketoasitleri oluşturmaktadır. Karboksil grubu içeren bu karbon iskeleti (alfa-ketoasitler) oksitlenmektedir ve glikoliz, glukoneogenez, KREBS döngüsü, pentoz fosfat yolu ve yağ asidi biyosentezi yollarına farklı basamaklardan girerek metabolize olmaktadır. Dolayısıyla kimotripsinin inhibisyonu obezite tedavisinde hedeflerden biri olarak düşünülmektedir.^{9,10} Diğer taraftan bu enzim fibrin pıhtılarının, kanser hücrelerinin etrafındaki proteinlerin sindirimi, enflamatuvar sitokinlerin üretimi gibi pek çok fizyolojik olayda da rol oynamaktadır. Bu nedenle aktivitesinin inhibisyonu veya modülasyonu enflamatuvar hastalıklar, irritabil bağırsak sendromu, ülseratif kolit, kanser, hipertansiyon gibi hastalıkların tedavisi için potansiyel bir strateji haline gelmiştir.^{7,11-13} Yakın zamanda pandemiye neden olan SARS-COV-2 enfeksiyonu başta olmak üzere farklı hastalıklar üzerindeki araştırmalarda da bu enzime odaklanılmıştır.^{12, 14-15} Klinik kullanımına izin verilen bir adet kimotripsin inhibitörü bulunmaktadır. Ulinastatin® jenerik adı ile piyasaya sürülen bu ürün akut-kronik pankreatit, Stevens-Johnson sendromu, yanık, septik şok ve toksik epidermal nekrolizis gibi durumlara endike olmakla birlikte yan etkileri bulunmakta ve intravenöz yoldan uygulanabilmektedir. Dolayısıyla yan etkisi olmayan, ucuz, oral yoldan uygulanabilecek kimotripsin inhibitörlerine ihtiyaç vardır.

Canlı organizmada yaşamsal faaliyetler esnasında ortaya çıkan, eşleşmemiş elektronlara sahip atomlar, moleküller veya iyonlar olarak bilinen serbest radikaller ile antioksidan savunma mekanizmaları arasında var olan dengenin bozulması oksidatif stresi; oksidatif stres ise makromoleküllerin oksidatif modifikasyonuna, doku hasarına ve hızlandırılmış hücre ölümüne kadar giden patolojik durumları meydana getirebilmektedir. Antioksidan etkili moleküllerin ise reaktif oksijen türlerinin oksidatif süreçlerini dolayısıyla muhtemel zararlı etkilerini azalttığı bilinmektedir. Oksidatif stres pek çok hastalığın patogeneğinde olduğu gibi peptik ülserin meydana gelmesinde de rol oynayan önemli mekanizmalardan biridir. Dolayısıyla *Helicobacter pylori*'nin midedeki zararlı etkilerine neden olan üreez enzimini inhibe edebilen ekstre/bileşiklerin aynı zamanda antioksidan aktiviteye de sahip olması, peptik ülser hastalığı için daha etkin ve birden fazla mekanizma ile tedavi imkanı verebileceğinden oldukça önemlidir.¹⁶

Bitkiler, tüm ilaç geliştirme çalışmalarında olduğu gibi yeni üreez ve kimotripsin inhibitörlerinin tespiti için de oldukça zengin bir kaynak ve başlangıç noktasını oluşturmaktadır. Ancak gerek ülkemizdeki ve gerekse

dünyadaki bitki çeşitliliği, hepsinin taranmasını son derece güç bir hale getirmesi nedeniyle bu bitkiler arasından seçim yapılarak ön tarama çalışmalarının planlanması gerekmektedir. Bu nedenle yukarıda bahsedilen enzimlerin yer aldığı rahatsızlıklarda halk arasında kullanılan bitkilerin seçilmesi, yani halk ilaçları arasından seçilmesi son derece uygun olacaktır. Halk ilaçları, yüzyıllardır kullanılmaları, fayda sağlamayan veya zararları görülenlerin kullanımından vazgeçilmesi gibi nedenlerle aktivitenin tespiti için daha büyük başarı şansı sunmakta, doğal toksisite testleri yapılmış gibi değerlendirilebilmekte ve yeni ilaç aday adaylarının araştırılmasında çok zengin bir kaynak oluşturmaktadır.¹⁷ Günümüzde aspirin, artemisinin, galantamin gibi ilaçlar etnobotanik kullanımından hareketle ilaç etken maddesine ulaşım konusunda verilebilecek örneklerden sadece bir kaçıdır.¹⁸⁻²⁰ Çalışma grubumuz tarafından yapılan halk ilacı araştırmamız ve ilaveten literatür taraması sonuçlarımızda, *Malva neglecta* Wallr.'ın toprak üstü kısımlarının halk arasında obezite, idrar yolu enfeksiyonları, mide ağrısı, peptik ülser, karın ağrısı, bağırsak rahatsızlıkları gibi gastrointestinal sistem hastalıklarının tedavisinde ve antienflamatuvar, analjezik, immunostimulan olarak kullanıldığı tespit edilmiştir.²¹⁻²⁵ Bu araştırmada da *M. neglecta*'nın halk arasındaki kullanımlarından yola çıkılarak üreez ve kimotripsin enzimini inhibe edici aktivitesinin değerlendirilmesi amaçlanmıştır. Aynı zamanda bitkinin farklı yöntemlerle (ABTS, DPPH, CUPRAC) antioksidan aktivitesi, toplam fenol ve flavonoid içeriği de tespit edilmiştir. Yapılan çalışma bitkinin yukarıda da değinilen halk arasındaki kullanımlarına kimotripsin ve üreez enzim yollarının yanı sıra, antioksidan etki ile katkı sağlayıp sağlamadığının belirlenmesi konusunda bilgi sahibi olunması açısından da önemlidir. Böylelikle halk ilaçlarından ilaca giden yoldaki temel araştırmaların başlaması, çeşitlenmesi ve sonraki çalışmaların yönlendirilmesine önemli bir zemin oluşturmakta, *M. neglecta*'nın halk arasındaki kullanımlarından en azından bazılarının bilimsel yöntemlerle doğruluğunun araştırılmasına imkân sunmaktadır.

