

Araştırma Makalesi

Mersin Univ Sağlık Bilim Derg 2021;14(2):176-185

doi: 10.26559/mersinsbd.796643

***Alchemilla mollis* (Buser) Rothm bitkisi köklerinden elde edilen ekstrelerin antioksidan ve sitotoksik etkileri**

 Selen İlgün¹,  Gökçe Şeker Karatoprak²

¹ Erciyes Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Botanik AD

² Erciyes Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmakognozi AD

Öz

Amaç: *Alchemilla* L. cinsine ait türlerin genellikle toprak üstü kısımlarının halk arasında diüretik, astrenjan, antispazmodik, yara iyileştirici, aşırı menstürasyonda kür olarak ve konvulsif hastalıkların tedavisinde kullanılmakta olduğu bilinmektedir. Sahip oldukları zengin polifenol içeriği sebebiyle de antioksidan, antimikrobiyal ve antiinflamatuvar etkiler gösterdiği belirlenmiştir. Bu çalışmada ise cinse ait türlerden *A. mollis* bitkisinin köklerinden hazırlanan ekstrelerin antioksidan ve sitotoksik etkilerinin belirlenmesi için çeşitli aktivite testleri yapılarak, etkinliğinin tespit edilmesi amaçlanmıştır. **Yöntem:** Bu çalışmada *A. mollis* türünün köklerinden hazırlanan metanol ekstresi ve bu ekstrenin partiyonu ile elde edilen farklı polariteye sahip alt ekstrelerin toplam fenol ve flavonoit miktar tayini ve antioksidan kapasitelerini belirlemek için DPPH ve ABTS radikalini süpürücü etkileri tespit edilmiştir. Ayrıca ekstrelerin L929 ve MDA-MB-231 hücre hatlarında sitotoksik etkileri değerlendirilmiştir. **Bulgular:** Yüksek fenolik içeriğine bağlı olarak, bitkinin kök ekstrelerinde yüksek antioksidan kapasite tespit edilmiştir. Bitkinin köklerinden elde edilen ekstrelerin L929 sağlıklı fare fibroblast hücrelerinde ve MDA-MB-231 meme kanseri hücre hattında elde edilen sonuçlara göre; ekstreler belli bir konsantrasyon aralığında sağlıklı hücrelere toksik etki göstermezken meme kanseri hücreleri üzerinde belirli dozlarda toksik etkili bulunmuştur. **Sonuç:** Sonuç olarak *A. mollis* bitkisi zengin fenolik bileşik içeriği ile kanserli hücrelerin poliferasyonunu inhibe ederek kanser tedavisinde umut verici terapötik ajanların keşfedilmesinde önemli bir kaynak olabileceği tarafımızca yapılan çalışmalarla tespit edilmiştir

Anahtar Kelimeler: *Alchemilla*, Rosaceae, sitotoksisite, antioksidan kapasite

Yazının geliş tarihi:19.09.2020

Yazının kabul tarihi:15.02.2021

Sorumlu yazar: Selen İlgün, Erciyes Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Botanik ABD Melikgazi/Kayseri 38280,

Tel: 0352 2076666/28350, e-posta: erturkselen@gmail.com

Cytotoxic and antioxidant effects of root extracts of *Alchemilla mollis* (Buser) Rothm

Abstract

Aim: It is known that the herba of the species belonging to the genus of *Alchemilla* L. is used as a diuretic, astringent, antispasmodic, curative, cure in invalid menstruation and for convulsive purposes. It has been determined that they have antioxidant, antimicrobial and anti-inflammatory effects due to their rich polyphenol content. This study, it was aimed to determine the effectiveness of the extracts prepared from the roots of the *A. mollis*, one of the species belonging to the genus, by performing various activity tests to determine the antioxidant and cytotoxic effects. **Method:** In this study, determination of total phenol and flavonoid amount of methanol extract prepared from roots of *A. mollis* species and sub-extracts with different polarity obtained by fractionation of this extract and, determination of radical scavenging effects of DPPH and ABTS to obtain their antioxidant capacity was evaluated. Cytotoxic effects of these extracts in L929 and MDA-MB-231 cell lines were also evaluated. **Result:** High phenolic content and accordingly high antioxidant capacity were determined in the root extracts of the plant. According to the results obtained from the extracts obtained from plant roots in L929 healthy mouse fibroblast cells and MDA-MB-231 breast cancer cell line; The extracts were found to be non-toxic to healthy cells within a certain concentration range, but toxic to breast cancer cells at certain doses. **Conclusion:** As a result, it has been determined with our studies that the *A. mollis* plant can be an important source in the discovery of promising therapeutic agents in cancer treatment by inhibiting the proliferation of cancerous cells with its rich phenolic compound content.

Keywords: *Alchemilla*, Rosaceae, cytotoxicity, antioxidant capacity

Giriş

Serbest radikaller, vücuttaki birtakım biyokimyasal reaksiyonlar ve eksternal faktörler sonucu açığa çıkan ve hücrel biyopolimerlere (lipit, protein ve DNA) zarar vererek hasara uğramasına neden olan atom veya moleküllerdir. Bu atom veya moleküllerin aşırı üretimi ile, DNA hasarı, hücrel proteinlerin karbonilasyonu veya lipit peroksidasyonu gibi reaksiyonlar oluşarak, başta kanser olmak üzere birçok kronik ve dejeneratif hastalık ortaya çıkmaktadır. Antioksidanlar ise, serbest radikal süpürücü etkileriyle oksidasyonu azaltan ya da yavaşlatan moleküller olarak, serbest radikallerin sebep olabileceği hastalıklara karşı vücudu korumaktadırlar.^{1,2}

