

T.C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
BİLİMSEL ARAŞTIRMA PROJELERİ
KOORDİNASYON BİRİMİ

***Salvia fruticosa* Mill. (*S. triloba*)'nın β -Amiloid Peptidle İndüklenmiş Nörotoksisitede
GSK-3 β İnhibisyonu Üzerinden Koruyucu Etkisinin İncelenmesi**

Proje No: TCD-2012-4006

Çok Disiplinli Araştırma Projesi

SONUÇ RAPORU

Proje Yürütücüsü:

Perihan Gürbüz

Eczacılık Fakültesi

Araştırmacılar

M. Betül Yerer Aycan (ERÜ Eczacılık Fakültesi)

Müberra Koşar (ERÜ Eczacılık Fakültesi)

L. Ömür Demirezer (HÜEF Eczacılık Fakültesi)

Mehmet Yavuz Paksoy (Tunceli Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi)

Bilge Odabaşı (ERÜ Eczacılık Fakültesi)

Leyla Paşayeva (ERÜ Eczacılık Fakültesi)

Esra Köngül (ERÜ Eczacılık Fakültesi)

Duygu Eroğlu (ERÜ Eczacılık Fakültesi)

Aralık 2014

KAYSERİ

TEŞEKKÜR

Proje çalışmalarım sırasında bana ve grubuma her türlü çalışma imkanını sağlayan, ayrıca proje çalışmalarının HPLC analizlerinin gerçekleştirilmesinde katkılarını ve desteğini gördüğümüz sevgili anabilim dalı başkanımız ve dekanımız Prof. Dr. Müberra Koşar'a,

Proje çalışmamın her aşamasında bilgi ve deneyimlerini benimle paylaşarak bana destek olan Farmakoloji Ab. D. öğretim üyesi sevgili Doç. Dr. M. Betül Yerer Aycan' a,

Proje konusunu belirlememde bana fikir veren sevgili doktora danışmanım Prof. Dr. L. Ömür Demirezer' e (Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmakognozi Anabilim Dalı),

Proje materyalinin toplanmasında, teşhisinde ve örneğin saklanması emeği geçen Yrd. Doç. Dr. Mehmet Yavuz Paksoy' a,

Projede yer alan moleküler farmakoloji deneylerini yürütmek için büyük bir özveriyle çalışan Ecz. Bilge Odabaşı' na, projede yer almıyor olmasına rağmen proje ile ilgili deneylerin yürütülmesine yardımcı olan Ecz. Alim Hüseyin Dokumacı' ya, projenin hücre hatlarının çoğaltılmasında yardımcı olan Yrd. Doç. Dr. Eren Demirpolat' a,

Kromatografi çalışmalarını yürüten sevgili öğrencilerim Leyla Paşayeva, Duygu Eroğlu ve Esra Köngül'e,

Ekstrelerin LC-MS analizini gerçekleştiren Dr. Biol. Fatih Göğer'e (Anadolu Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmakognozi Ab. D.),

Bu projeyi maddi olarak destekleyen ERÜ BAP (TCD-2012-4006) birimine,

Proje çalışmalarında maddi ve manevi anlamda en büyük destek ve motivasyon kaynağım olan sevgili eşime ve oğullarıma en içten duygularıyla teşekkür ederim.

Perihan GÜRBÜZ

ÖZET

β -Amiloid peptid ($A\beta$) birikimi, nörofibriler düğümler ve nöronal hücre ölümü Alzheimer hastalığının en önemli patolojik bulgularıdır. Glikojen sentaz kinaz-3 (GSK-3) glikojen metabolizmasında rol oynayan ubikitoz bir serin/treonin kinazdır. Birçok biyolojik etki ve fonksiyona sahip GSK-3 Alzheimer hastalığında tau hiperfosforilasyonu ve β -amiloid oluşumu ile ilişkilendirilmiştir. Bu çalışmada Alzheimer hastalığında geleneksel olarak kullanımı olan *Salvia* türlerinden daha önce nöroprotektif etkisi bu mekanizmayla gösterilmemiş olan *Salvia fruticosa* Mill. (syn. *S. triloba*)'nın infüzyonu, uçucu yağı ve metanolik ekstresinin β -amiloid peptid ile indüklenmiş nörodejenerasyondaki koruyucu etkilerini GSK-3 β inhibisyonu üzerinden gerçekleştirip gerçekleştirmediği araştırılmıştır. En fazla GSK-3 β inhibisyonu etki gösteren ekstre belirlendikten bu ekstrenin SH-SY5Y nöroblastoma hücre kültürü ortamında β -amiloid peptidle indüklenmiş nörotoksisitedeki koruyucu rolü incelenmiştir.