Gereç ve yöntem

Bitki Materyali

M. neglecta Düzce, Gölyaka'dan (09DZ177) toplanmış, bilimsel adı Prof. Dr. Galip AKAYDIN tarafından tayin edilmiştir. Herbarium örneği Gazi Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Herbariumu'nda (GUEF) muhafaza edilmektedir. Bilimsel adı tespit edildikten sonra bitki üzerinde yapılan aktivite deneyleri 2021 yılı Nisan-Haziran ayları arasında gerçekleştirilmiştir.

Ekstraksiyon

M. neglecta'nın çiçek ve meyveli toprak üstü kısımları gölgede kurutulduktan sonra bitki değirmeninde (Spice-Herb grinder IC-04A, Endonezya) kabaca toz edilmiştir. Daha sonra ikişer gram alınmış ve ayrı ayrı 50'er mL metanol veya distile su ile ultrasonik banyoda 30 dakika karıştırılarak masere edilmiştir. Hazırlanan ekstratlar süzülükten sonra bakiyeler ikişer kez daha aynı işleme tabi tutulmuştur. Elde edilen metanol ekstratları birleştirilip alçak basınç altında 45°C'yi geçmeyen sıcaklıkta (Heidolph Hei-VAP, Almanya) uçurularak kurutulmuş, sulu ekstratlar ise liyofilize edilmiştir (Lyolab C LSL Secroid, Çin). Hazırlanan ekstratlar kullanılıncaya kadar buzdolabında (4-6°C'de) muhafaza edilmiştir.

Üreez İnhibe Edici Aktivite Tayini

Üreez aktivitesinin belirlenmesinde indofenol yöntemi kullanılmıştır. Mikroplağın kuyucuklarına 25'er µL jack bean üreez enzimi (10 U/mL) ve 5 µL ekstre çözeltisi (2000 µg/mL konsantrasyonda su veya etanol içinde) konulmuş ve 15 dakika 30°C'de inkübe edilmiştir. Daha sonra her bir kuyucuğa 55 µL 100 mM üre tamponu (0.01 M K₂HPO₄, 1 mM EDTA ve 0.01M LiCl) ilave edilip tekrar 30°C'de 15 dakika inkübe edilmiştir. İnkübasyonun ardından her kuyucuğa 45 µL fenol rejanı (%1 a/h fenol ve %0.005 a/h sodyum nitroprusit) ve 70 µL alkali rejanı (%0.5 a/h NaOH ve %0.1 aktif klorit taşıyan NaOCl) ilave edilmiştir. Oda sıcaklığında 50 dakikalık inkübasyon sonrası absorbansdaki değişimler 630 nm'de ölçülmüştür (Molecular Devices,

Spectramax ABS plus, Amerika). Kontrol kuyucuğunda test örneği yerine %80'lik etanol konulmuştur. Referans üreez inhibitörü olarak tiyoüre kullanılmıştır. Deneyle üç tekrar olacak şekilde yapılmıştır²⁶ ve yüzde inhibisyonlar aşağıdaki formül ile hesaplanmıştır:

$$\% \text{ inhibisyon} = (A_{\text{kontrol}} - A_{\text{test}}) / A_{\text{kontrol}} \times 100$$

A_{test} : Test örneğinin absorbansı

A_{kontrol} : Kontrolün absorbansı

Kimotripsin İnhibe Edici Aktivite Tayini

α -Kimotripsin inhibe edici aktivitenin tespiti için Cannell ve diğerleri tarafından geliştirilen yöntem bazı değişiklikler yapılarak kullanılmıştır. Mikroplağın kuyucuklarına 60 μL 50 mM Tris-HCl tamponu, 10 μL ekstre çözeltisi (2000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ konsantrasyonunda su veya etanol içinde) ve 30 μL enzim çözeltisi (36 U/mL) konulup 15 dakika 37°C'de inkübe edilmiştir. Bu işlemin ardından reaksiyon karışımına substrat çözeltisi (1.3 mM 30 μL N-süksinil fenilalanin-p-nitroanilit) ilave edilmiştir. 60 dakika 37°C'de inkübasyondan sonra 410 nm'de absorbanslar ölçülmüştür. Referans kimotripsin inhibitörü olarak fenilmetansülfonil florit (FMSF) kullanılmıştır. Tüm deney üç kez tekrar edilmiştir. Yarımaksimum inhibisyon konsantrasyonları (IC_{50}) GraphPad Prism 6 yazılımı kullanılarak ve yüzde inhibisyon aşağıdaki formül ile hesaplanmıştır:²⁷

$$\% \text{ inhibisyon} = (A_{\text{kontrol}} - A_{\text{test}}) / A_{\text{kontrol}} \times 100$$