Amerikan Kanser Birliği'ne göre, kanser; hücrelerin kontrolsüz olarak çoğalmasıyla meydana gelen, klinik bulgu ve görünümleri, tedavisi farklı olan hastalıklardır.³ Son zamanlarda görülme sıklığının oldukça artması, vakaların ölümler

sonuçlanması, tedavi ve tanıda karşılaşılan güçlükler sebebiyle de en önemli sağlık sorunları arasında değerlendirilmektedir. Bu sebeple yapılan çalışmalar yoğunlukla kanser tedavisinde kullanılabilecek nitelikte olan ilaç etken maddeleri üzerinde yoğunlaşmıştır.^{4,5}

Tıbbi bitkiler; tedavi amaçlı kullanımı ön planda olan ilaç formülasyonlarına etken madde sağlamak için sınırsız imkanlar sunan, önemli ana kaynaklar olarak kabul edilmektedir ve klinik modern ilaç etken maddelerin yaklaşık %50'si bitkisel kökenlidir.⁴ Özellikle son yıllarda kanser hastalıklarında tedavi amaçlı kullanılan bitkiler, sahip oldukları sekonder metabolitler sebebiyle oldukça detaylı bir şekilde çalışılmaya başlanmıştır.

Alchemilla L. cinsi, otsu ve odunsu bitkilerin bulunduğu dikotiledonların büyük ve önemli bir familyası olan Rosaceae familyasına dahildir.⁶ Başlıca holoartrik bölgede yayılış göstermektedir ve Dünya'da 1000'den fazla tür ile temsil edilmektedir.

Türkiye Florası'nda 50 tür ile kayıtlı olan cinsin tür sayısı son yıllarda sürdürülen geniş kapsamlı çalışmalar ile 78'e ulaşmıştır. Bunların birçoğu özellikle Türkiye'nin Kuzeydoğu Anadolu bölgesinde yayılış göstermektedir.⁷

Alchemilla türleri ülkemizde ve Dünya'da halk arasında tıbbi amaçla kullanımı olan ve Anadolu'da da yetişen bitki türlerindedir. Özellikle "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.⁸ Yine Avrupa'nın birçok bölgesinde sıklıkla yetişen *A. vulgaris* L. bitkisi toprak üstü kısımlarının halk arasında; diüretik, astrenjan, antispazmodik, yara iyiedici, konvulsif hastalıklarda ve aşırı menstürasyonda kullanımı olduğu kaydedilmiştir.⁹

Alchemilla L. türleri üzerine yapılan aktivite çalışmaları özellikle Avrupa'da yaygın olarak yetişen ve "Lady's Mantle" adıyla bilinen *A. vulgaris* üzerine yoğunlaşmıştır. Bitki Avrupa Farmakopesi'nde kayıtlı olup, sahip olduğu farmakolojik özelliklerinin başlıca içerdiği polifenollerden kaynaklandığı belirtilmiştir. Bitki, tanenler (elajik ve gallik tanen) ve flavonoidler (kersetin, luteolin ve proantosiyanidinler) bakımından zengindir.¹⁰ Özellikle astrenjan ve antiinflamatuvar özellikleri iyi bilinen *A. xanthochlora* Rothm. türünün polifenol içeriği ayrıntılı bir şekilde araştırılmış ve bitkinin yüksek oranda kondense tanenleri içerdiği saptanmıştır.¹¹

Bu çalışma kapsamında *A. mollis* bitkisinin türünün köklerinden hazırlanan metanol ekstresi ve bu ekstrenin partiyonu ile elde edilen farklı polariteye sahip alt ekstraların toplam fenol ve flavonoid içerikleri, antioksidan aktiviteleri ve farklı hücre hatları kullanılarak sitotoksik etkilerinin değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem

Çalışma materyali olarak kullanılan *A. mollis* (Buser) Rothm. Kayseri: Kiranardı Bölgesi'nden çiçeklenme döneminde

toplanmıştır. Prof. Dr Cem Vural tarafından teşhis edilen bitkinin örnekleri Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Herbariyumu'nda saklanmaktadır (AEF 26256).

Toplanan bitkilerin kök kısımları, topraküstü kısımlarından ayrıldıktan sonra uygun şartlarda kurutulmuştur. Kurutulan örnekler, kabaca toz edildikten sonra, metanol ile üç gün süreyle oda sıcaklığında, çalkalayıcı su banyosu kullanılarak ekstre edilmiştir. Ekstreler süzülüp, elde edilen süzüntüler birleştirilerek, vakum altında rotavaporda (<40°C) yoğunlaştırılıp, liyofilize edilmiştir. Elde edilen metanol ekstresinden deneylerde kullanılmak üzere bir miktar ayrıldıktan sonra, sırasıyla kloroform, etilasetat ve bütanol ile muamele edilerek sıvı-sıvı ekstraksiyona tabi tutulmuş; alt ekstralara ayrılmıştır. Elde edilen tüm alt ekstralar vakum altında rotavaporda (<40°C) yoğunlaştırılıp, liyofilize edilmiştir. Liyofilize edilen tüm örnekler deney sırasında kullanılmak üzere -20°C'de saklanmıştır.

Toplam Fenol ve Toplam Flavonoid Miktar Tayini

Ekstrelerin toplam fenol miktarı, Folin-Ciocalteu yöntemi kullanılarak gallik asite eşdeğer olarak hesaplanmıştır.¹²

Ekstrelerin içerdikleri toplam flavonoid miktarları ise alüminyum klorit kalorimetri deneyi ile kateşine eşdeğer olarak (CA) hesaplanmıştır.¹³

Bütün deneyler üç paralel olacak şekilde yapılmış, ortalama değerler alınmıştır.