Bu çalışmada *Salvia fruticosa* Mill. (syn. *S. triloba*)'nın toprak üstü kısımlarının önce metanolle, daha sonra bu ekstre üzerinden sıvı-sıvı ekstraksiyon yöntemiyle farklı polaritelerdeki çözücülerle ekstre edilerek hazırlanmış ekstralarının, hidrodistilasyonla elde edilmiş olan uçucu yağının ve bitkinin toprak üstü kısımlarından hazırlanan infüzyonunun GSK-3 β inhibitörü olup olmadıkları, öncelikle *in-vitro* olarak araştırılmıştır. En yüksek etki gösteren n-BuOH ekstresi, Poliamit kolon kromatografisi yardımıyla fraksiyonlanmıştır. Elde edilen ana fraksiyonlar tekrar bu aktivite için denenmiştir. Bu fraksiyonlardan en yüksek etki gösteren FR5 üzerinde açık ve kapalı kolon kromatografisi, teknikleri kullanılarak saflaştırma işlemi gerçekleştirilmiştir. Elde edilen bileşiklerin yapıları spektroskopik yöntemler kullanılarak aydınlatılmıştır. Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi yardımıyla standart maddeler kullanılarak ekstradaki miktarları araştırılmıştır ve aktif fraksiyon olan FR5' te Rozmarinik asitin en yüksek oranda olduğu tespit edilmiştir. n-BuOH ve FR5' in SH-SY5Y

nöroblastoma hücre kültürü ortamında β -amiloid peptid ile indüklenmiş nörotoksisitedeki koruyucu rolleri, hücre canlılığı (MTT yöntemi), gösterilmiştir.

Bu çalışmada, *Salvia fruticosa* Mill. (syn. *S. triloba*)'nın β -amiloid peptid ile indüklenmiş nörotoksisitede koruyucu rolü olup olmadığı, bu etkilerini GSK-3 β inhibisyonu üzerinden mi gösterdiği ve bu inhibisyonda hangi saf maddelerin rol oynayabileceği hususları ilk kez araştırılmıştır.

ABSTRACT

β -Amyloid peptide ($A\beta$) aggregation, neurofibrillary tangles and neuronal cell death are the main pathological evidences of Alzheimer Disease (AD). GSK-3 is a ubiquitous serine/threonine kinase which is mainly essential for in glycogen metabolism. GSK-3 which has known to be a multifaceted enzyme playing important roles in many biological effects and functions has been related to tau hyperphosphorylation and β amyloid aggregation in AD. Furthermore the *in-vivo* and *in-vitro* over expression of GSK-3 β in neuronal cells has been shown to induce apoptosis.

In this study protective effects of various extracts prepared from two *Salvia* species (*Salvia huberi* Hedge and *S. rosifolia* Sm.)-which has not been studied chemically except essential oil components and investigated pharmacologically for this effects before- on β amyloid peptide induced neurodegeneration and the underlying mechanism will be studied regarding GSK-3 β inhibition. After the most effective GSK-3 β inhibitory extract is identified, the responsible compound or compounds for this activity will be isolated. The structures of the compounds will be elucidated via spectroscopic methods.

In this study the *in-vitro* GSK-3 β inhibitory effects of hydro alcoholic extracts of only aerial parts of two *Salvia* species and various extracts which prepared with different solvents with increasing polarity will be evaluated. The efficient polar extracts will be fractionated with Polyamide column chromatography and the apolar extracts will be fractionated with Sigel open column chromatography. The main fractions will be evaluated for GSK-3 β inhibitory activity. The various chromatographic methods (Polyamide Column Chromatography, Silica gel Column Chromatography, Sephadex LH-20 Column Chromatography, Vacuum Liquid Chromatography, Middle Pressured Liquid Chromatography) carried on the most active fraction (FR5) for isolation of the compounds. The structures of the isolated compounds are elucidated by the mean of spectral methods including (UV, IR, MS, ^1H -NMR, ^{13}C -NMR, 2D-

NMR); the distribution and quantities of these compounds from *S. fruticosa* is investigated using HPLC.

n-BuOH extract and FR5 were tested on SH-SY5Y neuroblastoma cell lines and their protective effects on β -amyloid peptide induced neurotoxicity was investigated by using MTT assay.