A_{test} : Test örneğinin absorbansı

A_{kontrol} : Kontrolün absorbansı

DPPH (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil) radikal süpürücü aktivite tayini

150 μL ekstre çözeltisi (1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ konsantrasyonunda su veya metanol içinde) üzerine 50 μL 1×10^{-3} M DPPH çözeltisi (metanol içinde) eklenip 30 dakika boyunca karanlıkta, oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. İnkübasyonun ardından 517 nm'deki absorbanslar ölçülmüştür. Kontrol için test örneği yerine su veya metanol; standart antioksidan ajan olarak ise gallik asit (metanol içinde) kullanılmıştır. Her deney üç kez tekrarlanmış ve yüzde inhibisyonlar aşağıdaki formülden hareketle hesaplanmıştır.²⁸

$$\text{Yüzde inhibisyon} = [(A_{\text{kontrol}} - A_{\text{test}})] / (A_{\text{kontrol}}) \times 100$$

A_{kontrol} : kontrolün absorbansı

A_{test} : test örneğinin absorbansı

Bakır (II) indirgenme antioksidan kapasitenin (CUPRAC) tayini

Analiz için 27.5 μL ekstre çözeltisi (1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ konsantrasyonunda su veya metanol içinde), 27.5 μL distile su, 50 μL 10^{-2} M CuCl_2 çözeltisi, 50 μL amonyum asetat tamponu (1 M, pH 7.0) ve 50 μL neokuproin çözeltisi (7.5×10^{-3} M, %96'lık etanol içinde) ile karıştırılıp 30 dakika inkübe edilmiştir. İnkübasyonun ardından 450 nm'deki absorbanslar köre karşı okunmuştur. Standart antioksidan gallik asitten de seri dilüsyonlar hazırlanarak aynı işleme tabi tutulmuştur. Gallik asit dilüsyonları ile elde edilen absorbansların konsantrasyona karşı grafiğe geçirilmesi ile hazırlanan kalibrasyon eğrisinden hareketle test örneklerinin antioksidan aktivitesi "mg gallik asit eşdeğeri (G.A.E.)/g ekstre" cinsinden belirlenmiştir. Her deney üç kez tekrarlanmıştır.²⁹

ABTS [2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sülfonik asit)] radikal katyonu renk giderici aktivitenin tayini

0.1 M fosfat tamponu (pH 7.4) içerisinde hazırlanan ABTS çözeltisine (2 mM) potasyum persülfat ilave edilip ABTS radikali üretilmiştir. Hazırlanan ABTS radikal çözeltisi kullanılmadan önce 3:1 oranında fosfat tamponu

ile seyreltilmiştir. 100 µL ekstre çözeltisi (1000 µg/mL konsantrasyonunda su veya metanol içinde) 100 µL ABTS radikali çözeltisi ile karıştırılıp 30 dakika oda sıcaklığında karanlıkta inkübe edilmiştir. Süre sonunda 734 nm'deki absorbanlar belirlenmiştir. Standart antioksidan olarak kullanılan gallik asitten (metanol içinde) hazırlanan seri dilüsyonlar da aynı işleme tabi tutulmuştur. Gallik asit dilüsyonları ile elde edilen absorbanların konsantrasyona karşı grafiğe geçirilmesi ile hazırlanan kalibrasyon eğrisinden hareketle test örneklerinin antioksidan aktivitesi "mg G.A.E./g ekstre" cinsinden belirlenmiştir. Her deney üç kez tekrarlanmıştır.³⁰

Toplam flavonoit miktar tayini

Ekstrelerin toplam flavonoit içerikleri "alüminyum klorür kolorimetrik yöntemi" kullanılarak belirlenmiştir.³¹ Bunun için 20 µL ekstre çözeltisi (1000 µg/mL konsantrasyonunda su veya metanol içinde) 60 µL %75'lik etanol, 10 µL %10'luk alüminyum klorür, 10 µL 0.4 M sodyum asetat çözeltisi ve 100 µL distile su ile karıştırılıp oda sıcaklığında 30 dakika inkübe edilmiştir. İnkübasyonun ardından 415 nm'deki absorbanlar belirlenmiştir. Kalibrasyon eğrisi hazırlamak amacıyla rutinden (metanol içinde) bir seri dilüsyon hazırlanmış ve aynı deney prosedürüne tabi tutulmuştur. Rutin dilüsyonları ile elde edilen absorbanlar konsantrasyona karşı grafiğe geçirilip hazırlanan kalibrasyon eğrisinden hareketle test örneklerinin flavonoit içerikleri "mg rutin eşdeğeri (R.E.)/g ekstre" cinsinden hesaplanmıştır. Her deney üç kez tekrar edilmiştir.