1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH•) radikalini süpürücü etki tayini

Ekstrelerin DPPH• radikalini süpürücü etkileri tayin edilmiştir.¹⁴ Tris-HCl tamponu (50 nM, p.H 7.4) ve 1mL 0.1 mM metanolde hazırlanmış 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil çözeltisi (DPPH•) ile karıştırılmıştır. Kontrol olarak pozitif kontrol (BHA) kullanılmıştır. Oda sıcaklığında ve karanlıkta 30 dakika inkübe edildikten sonra absorbanslar 517 nm' de

okunmuştur. İnhibisyon yüzdesi hesaplanmış; IC50 değerleri nonlinear regregasyon eğrileri kullanılarak (Sigma Plot 2001 versiyon 7.0, SPSS Inc., Chicago IL) değerlendirilmiştir.

2,2'-azino-bis (3- etilbenzotiazolin-6-sülfonik asit) (ABTS••) radikalini süpürücü etki tayini

Ekstrelerin ABTS•• radikalini süpürücü etkilerine bakılmıştır.¹⁵ ABTS•• radikali (7 mM) ABTS' in sulu çözeltisi ile K₂S₂O₈ (2.45 mM, son konsantrasyon)'un karanlıkta 12-16 saat bekletilmesiyle meydana getirilmiş ve absorbanı oda sıcaklığında 734 nm' de 0.700 (±0.030) olacak şekilde ayarlanmıştır. Bu şekilde hazırlanan radikal çözeltisi (990 µL) ile ekstre çözeltileri (10 µL) karıştırılıp ve 734 nm'de 1 dakikalık aralıklarla 15 dakika süresince reaksiyon kinetiği ölçülmüştür. Konsantrasyona karşı ölçülen inhibisyon yüzdeleri Troloks' a eşdeğer olarak (TEAC) hesaplanmıştır.

Hücre kültürü çalışmaları

Bu çalışmada sağlıklı fare fibroblast hücresi L929 (ATCC® CRL-6364™) ve meme kanseri hücresi MDA-MB-231 (ATCC® HTB-26™) kullanılmıştır. Çalışmalar süresince bu hücreler +37°C' de CO₂ 'li inkübatörde delikli kapaklı hücre kültür kapları içinde tutulmuş, L929 için EMEM, MDA-MB-231 için DMEM besiyerleri kullanılmış ve bu besiyerleri iki gün ara ile değiştirilmiştir. Çoğalan hücrelerin bir kısmı -80°C' de muhafaza edilmiştir.

Sitotoksik etkinin Tetrazolyum Tuzu (MTT) Kolorimetrik Gelişme İnhibisyonu Testi ile belirlenmesi

Alchemilla kök ekstresinin hücre canlılığı üzerine etkisi sarı renkli 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromid (MTT) tuzunun mitokondriyal enzimler tarafından mor formazon kristallerine indirgenmesi prensibine dayanan MTT testi ile araştırılmıştır.

7.5×10³ hücre/kuyu yoğunluğunda hücre alınıp steril 96 kuyucuklu mikro plaka

içine yerleştirilmiştir. Farklı konsantrasyonlarda hazırlanan bitki ekstreleri hücreler üzerine uygulanarak 48 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyonun ardından kuyucuklardan üst kısımdaki ekstreler uzaklaştırılmıştır ve her bir kuyucuğa 5mg/mL olacak şekilde, PBS ile hazırlanmış MTT çözeltisi, kuyucuklara (100 µL) eklenmiştir. 37°C, CO₂'li etüvde 2 saat inkübasyona devam edilmiştir. İnkübasyonun ardından yeniden hücrelerin üst kısımları uzaklaştırılmıştır ve 100 µL DMSO eklenerek 5-10 dk sonra 570 nm'de mikropilaka okuyucu ELISA (Biotek Synergy HT) ile spektroskopik ölçüm yapılmıştır. Kontrol grubu hücrelerine çözücü olarak kullanılan dimetilsülfoksit (DMSO) uygulanmıştır.

Bulgular

Toplam Fenol ve Toplam Flavonoit Miktar Tayini

Ekstrelerin toplam fenol ve toplam flavonoit miktarı spektrofotometrik yöntemlerle tayin edilmiştir. Toplam fenol miktarı gallik asite, toplam flavonoit miktarı ise kateşine eşdeğer olarak hesaplanmıştır. Elde edilen sonuçlar Tablo 1'de verilmiştir. Elde edilen verilere göre etil asetat (Alc EtOAc) alt ekstresinin diğer ekstrele göre, yüksek oranda fenolik bileşik içeriğine sahip olduğu gözlenmiştir. Aynı şekilde yine toplam flavonoit oranı en yüksek olan ekstre Alc EtOAc alt ekstresidir.

1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH•) Radikalini Süpürücü Etki Tayini

Ekstrelerin DPPH radikalini süpürücü etkileri fizyolojik pH'da konsantrasyona bağlı olarak ölçülüp değerlendirilmiştir. Ekstrelerin EC50 değerleri nonlinear regresyon eğrileri kullanılarak hesaplanmış ve elde edilen değerler Şekil 1'de verilmiştir. Metanol (Alc MeOH) ve Alc EtOAc ekstresinin EC50 değerleri yakın bulunmuş (sırasıyla 0.0103±0,00 mg/mL ve 0.0107±0.00 mg/mL) ve diğer ekstrele göre daha aktif oldukları belirlenmiştir ancak hiçbir ekstrenin pozitif kontrol olan butil hidroksianisol (BHA) kadar düşük EC50 değerine sahip olmadığı da belirlenmiştir.