Toplam fenol miktar tayini

Ekstrelerin fenolik içeriklerinin tespiti için "Folin Ciocalteu yöntemi" kullanılmıştır.^{32,33} Mikroplakanın kuyucuklarına 100 µL ekstre çözeltisi (1000 µg/mL konsantrasyonunda su içinde) ve 125 µL Lowry C çözeltisi* konulup oda sıcaklığında 10 dakika inkübe edilmiştir. Bu işlemin ardından reaksiyon karışımına 12.5 µL Folin Ciocalteu reajanı (%96 etanol ile 1/3 oranında seyreltilerek) ilave edilerek oda sıcaklığında 30 dakikalık inkübasyona bırakılmıştır. Reaksiyon sonucunda oluşan mavi rengin 750 nm'deki absorbanı ölçülmüştür. Kalibrasyon eğrisi hazırlamak amacıyla gallik asitten (metanol içinde) bir seri dilüsyon hazırlanmış ve aynı deney prosedürüne tabi tutulmuştur. Gallik asit dilüsyonları ile elde edilen absorbanlar konsantrasyona karşı grafiğe geçirilerek hazırlanan kalibrasyon eğrisinden hareketle test örneklerinin toplam fenol miktarı "mg G.A.E./g ekstre" cinsinden hesaplanmıştır. Her deney üç kez tekrar edilmiştir. Metanollü ekstrede çökelti oluşması nedeniyle sadece sulu ekstrenin fenolik içeriği tespit edilmiştir.

* Lowry C çözeltisinin hazırlanması:

Lowry C çözeltisi = 1 mL Lowry B çözeltisi + 50 mL Lowry A çözeltisi

Lowry B solüsyonu = 25 mg CuSO₄ + 5 mL %1 NaKC₄H₄O₆ çözeltisi

Lowry A çözeltisi = 50 mL 0.1M NaOH çözeltisi + 1 g Na₂CO₃

Bulgular ve tartışma

M. neglecta'dan ayrı ayrı hazırlanan metanol ve su ekstralarının kimotripsin ve ürezaz enzimleri üzerinde yapılan inhibe edici aktivite çalışmalarının sonuçları **Tablo 1**'de verilmiştir. Metanol ekstresi kimotripsini önemli derecede inhibe ederken (IC₅₀: 67.67 ± 1.40 µg/mL) su ekstresinin düşük oranda inhibe edici etkiye sahip olduğu tespit edilmiştir. Ürezaz enzimi üzerindeki etkisi incelendiğinde ise su ve metanol ekstralarının çok yüksek olmayan ama birbirine çok yakın bir inhibisyon gösterdiği belirlenmiştir (sırasıyla %36.52 ve 34.38 inhibisyon). Daha önce belirtildiği üzere kimotripsin enzimi obezite, viral enfeksiyonlar, kanser, inflamatuvar hastalıklar gibi pek çok hastalığın tedavisi için araştırılan hedeflerden bir tanesidir.^{7,9,11-13} Ancak piyasada klinik kullanıma onay alan sadece bir adet kimotripsin inhibitörü bulunmaktadır (Ulinastatin®). Dolayısıyla gıda olarak ve halk arasında çeşitli hastalıkların tedavisinde kullanımı olan *M. neglecta*'da kimotripsin inhibe edici aktivitenin gözlenmiş olması oldukça önemli olup yeni araştırmaların yapılması için bir başlangıç noktası

oluşturmaktadır. Bitki üzerinde yapılacak aktivite yönlendirmeli fraksiyonlama çalışmaları ile etkiden sorumlu bileşik/bileşiklerin izole edilerek saf halde elde edilmesi, yapı-aktivite çalışmaları, toksisite deneyleri gibi daha ileri çalışmalara başlangıç noktası oluşturması; muhtemel yan etkisi olmayan, ucuz ve etkin kimotripsin inhibitörü ilaçların keşfine imkân verme potansiyeli bulunması açısından son derece önemlidir.

Tablo 1. *M. neglecta*'dan hazırlanan ekstrelerin kimotripsin ve ürez inhibe edici aktivitesi

Ekstre/referans maddeler	İnhibisyon (%) ± standart hata	
	Kimotripsin ^a	Ürez ^b
Su ekstresi	3.81 ± 0.80	36.52 ± 0.81
Metanol ekstresi	84.44 ± 1.44 (IC ₅₀ : 67.67 ± 1.40 µg/mL)	34.38 ± 0.76
Tiyüre ^c	-	100.0 (IC ₅₀ : 88.271 ± 3.15 µM)
FMSF ^d	100.0 (IC ₅₀ : 2.62 ± 0.49 µM)	-

^a 153.84 µg/mL konsantrasyondaki % inhibisyon

^b 50 µg/mL konsantrasyondaki % inhibisyon

^c Standart ürez inhibitörü

^d Fenilmetansülfonil florit (standart kimotripsin inhibitörü)

- İnhibitör aktivite çalışılmadı

Antioksidan aktivite deneylerinden elde edilen sonuçların yanı sıra toplam fenol ve flavonoit içeriklerinin tespitine yönelik çalışmaların verileri **Tablo 2'**de sunulmuştur. DPPH ve CUPRAC testlerinde metanol ekstresi; ABTS testinde ise su ekstresi daha yüksek aktivite göstermiştir. DPPH ve CUPRAC testleri ile uyumlu olarak metanol ekstresinin toplam flavonoit içeriğinin daha yüksek olduğu tespit edilmiştir.

Tablo 2. *M. neglecta*'dan hazırlanan ekstrelerin radikal süpürücü ve bakır indirgeyici antioksidan kapasiteleri, toplam fenol ve flavonoit içerikleri

Ekstre/ referans maddeler	DPPH ^a	ABTS ^b	CUPRAC ^b	Toplam fenol içeriği ^b	Toplam Flavonoit içeriği ^c
Su	65.11 ± 0.75	28.21 ± 0.23	17.01 ± 2.18	44.60 ± 1.42	33.82 ± 3.01
Metanol	87.59 ± 1.25	17.57 ± 0.14	29.29 ± 1.33	-	42.93 ± 1.76
Gallik asit	100	-	-	-	-

^a 750.0 µg/mL'deki % inhibisyon ± standart hata

^b mg G.A.E./g ± standart hata

^c mg R.E./g ± standart hata

- Çalışılmadı

Yaptığımız literatür tarama çalışmasında, ülkemizde halk ilacı olarak da oldukça yaygın olarak kullanılan *M. neglecta*'nın kimotripsin ve ürez inhibe edici aktivitelerinin değerlendirildiği herhangi bir araştırmaya rastlanmamıştır. Dolayısıyla bitkinin söz konusu aktivitelerinin ilk kez çalışıldığı anlaşılmaktadır. Bununla birlikte farklı bir tür olan *M. sylvestris* L. bitkisinin ürez inhibe edici aktivitesi üzerinde iki farklı çalışma bulunmaktadır. Bu çalışmalardaki ürez inhibisyonu bizimkilere göre oldukça yüksek konsantrasyonlarda tespit edilmiş (10 mg/mL), ilaveten birinde IC₅₀ değeri de (786.71 µg/mL) hesaplanmıştır.^{34,35} Ürez inhibe edici aktivite yönünden *M. neglecta*'nın bir diğer tür olan *M. sylvestris*'den daha kuvvetli aktiviteye sahip olması, başlıca fitokimyasal içerik farklılıkları ile açıklanabilir.

Bu araştırmanın bir ön çalışma olması nedeniyle henüz kimotripsin ve ürez inhibe edici aktiviteden hangi bileşik/bileşiklerin sorumlu olduğu bilinmemektedir. Ancak daha önce bitki üzerinde yapılan fitokimyasal çalışmalar fenolik bileşikler bakımından zengin olduğunu göstermektedir. Bitkide bulunan fenolik bileşiklerden olan kersetinin³⁶ kimotripsin enzimini 100 µM konsantrasyonda %100 oranında;³⁷ ürez enzimini ise 8.2 µg/mL IC₅₀ değeri ile inhibe ettiği belirtilmiştir.³⁸ Yanı sıra bitkideki bir diğer fenolik bileşik olan kemferolün de kuvvetli ürez inhibitörü olduğu (IC₅₀: 6.96 µM) göz önüne serilmiştir.^{39,40} *M. neglecta*'da

bulunduğu rapor edilen kumarik asit ve kafeik asidin⁴¹ de ürezaz ve kimotripsin inhibe edici aktivitesinin araştırıldığı çalışmada her iki bileşimin de kimotripsini inhibe edici aktivitesinin olmadığı, orta derecede ürezaz inhibe edici aktiviteye sahip oldukları (sırasıyla IC₅₀ değerleri: 265.6 ve 428.2 µM) bildirilmiştir.⁴² Bu verilerden hareketle bitkinin gösterdiği kimotripsin ve ürezaz inhibitörü aktivitelerde kersetin ve kemferol gibi fenolik bileşiklerin sorumlu olabileceği akla gelmektedir

Literatürde *M. neglecta*'nın antioksidan aktivitesine ilaveten toplam fenol ve flavonoit içeriğinin belirlendiği çalışmalar mevcuttur. Bu çalışmalardan ilkinde *M. neglecta* yaprak ve çiçeklerinden ayrı ayrı %80'lik etanol ile hazırlanan ekstraların 250 µL konsantrasyonda DPPH radikali üzerinde %50'nin üzerinde inhibisyon gösterdiği belirtilmiştir. Yine aynı çalışmada çiçek ekstresinin toplam fenol ve flavonoit içeriklerinin sırasıyla 136.1 ve 46.7 µg/mg kateşin eşdeğeri olduğu; yapraklarından hazırlanan ekstrenin toplam fenol ve flavonoit içeriklerinin ise sırasıyla 106.1 ve 22.9 µg/mg kateşin eşdeğeri olduğu belirlenmiştir.⁴³ Daha yakın tarihli bir çalışmada tüm bitkiden hazırlanan etanol ekstresinin toplam fenol ve flavonoit içeriği sırasıyla 68.29 µg pirokateşol eşdeğeri/mg ekstre ve 15.58 µg kersetin eşdeğeri/mg ekstre olarak hesaplanmıştır. Metanol ve su ekstralarının IC₅₀ değerleri DPPH radikali testinde sırasıyla 60.51 ve 95.71 µg/mL tespit edilirken, ABTS radikali testinde 45.81 ve 55.02 µg/mL bulunduğu ve bakır indirgeyici aktivitesinin olmadığı açıklanmıştır.⁴¹ Literatürdeki çalışmalarda çalışılan bitki kısımları, ekstraksiyon çözücülerini, diğer deneysel yöntemlerde ve birimlerde farklılıklar bulunduğu görülebilmektedir. Dolayısıyla bizim çalışmamızla tam olarak kıyaslamak mümkün görünmese de bitkinin kuvvetli antioksidan aktiviteye sahip olmasının tespit edilmesi, zengin fenol ve flavonoit içeriğine sahip olduğunun anlaşılması açısından önemlidir.