Tablo 1. *A. mollis* kök ekstralarının toplam fenol ve flavonoit miktarı

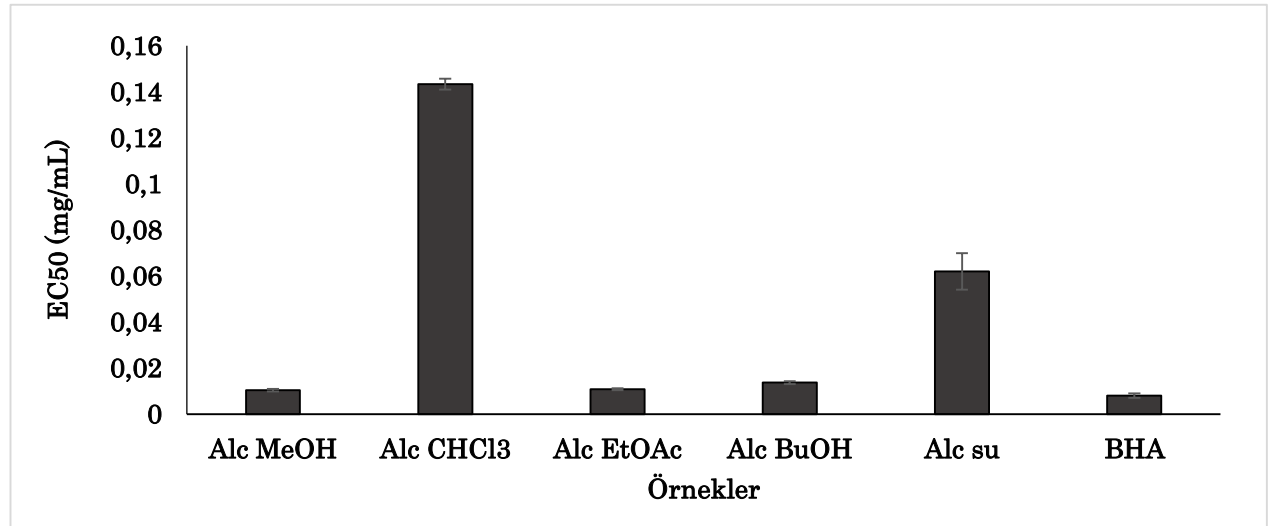
Ekstreler	Toplam Fenol	Toplam Flavonoit
	[mg _{GAE} /g _{ekstre}]	[mg _{CA} /g _{ekstre}]
Alc MeOH	433.48±3.74	95.15±4.96
Alc CHCl ₃	175.86±4.62	61.84±7.71
Alc EtOAc	873.41±11.25	228.94±5.20
Alc BuOH	490.55±6.34	121.26±4.25
Alc su	299.27±4.64	76.87±4.25

*(Alc MEOH: *A. mollis* kök metanol ekstresi, Alc CHCl₃: *A. mollis* kök diklorometan alt ekstresi, Alc EtOAc: *A. mollis* kök etilasetat alt ekstresi, Alc BuOH: *A. mollis* kök bütanol alt ekstresi, Alc su: *A. mollis* kök su alt ekstresi BHA: Bütillenmiş Hidroksianisol)

2,2'-azino-bis (3- etilbenzotiazolin-6-sülfonik asit) (ABTS⁺) radikalini süpürücü etki tayini

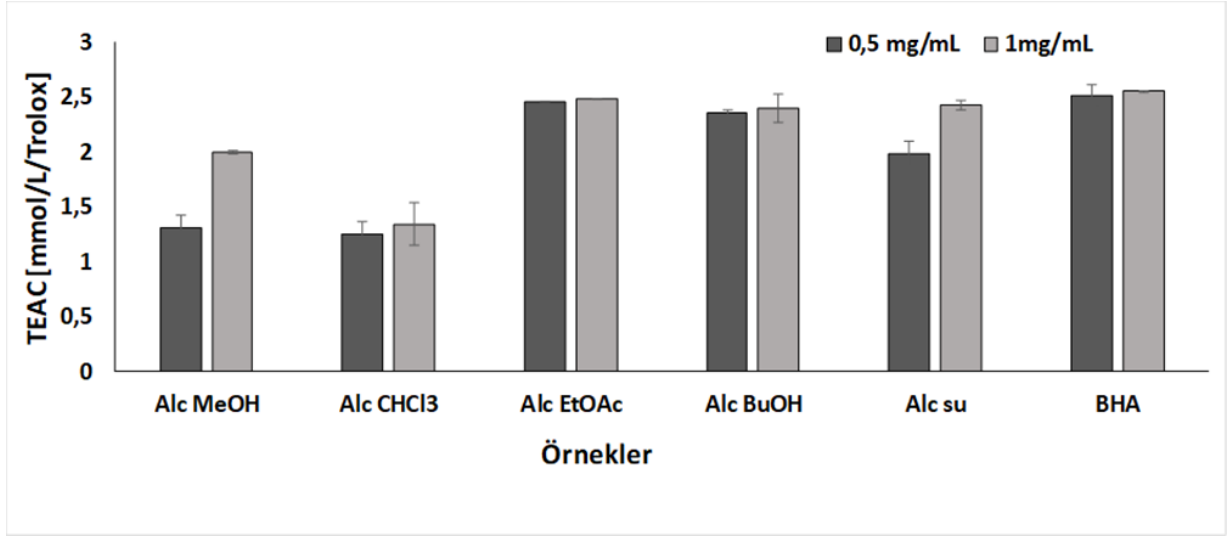
Ekstrelerin antioksidan aktivitesini belirlemek için kullanılan bir diğer yöntem ABTS radikalini süpürücü etki tayin deneyidir. Bu deney ile ekstraların aktiviteleri değerlendirilmiş ve 0.5 and 1 mg/mL konsantrasyonlarda, BHA pozitif kontrolü ile, etkinlikleri kıyaslanmıştır (Şekil

2). Yüksek aktivite gösteren ekstralardan Alc EtOAc ve butanol (Alc BuOH) alt ekstralarının radikal süpürücü kapasitelerinin 0.5 ve 1 mg/mL konsantrasyonda BHA'ya yakın olduğu bulunmuştur (1mg/mL'de BHA; 2.51±0.0 mmol/L Trolox, EtOAc ekstresi; 2.45±0.1 mmol/L Trolox, BuOH ekstresi; 2.35±0.02 mmol/L Trolox).