Dalar ve ark. (2012), bitkinin tüm kısımları kullanılarak hazırladıkları asitli metanol ekstresinde (%80 metanol, %1 HCl h/h) toplam fenol ve flavonoit içeriğini sırasıyla 6.6 mg G.A.E./g ve 2.95 mg R.E./g olarak tespit etmiştir.⁴⁴ Bu sonuçlar bizim bulduğumuz değerlere göre oldukça düşüktür. Araştırmacıların ekstraksiyonlarında asit kullandığı dikkati çekmekte, kullanılan asidin bitkilerdeki sekonder metabolitler üzerinde başta hidroliz olmak üzere çeşitli değişikliklere sebebiyet verebileceği, buna bağlı olarak da aktivite sonuçlarının değişebileceği bilinmektedir. İki çalışma sonuçları arasındaki farklılığın nedenlerinin başında bu husus akla gelmelidir.

Literatürde bizimkinden farklı bir şekilde kullanılan bitki kısmının yapraklarının olduğu bazı çalışmalara da rastlamak mümkündür. Khan ve ark. (2016), *M. neglecta* yapraklarının metanol ekstresinin 25.6 mg/g G.A.E. toplam fenol içeriğine sahip olduğunu,⁴⁵ Saleem ve ark. (2020) ise bitkinin yapraklarından hazırladıkları %70 metanol ekstresinin DPPH radikali oluşumunu %24 oranında önlediğini belirlemiştir.⁴⁰

Bitkinin toprak üstü kısımlarından hazırlanan *n*-hekzan ve sulu etanol ekstresinin analjezik, antienflamatuvar ve antipiretik etkisinin araştırıldığı in vivo çalışmada uygulanan üç analjezik aktivite tayin yönteminde de ekstraların (*n*-hekzan için p<0.05; sulu etanol ekstresi için p<0.005) kuvvetli aktivite gösterdiği belirtilmektedir.⁴⁶ Aynı çalışmada her iki ekstrenin kuvvetli antipiretik etki gösterdiği (*n*-hekzan için p<0.005; sulu etanol ekstresi için p<0.05), yanı sıra karagenle oluşturulan pençe ödemi üzerinde de önemli düzeyde azalmaya sebep olduğu (*n*-hekzan için p<0.05; sulu etanol ekstresi için p<0.005) belirtilmiştir. Diğer taraftan bitkinin bütün kısımlarından hareketle hazırlanan %70'lik metanol ekstresinin yüksek yağ ve karbonhidrat diyeti uygulanarak obezite oluşturulan diyabetik sıçanlarda, 500 ve 750 mg/kg dozlarda vücut ağırlığını kontrole kıyasla önemli derecede azalttığı belirtilmiştir. Aynı zamanda diyabet ve obezite oluşturulan sıçanlarda artan leptin, serum trigliserit, toplam kolesterol, LDL kolesterol seviyesi de yine *M. neglecta* ekstresi uygulanması ile önemli derecede azalmıştır.⁴⁷ Mekanizmaya yönelik daha ileri çalışmaların yapılması gerekirken birlikte, bitkinin sergilediği antienflamatuvar ve obezite önleyici aktivitede kimotripsin enzimini inhibe edici aktivitesinin katkısının olabileceği akla gelmektedir.

Daha önce *M. neglecta*'nın toprak üstü kısımlarından hazırlanan dekoksasyonun in vivo antiülserojenik etkisi çalışma grubumuz tarafından sıçanlar üzerinde araştırılmış ve etanol ile oluşturulan peptik ülser oluşumunu önemli düzeyde önlediği (%81.9 inhibisyon, $p < 0.001$) tespit edilmiştir.⁴⁸ Şimdiki çalışmada ise bitkinin su ve metanol ekstraktlarının üreez enzimini belirli bir oranda inhibe ettiği anlaşılmıştır. Peptik ülser patogeneğinde diğer pek çok faktörün yanı sıra oksidatif stresin de önemli bir rol oynadığı bilinmektedir. Bu bağlamda bizim sonuçlarımıza ilaveten literatürdeki diğer antioksidan aktivite testleri de bir arada değerlendirildiğinde tespit edilen önemli düzeydeki antioksidan aktivitenin bitkinin gastroprotektif etkisine katkı sağlamış olabileceği düşünülebilir. Bitkilerden hareketle yapılan ilaç araştırmalarında detaylı çalışmalara başlamadan önce hangi bitki veya bitkilerle çalışılacağına tespitine yönelik ön çalışmalara her zaman ihtiyaç duyulmaktadır. Piyasadaki antibiyotiklere karşı direnç geliştirmiş olan *H. pylori*'nin insan midesinde canlı kalabilmesi için gerekli olan üreez enziminin belirli bir düzeyde de olsa inhibe edilmesinin tespiti söz konusu patojen bakterinin yol açtığı enfeksiyonun tedavisi bakımından oldukça önemlidir. Bu kapsamda gerçekleştirdiğimiz çalışma ekstre bazında yapılan bir ön çalışma niteliğinde olup, her ne kadar aktivite çok yüksek olmasa da daha ileri kademelerde fraksiyonlanarak saflaştırıldıkça ekstrede yer alan etkili bileşiğin oranının artırılması mümkün olabilecektir. Etkili bileşik oranının artırılmasına paralel olarak aktivitenin de artması bitkisel ekstraktlarda yaygın rastlanılan bir durumdur. Bu nedenle yine aktivite ile yönlendirilen saflaştırma teknikleri ile etkili bileşiklerin tespitine yönelik daha detaylı araştırmaların yapılması gerekmekte, bu çalışma ise söz konusu detaylı araştırmaların yapılabilmesine imkan sunan bir başlangıç noktasını oluşturmaktadır.