Şekil 1. Ekstrelerin DPPH radikalini süpürücü etkileri

(Alc MEOH : *A. mollis* kök metanol ekstresi, Alc CHCl₃: *A. mollis* kök diklorometan alt ekstresi, Alc EtOAc: *A. mollis* kök etilasetat alt ekstresi, Alc BuOH: *A. mollis* kök bütanol alt ekstresi, Alc su: *A. mollis* kök su alt ekstresi BHA: Butil Hidroksianisol)



Şekil 2. Ekstrelerin ABTS radikalini süpürücü etkileri

(Alc MEOH: *A. mollis* kök metanol ekstresi, Alc CHCl₃: *A. mollis* kök diklorometan alt ekstresi, Alc EtOAc: *A. mollis* kök etilasetat alt ekstresi, Alc BuOH: *A. mollis* kök bütanol alt ekstresi, Alc su: *A. mollis* kök su alt ekstresi BHA: Butil Hidroksianisol)

Hücre kültürü Çalışmaları ve Sitotoksik etkinin Tetrazolyum Tuzu (MTT) Testi ile Belirlenmesi

A. mollis köklerinden elde edilen ekstrelerin sitotoksik etkilerini belirlemek amacıyla L929 ve MDA-MB 231 hücreleri kullanılarak MTT boyama yöntemi ile % canlılıkları tespit edilmiştir. Elde edilen sonuçlar Şekil 3 ve 4'te verilmiştir.

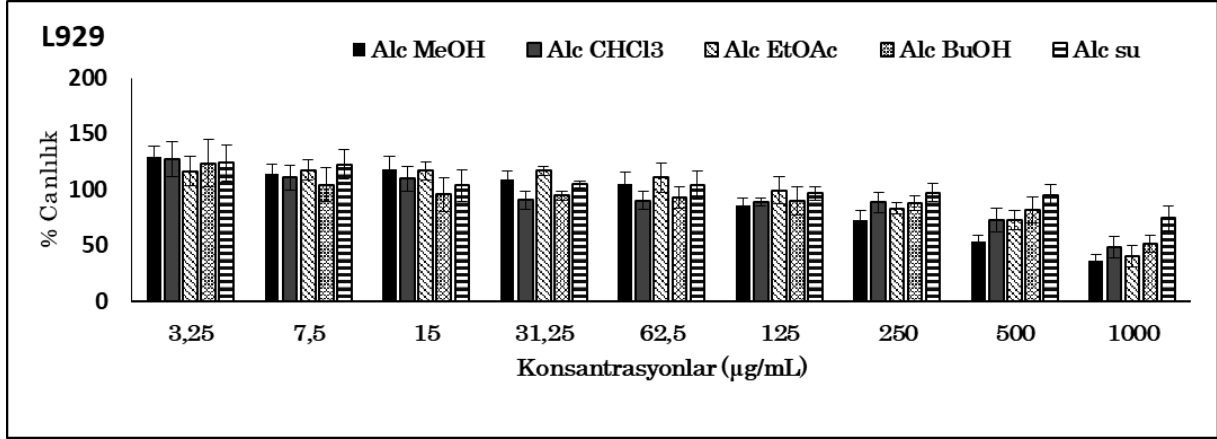
Metanol ekstresi ve alt ekstreler, 1000; 500; 250; 125; 62.5; 31.25; 15; 7.5 ve 3.25 µg/mL konsantrasyonlarda L929 ve MDA-MB-231 hücreleri üzerinde toksisiteleri açısından değerlendirilmiştir. L929 hücre hattında tüm ekstrelerin 500-3.25 µg/mL konsantrasyon aralığında canlılığı arttırdığı görülmüştür. Ancak 1000 µg/mL'da su ekstresi (Alc su) ve Alc BuOH alt ekstreleri hariç Alc MeOH %36.79±5.1, diklorometan (Alc CHCl₃) %48.90±9.54 ve Alc EtOAc % 40.13±9.41 ekstrelerinin hücrelerde canlılığı % 50'nin altına düşürdüğü tespit edilmiştir.

MDA-MB-231 meme kanseri hücre hattında ekstrelerin sitotoksik etkilerini değerlendirdiğimizde ise 62.5 ve 3.25 µg/mL konsantrasyon aralığında ekstrelerin toksik etkisi gözlenmemiştir. Ancak Alc EtOAc alt

ekstresi 250 µg/mL konsantrasyonda diğer ekstrelere oranla daha fazla toksik etki göstermiştir (%13.5±1.31). 1000 ve 500 µg/mL konsantrasyonda ise tüm ekstrelerin önemli ölçüde toksik olduğu belirlenmiştir. Sonuçlara göre ekstreler sağlıklı fibroblast hücrelerinde aynı konsantrasyonda toksik etkili değil iken, meme kanseri hücre hattında toksik etki göstermişlerdir.

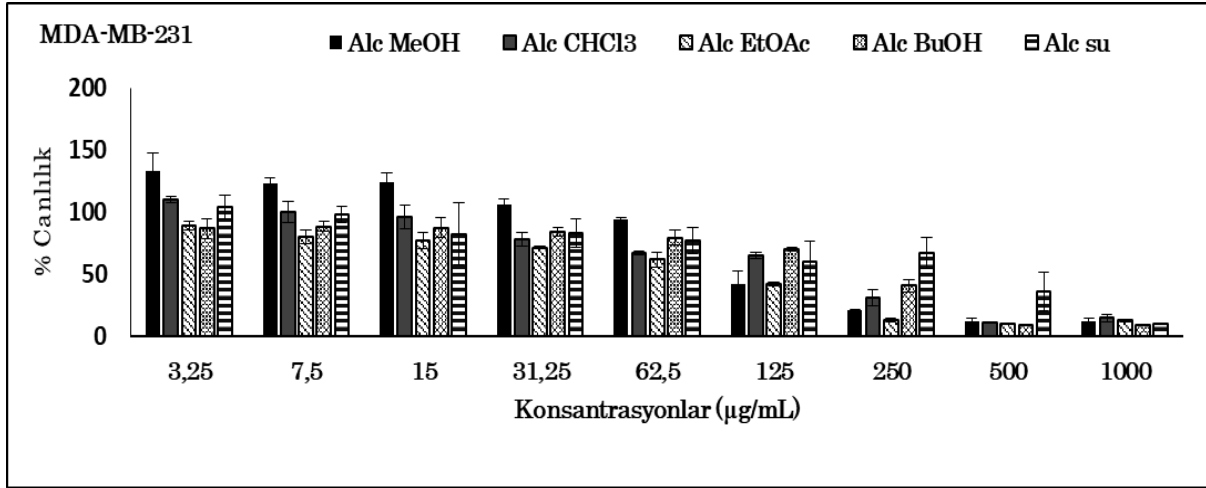
Tartışma

A. mollis bitkisinin köklerinden farklı polariteye sahip çözücülerle hazırlanan ekstrelerin fenolik bileşiklerce zengin olduğu, yapılan kompozisyon analizleri sonucu tespit edilmiştir. Yüksek fenolik içeriğine paralel olarak, bitkinin kök ekstrelerinde yüksek antioksidan kapasite tespit edilmiştir. Bitkinin köklerinden elde edilen ekstrelerin L929 sağlıklı fare fibroblast hücrelerinde ve MDA-MB-231 meme kanseri hücre hattında elde edilen sonuçlara göre; ekstreler belli bir konsantrasyon aralığında sağlıklı hücrelere toksik etki göstermezken meme kanseri hücreleri üzerinde belirli dozlarda toksik etkili bulunmuştur.



Şekil 3. *A. mollis* bitkisi köklerinden elde edilen ekstrelerin L929 sağlıklı fare fibroblast hücrelerine sitotoksik etkisi

(Alc MEOH : *A. mollis* kök metanol ekstresi, Alc CHCl₃: *A. mollis* kök diklorometan alt ekstresi, Alc EtOAc: *A. mollis* kök etilasetat alt ekstresi, Alc BuOH: *A. mollis* kök bütanol alt ekstresi, Alc su: *A. mollis* kök su alt ekstresi)



Şekil 4 *A. mollis* bitkisi köklerinden elde edilen ekstrelerin MDA-MB-231 meme kanseri hücrelerine sitotoksik etkisi

(Alc MEOH : *A. mollis* kök metanol ekstresi, Alc CHCl₃: *A. mollis* kök diklorometan alt ekstresi, Alc EtOAc: *A. mollis* kök etilasetat alt ekstresi, Alc BuOH: *A. mollis* kök bütanol alt ekstresi, Alc su: *A. mollis* kök su alt ekstresi)

A. mollis bitkisi köklerinden hazırlanan ekstrelerin toplam fenol ve flavonoid içeriğinin tespit edilmesi ile ilgili daha önceden yapılmış herhangi bir çalışma bulunmamaktadır. Ancak *A. vulgaris* türünün kökleri ve topraküstü kısımları fenolik kompozisyonun, spektrofotometrik yöntemlerle analiz edildiği bir çalışmada; bitkinin kökleri kullanılarak hazırlanan metanol ekstresinin toplam fenol miktarı 442.32 ± 22.31 mg_{GAEs}/g_{ekstre}, toplam flavonoid miktarı ise 19.80 ± 0.35 mg_{RUEs}/g olarak bulunurken; *A. mollis*'te kök ekstresinin toplam fenol içeriği 433.48 ± 3.74

mg_{GAE}/g_{ekstre} toplam flavonoid miktarı ise 95.15 ± 4.96 mg_{CA}/g_{ekstre} olarak bulunmuştur. Bu iki yakın türde köklerden hazırlanan metanol ekstreleri benzer oranda yüksek fenolik içeriğe sahiptir. Ancak *A. mollis* kök ekstrelerinin flavonoid içeriği *A. vulgaris* kök ekstrelerine göre belirgin derecede daha yüksek bulunmuştur.¹⁶ Ayrıca yapılan bir başka çalışmada *A. mollis* topraküstü kısımlarından hazırlanan metanol ekstrelerinde ise toplam fenol miktarı 332.7 ± 4.8 mg_{GAE}/g_{ekstre} toplam flavonoid miktarı ise 46.4 ± 5.9 mg_{RE}/g_{ekstre} olarak bulunmuştur.¹⁷