Sonuç olarak bir ön çalışma niteliğindeki bu araştırmanın, kuvvetli kimotripsin ve orta düzeyde üreez inhibe edici aktivitenin yanı sıra literatür desteği de dikkate alındığında inflamatuvar hastalıklar, obezite, *H. pylori* enfeksiyonu ve peptik ülserin tedavisi için umut vaat eden ilaç aday bileşiklerin tespitine imkan verebileceği düşünülmektedir. Bunun için aktivite ile yönlendirilen fraksiyonlama yöntemleri, yapı-aktivite ve mekanistik araştırmalar, toksisite deneyleri gibi daha ileri düzeyde çalışmalara ihtiyaç vardır.

Bilgi

Çalışmada çıkar çatışması bulunmamaktadır.

Araştırmacı Katkı Oranı Beyanı

Tuğba GÜNBATAN: Fikir, tasarım, veri toplama ve işleme, analiz ve yorum, kaynak taraması, makale yazımı

Ece SALİHOĞLU: Fikir, , tasarım, veri toplama ve işleme, analiz ve yorum, makale yazımı

Sevgi AKAYDIN: Fikir, danışmanlık/denetleme, analiz ve yorum, eleştirel inceleme

Galip AKAYDIN: Veri toplama ve işleme, analiz ve yorum, eleştirel inceleme

İlhan GÜRBÜZ: Fikir, analiz ve yorum, danışmanlık/denetleme, makale yazımı, eleştirel inceleme

Kaynaklar

1. Amtul Z, ve ark. Cysteine based novel noncompetitive inhibitors of urease(s)-Distinctive inhibition susceptibility of microbial and plant ureases. *Bioorg Med Chem* 2006;14:6737-44.
2. Yılmaz Ö, Okçu N. Helicobacter pylori ve gastrointestinal sistemle ilişkili hastalıklar. *Atatürk Üniv Tıp Der* 2006;38:13-7.
3. Korona-Glowniak I, ve ark. The in vitro activity of essential oils against Helicobacter pylori growth and urease activity. *Molecules* 2020;25(3).
4. Upadhyay LSB. Urease inhibitors: a review. *Indian J Biotech* 2012;11:381-8.
5. Matczuk D, Siczek A. Effectiveness of the use of urease inhibitors in agriculture: a review. *Int Agrophysics* 2021;35:197-208.
6. Modolo LV, ve ark. An overview on the potential of natural products as ureases inhibitors: A review. *J Adv Res* 2015;6:35-44.
7. Shi X-Z, Zhao X-F, Wang J-X. Molecular cloning and expression analysis of chymotrypsin-like serine protease from the Chinese shrimp, *Fenneropenaeus chinensis*. *Fish Shellfish Immunol* 2008;25:589-97.
8. Legerská B, Chmelová D, Ondrejovič M. TLC-Bioautography as a fast and cheap screening method for the detection of α -chymotrypsin inhibitors in crude plant extracts. *J Biotech* 2020;313:11-7.
9. Awosika T, Aluko RE. Enzymatic pea protein hydrolysates are active trypsin and chymotrypsin inhibitors. *Foods* 2019;8(6):200.