A. mollis bitkisinin antioksidan aktivitelerinin araştırıldığı çalışmalara bakıldığında daha çok, bitkinin topraküstü kısımlarından elde edilen ekstrelerin DPPH radikalini süpürücü etkilerinin araştırıldığı gözlenmektedir. Yapılan bir çalışmada EC50 değerleri MeOH ekstresi için 31.7 ± 4.9 µg/mL, EtOAc ekstresi için 9.8 ± 1.8 µg/mL olarak verilmiştir.¹⁸ Yine *A. mollis* topraküstü kısımlarının DPPH radikalini süpürücü etkilerinin araştırıldığı başka bir çalışma da ise %70'lik metanolla hazırlanan ekstresinde EC50 değeri 0.21 ± 0.001 mg/mL olarak bulunmuştur.¹⁹ Aynı bitkinin başka lokaliteden toplanan örneklerinden hazırlanan %50'lik metanol ekstresinde ise EC50 değeri 0.161 ± 0.018 mg/mL olarak hesaplanmıştır.¹⁷ Elde edilen veriler karşılaştırıldığında *A. mollis* bitkisi köklerinden hazırlanan ekstrelerinin topraküstü kısımlarından hazırlanan ekstrelere oranla daha yüksek fenolik içeriğine sahip olduğu, buna paralel olarak DPPH radikali süpürücü etkisinin daha yüksek olduğu gözlenmektedir. En düşük EC50 değerine sahip olan Alc EtOAc alt ekstresinin hidrojen verme kabiliyetine sahip olan ve primer antioksidanlar gibi davranarak serbest radikalleri inhibe eden sekonder metabolitlerce zengin olduğu değerlendirilmiştir.¹⁸

A. mollis' in yapraklarının farklı konsantrasyonlarda sulu etanol ekstrelerinin hazırlanarak antioksidan kapasitelerinin çeşitli yöntemlerle karşılaştırılıp değerlendirildiği bir çalışmada ekstrenin ABTS radikalini süpürücü etkisi 3.08 ± 6.74 mmol/L Trolox olarak tespit edilmiştir.²⁰ Çalışmada değerlendirilen kök ekstrelerinde ise en yüksek etki Alc EtOAc (2.45 ± 0.003 mmol/L Trolox) ve Alc BuOH (2.35 ± 0.02 mmol/L Trolox) alt ekstrelerinde gözlenmiştir.

A. mollis bitkisinin köklerinin MDA-MB-231 kanserli hücre hattında ve L929 sağlıklı fibroblast hücreleri üzerindeki toksisitesi ilk defa tarafımızdan belirlenmiştir. *Alchemilla* türleri ile yapılan sitotoksikite çalışmalarına baktığımızda; aynı türün toprak üstü kısımlarından hazırlanan ekstrelerin MCF-7 meme kanseri hücrelerine karşı etkisi SRB metodu ile araştırılmış, özellikle ekstrelerin 62.5 ve

1000 µg/mL konsantrasyon aralığında oldukça toksik olduğu bulunmuştur.¹⁷

Ancak bu çalışmada aynı bitkinin köklerinden elde edilen ekstrelerinin MDA-MB-231 hücrelerine, MCF-7 hücrelerine olduğu kadar toksik olmadığı belirlenmiştir. Bunun en önemli sebepleri olarak kullanılan hücrelerin hücresel döngülerinin, çoğalma potansiyellerinin farklı olması²¹ ve ayrıca MDA-MB-231 meme kanseri hücrelerinin agresif tümör davranışı, uzak organ metastazı ve hormon ve Her-2/neu reseptörlerinin negatif olması (üçlü negatif özellik) gibi özelliklerinden dolayı MCF-7 hücrelerine göre uygulanan tedaviye daha dirençli olmaları ile ilişkilendirilebilir.²²

A. vulgaris bitkisinin toprak üstü kısımlarından farklı çözücüler kullanılarak hazırlanan ekstrelerin antikanser özellikleri farklı hücre hatları (A2780, HeLa, MCF7 PC-3) kullanılarak tespit edilmiş; kateşin, kersetin, luteolin, apigenin gallik ve kafeik asit içeriğinin zengin olması sebebiyle özellikle EtOAc ve MeOH ekstrelerinin önemli derecede sitotoksik etki gösterdiği belirtilmiştir.²³ Kullanılan yöntemler, uygulanan konsantrasyonlar ve bitkilerin içerikleri farklılık gösterse de elde edilen sonuçlara göre *Alchemilla* türlerinin EtOAc ve MeOH ekstrelerinin yüksek fenolik içeriği sayesinde kanserli hücre hatlarında antiproliferatif ve sitotoksik etkilere sahip olduğu gösterilmiştir.

Birçok çalışma *Alchemilla* cinsine ait türlerin farmakolojik aktivitelerinin sahip olduğu tanenlerden ve flavonoidlerden kaynaklandığını göstermektedir.¹⁸ Özellikle kondanse tanenler ve fenolik asitler; antiproliferatif özelliklere sahip bileşikler olarak tespit edilmiştir.^{23,24} Sonuç olarak *A. mollis* bitkisi zengin fenolik bileşik içeriği ile kanserli hücrelerin poliferasyonunu inhibe ederek kanser tedavisinde umut verici terapötik ajanların keşfedilmesinde önemli bir kaynak olabileceği tarafımızca yapılan çalışmalarla tespit edilmiştir.

Bu sonuçlar *Alchemilla* türlerinin potansiyel fonksiyonel gıda uygulamaları için uygun bitkiler olduğunu göstermektedir. Ancak etkinliğin mekanizmasını aydınlatılmak adına çalışmaların detaylandırılması gerekmektedir. Daha

sonraki çalışmaların, etkiden sorumlu sekonder metabolitlerin tespiti, izolasyonu ve bu etken maddelerin etki mekanizmalarının araştırılması şeklinde ilerlemesi planlanmaktadır.