10. Blanco A, Blanco G. Amino Acid Metabolism. In: Blanco A, Blanco G, Editors. Medical Biochemistry. USA: Academic Press; 2017. pp: 367-99.
11. Gitlin-Domagalska A, Maciejewska A, Debowski D. Bowman-Birk inhibitors: Insights into family of multifunctional proteins and peptides with potential therapeutical applications. *Pharmaceuticals* 2020;13:421.
12. Cid-Gallegos MS, ve ark. Protease inhibitors from plants as therapeutic agents- A Review. *Plant Foods Human Nutr* 2022;77:20-9.
13. Kårlund A, ve ark. Intestinal exposure to food-derived protease inhibitors: digestion physiology- and gut health-related effects. *Healthcare* 2021;9:1002.
14. Chen Z, ve ark. Sulforaphane is a reversible covalent inhibitor of 3-chymotrypsin-like protease of SARS-CoV-2. *J Med Virol* 2023;95:e28609.
15. Tijjani H, ve ark. Pharmacoinformatic study of inhibitory potentials of selected flavonoids against papain-like protease and 3-chymotrypsin-like protease of SARS-CoV-2. *Clin Phytosci* 2022;8: <https://doi.org/10.1186/s40816-022-00347-y>
16. Gulcin İ. Antioxidants and antioxidant methods: an updated overview. *Arch Toxicol* 2020;94:651-715.
17. Sezik E. Türkiye'de Halk İlaçları Araştırmaları ve Önemi. 9. Bitkisel İlaç Hammaddeleri Toplantısı Bildiri kitabı; 1991; Mayıs 19-16; Eskişehir: Anadolu Üniversitesi Yayınları;1991.
18. Gertsch J. How scientific is the science in ethnopharmacology? Historical Perspectives and epistemological problems. *J Ethnopharmacol* 2009;122:177-83.
19. Agthael MAV, Eggelte T, Boxtel CJV. Artemisinin drugs in the treatment of malaria: From medicinal herb to registered medication. *Trends Pharm Sci* 1999; 20:199-205.
20. Heinrich M, Teoh HL. Galatamine from snowdrop-the development of a modern drug against Alzheimer's disease from local caucasian knowledge. *J Ethnopharmacol* 2004;92(2-3):147-62.
21. Akgül A, ve ark. An ethnobotanical study in Midyat (Turkey), a city on the silk road where cultures meet. *J Ethnobiol Ethnomed* 2018;14(12).
22. Altundağ E, M MÖ. Ethnomedicinal studies on the plant resources of east Anatolia, Turkey. *Procedia Soc Behav Sci* 2011;19:756-77.
23. Badem M, ve ark. Biological screening of traditional medicinal plants from villages of Akkus (Ordu) in Turkey on the effects of tyrosinase. *J Pharm Res Int* 2018;25(6):1-10.
24. Gürbüz İ, ve ark. Folk medicine in Düzce province (Turkey). *Turk J Bot* 2019;43(6):769-84.
25. Bulut G, Tuzlacı E. An ethnobotanical study of medicinal plants in Turgutlu (Manisa-Turkey). *J Ethnopharmacol* 2013;149:633-47.
26. Khan KM, ve ark. Synthesis and urease enzyme inhibitory effects of some dicoumarols. *J Enzyme Inh Med Chem* 2004;19(4):367-71.
27. Cannell RJ, ve ark. Results of a large scale screen of microalgae for the production of protease inhibitors. *Planta Med* 1988;54(01):10-4.
28. Matthaus B. Antioxidant activity of extracts obtained from residues of different oilseeds. *J Agricult Food Chem* 2002;50:3444-52.
29. Apak R, ve ark. A novel total antioxidant capacity index for dietary polyphenols, vitamin C and E, using their cupric ion reducing capability in the presence of neocuproine: CUPRAC method. *J Agricult Food Chem* 2004;52:7970-81.
30. Gülçin İ. Comparison of in vitro antioxidant and antiradical activities of L-tyrosine and L-Dopa. *Amino Acids* 2007;32(3):431-8.
31. Woisky RG, Salatino A. Analysis of propolis: some parameters and procedures for chemical quality control. *J Apicultl Res* 1998;37:99-105.
32. Singleton VL, Rossi JA. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American J Enol Viticult* 1965;16:144-58.
33. Singleton VL, Orthofer R, Lamuela-Raventos RM. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu Reagent. *Method Enzymol* 1999;299:152-78.
34. Nabati F, ve ark. Large scale screening of commonly used Iranian traditional medicinal plants against urease activity. *J Pharm Sci* 2012;20(72).
35. Biglar M, ve ark. Screening of 20 commonly used Iranian traditional medicinal plants against urease. *Iran J Pharm Res* 2014;13(Suppl):195-8.
36. Akkol EK, ve ark. The phytochemical profile and biological activity of *Malva neglecta* Wallr. in surgically induced endometriosis model in rats. *Molecules* 2022;27:7869.
37. Son NT, ve ark. Serine protease inhibitors and activators from *Dalbergia tonkinensis* species. *J Nat Med* 2020;74:257-63.
38. Nile SH, ve ark. Utilization of quercetin and quercetin glycosides from onion (*Allium cepa* L.) solid waste as an antioxidant, urease and xanthine oxidase inhibitors. *Food Chem* 2017;235:119-26.
39. Zolghadr L, ve ark. Molecular dynamics simulations, molecular docking, and kinetics study of kaempferol interaction on Jack bean urease: Comparison of extended solvation model. *Food Sci Nutr* 2022;10:3585-97.
40. Saleem U, ve ark. Phytochemical analysis and wound healing studies on ethnomedicinally important plant *Malva neglecta* Wallr. *J Ethnopharmacol* 2020;249:112401.

41. Hasimi N, ve ark. Chemical profile of *Malva neglecta* and *Malvella sherardiana* by LC-MS/MS, GC/MS and their anticholinesterase, antimicrobial and antioxidant properties with aflatoxin-contents. *Marmara Pharm J* 2017;21:471-84.
42. Ramsay KST, ve ark. Chemical constituents of *Stereospermum acuminatissimum* and their urease and α -chymotrypsin inhibitions. *Fitoterapia* 2012;83:204-8.
43. Güder A, Korkmaz H. Evaluation of in-vitro Antioxidant properties of hydroalcoholic solution extracts *Urtica dioica* L., *Malva neglecta* Wallr. and their mixture. *Iranian J Pharm Res* 2012;11(3):913-23.
44. Dalar A, Türker M, Konczak I. Antioxidant capacity and phenolic constituents of *Malva neglecta* Wallr. and *Plantago lanceolata* L. from Eastern Anatolia Region of Turkey. *J Herb Med* 2012;2:42-51.
45. Khan H, ve ark. Nutritional composition, antioxidant and antimicrobial activities of selected wild edible plants. *J Food Biochem* 2016;40:61-70.
46. Hamayun R, Iqbal MS, Qadir MI. Assessment of analgesic, anti-inflammatory and anti-pyretic activities of *Malva neglecta* Wallr. in animal model. *Bangladesh J Bot* 2021;50(3):577-83.
47. Akhtar MF, ve ark. Ameliorating effect of *Malva neglecta* Wallr on obesity and diabetes in Wistar rats: A mechanistic study. *BioMed Res Int* 2022;2022:2614599.
48. Gürbüz I, ve ark. Anti-ulcerogenic activity of some plants used in folk medicine of Pinarbasi (Kayseri, Turkey). *J Ethnopharmacol* 2005;101(1-3):313-8.