Araştırmacıların Katkı Oranı: Yazarlar deneylerin yapılması ve makalenin yazılması aşamasında makaleye eşit oranda katkı sağlamışlardır. Bitkilerin toplanması ve ekstraksiyon işlemleri, antioksidan aktivite ve sitotoksik etki deneyleri, makalenin hazırlanması: Selen İlgün; antioksidan aktivite ve sitotoksik etki tayin deneyleri, sonuçların değerlendirilmesi, makalenin hazırlanması: Gökçe Şeker Karatoprak

Kaynaklar

1. Rashid S, Manzoor AR, Wajaht AS, Bilal AB. Chemical composition, antimicrobial, cytotoxic and antioxidant activities of the essential oil of *Artemisia indica* Willd. *Food Chem* 2013; 138: 693-700.
2. Demiroz T, Nalbantsoy A, Aydin Kose F, Baykan S. Phytochemical composition and antioxidant, cytotoxic and anti-inflammatory properties of *Psephellus goeksunensis* (Aytaç & H. Duman) Greuter & Raab-Straube. *S. Afr. J. Bot* 2020; 130: 1-7.
3. Ukwubile CA, EO Ikpefan, TS Malgwi, et al. Cytotoxic effects of new bioactive compounds isolated from a Nigerian anticancer plant *Melastomastrum capitatum* Fern. leaf extract. *Scientific African* 2020; 8: 421.
4. Ripa FA, Mahmuda H, Laizuman N, Islam M. Antibacterial, cytotoxic and antioxidant activity of *Passiflora edulis* Sims. *Eur J Sci Res* 2009; 31: 592-98.
5. Y Abdul-Hafeez E, Orabi AA M, HM Ibrahim O, Ilinskaya O, and S Karamova N. In vitro cytotoxic activity of certain succulent plants against human colon, breast and liver cancer cell lines. *S. Afr. J. Bot* 2020; 131: 295-301.
6. Kaya B, Menemen Y, Saltan ZF. Flavonoid Compounds Identified in *Alchemilla* L. Species Collected in the North-Eastern Black Sea Region of Turkey. *Afr J Tradit Complement Altern Med* 2012; 9(3): 418-425.
7. Hayirlioglu-Ayaz S, Inceer H. Three new *Alchemilla* L.(Rosaceae) records from Turkey, *Pak J Bot* 2009; 41: 2093-96.
8. Baytop T. Türkiye'de Bitkiler ile Tedavi. 2. baskı, İstanbul, Nobel Tip Kitabevleri, 1999:370.
9. Hamad I, Erol-Dayi Ö, Pekmez M, Onay-Ucar E, Arda N. Free radical scavenging activity and protective effects of *Alchemilla vulgaris* (L.). *J. Biotechnol* 2007; 2: 40-41.
10. Shrivastava R, Nathalie C, Gareth WJ. Effects of *Alchemilla vulgaris* and glycerine on epithelial and myofibroblast cell growth and cutaneous lesion healing in rats, *Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives* 2007; 21: 369-73.
11. Falchero L, Mauro C, Alessia F, Giampiero L, Daniele R, Aldo T. Essential oil composition of lady's mantle (*Alchemilla xanthochlora* Rothm.) growing wild in Alpine pastures, *Nat Prod Res* 2009; 23: 1367-72.
12. Singleton Vernon L, Rudolf O, Rosa ML. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. *Meth. Enzymol* 1999; 14:152-178.
13. Miliauskas G, Venskutonis PR, Van Beek TA. Screening of radical scavenging activity of some medicinal and aromatic plant extracts, *Food Chem* 2004; 85: 231-37.
14. Gyamfi MA, Yonamine M, Aniya Y. Free-radical scavenging action of medicinal herbs from Ghana: *Thonningia sanguinea* on experimentally-induced liver injuries. *Vasc Pharmacol* 1999; 32: 661-67.
15. Re R, Nicoletta P, Anna P, Ananth P, Min Y, Catherine R. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic. Biol. Med* 1999; 26: 1231-37.

16. Boroja T, Mihailović V, Katanić J, Pan S-P, et al. The biological activities of roots and aerial parts of *Alchemilla vulgaris* L, *S. Afr. J. Bot* 2018; 116: 175-84.
17. Karatoprak GŞ, İlgün S, Koşar M. Antiradical, antimicrobial and cytotoxic activity evaluations of *Alchemilla mollis* (Buser) Rothm. *Int. J. Herb. Med* 2018; 6(2): 33-38.
18. Trendafilova A, Milka T, Milena N, Anna G, Antonina V. Flavonoid constituents and free radical scavenging activity of *Alchemilla mollis*. *Nat Prod. Commun* 2011; 6(11):1851-1854.
19. Karatoprak GŞ, İlgün S, Koşar M. Phenolic Composition, Anti-Inflammatory, Antioxidant, and Antimicrobial Activities of *Alchemilla mollis* (Buser) Rothm, *Chem. Biodivers* 2017; 4:1-12.
20. Nedyalkov P, Maria K, Dasha M, Georgi K, Stefcho K. Influence of the ethanol concentration on the antioxidant capacity and polyphenol content of *Alchemilla mollis* extracts. *Comptes rendus de l'Académie bulgare des Sciences* 2015; 68: 1491-502.
21. Nohara K, Fang W, Sarah S. Glycosphingolipid composition of MDA-MB-231 and MCF-7 human breast cancer cell lines, *Breast Cancer Res. Treat* 1998; 48: 149-57.
22. Karabulut B. Üçlü-Negatif Meme Kanserli Hastalarda Güncel Klinik Uygulamalar ve Devam Eden Klinik Çalışmalar. *Türkiye Klinikleri J Gen Surg-Special Topics* 2013; 6(2):66-76.
23. Vlasisavljević S, Jelaca S, Zengin G, et al. *Alchemilla vulgaris* agg. (Lady's mantle) from central Balkan: antioxidant, anticancer and enzyme inhibition properties. *RSC Advances* 2019; 9: 37474-4483.
24. Zarin MA, Wana HY, Ishaq A, Armaniana N. Antioxidant, antimicrobial and cytotoxic potential of condensed tannins from *Leucaena leucocephala* hybrid-RendangMazni. *Food Science and Human Wellness* 2016;5: 65-75.