In this study whether *Salvia fruticosa* and its various extracts have protective effects on β -amyloid peptide induced neurotoxicity and whether they show these effects through GSK-3 β inhibition and which compound or compounds can play an inhibitory role on GSK-3 β are investigated for the first time.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
ÖZET	iv
ABSTRACT	vi
İÇİNDEKİLER	viii
SİMGELER VE KISALTMALAR	x
RESİMLER	xii
ŞEKİLLER	xii
TABLolar	xiii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
3. DENEYSEL KISIM	11
3.1. Fitokimyasal Çalışmalar	11
3.1.1. Bitkisel Materyal	11
3.1.2. Kimyasal Maddeler ve Aletler	11
3.1.3. Kromatografik Yöntemler	14
3.1.4. Ekstraksiyon ve Fraksiyonlama Çalışmaları	17
3.2. Aktivite Çalışmaları	17
3.2.1. Kimyasal Maddeler ve Aletler	17
3.2.2. <i>in-vitro</i> GSK-3 β Aktivite Çalışmaları	18
3.2.3. Hücre Kültür Deneyleri	20
3.2.3.1. Hücrelerin çoğaltılması ve Genel Hücre Kültür Uygulama Prosedürü	20
3.2.3.2. SRB yöntemiyle toksik olmayan doz belirleme çalışmaları	24
3.2.3.3. SHSY-5Y hücrelerini Amiloit beta (1-42) toksisitesinden koruyucu	25

etkinin gerçek zamanlı hücre analiz cihazı ile llmesi

4. BULGULAR 28

4.1. Aktivite alışmaları 28

4.1.1. *in-vitro* GSK-3 β inhibitör aktivite 28

4.1.2. SRB yöntemiyle toksik olmayan doz belirleme alışmaları 29

4.1.3. SHSY-5Y hücrelerini Amiloit beta (1-42) toksisitesinden koruyucu 31

etkinin gerçek zamanlı hücre analiz cihazı ile llmesi

4.2. Kromatografik alışmalar 33

4.2.1. HPLC ve LC-MS/MS alışmaları 33

4.2.2. İzolasyon ve yapı tayin alışmaları 34

5. TARTIşMA 37

6. SONUÇ VE ÖNERİLER 42

SİMGELER ve KISALTMALAR

Ac	: Asetil
CHCl ₃	: Kloroform
CH ₂ Cl ₂	: Diklorometan
CH ₃ OH	: Metanol
¹³ C NMR	: ¹³ C-Nükleer Manyetik Rezonans
D ₂ O	: Dötero su
d	: Dublet
dd	: Dublet dublet
dt	: Dublet triplet
DEPT	: Distortionless Enhancement by Polarization Transfer
DMSO	: Dimetilsülfoksit
DMSO- <i>d</i> ₆	: Dötero Dimetilsülfoksit
ESI-MS	: Electron Spray Ionisation Mass Spectroscopy
EtOAc	: Etil asetat
g	: Gram
gs	: Geniş singlet
Gl. A.A.	: Glasiyel asetik asit
¹ H NMR	: ¹ H Nükleer Manyetik Rezonans
HCOOH	: Formik Asit
Hz	: Herz
IC ₅₀	: Inhibitor Concentration
IR	: Infrared
İTK	: İnce Tabaka Kromatografisi
<i>J</i>	: Kenetlenme Sabiti

KBr	: Potasyum Bromür
KK	: Kolon Kromatografisi
KOH	: Potasyum hidroksit
l	: Litre
m	: Multiplet
mg	: Miligram
ml	: Mililitre
mM	: Milimolar
MeOH	: Metanol
MeOH- d_4	: Dötero Metanol
μg	: Mikrogram
μm	: Mikrometre
MHz	: Megahertz
<i>n</i> -BuOH	: <i>n</i> -Butanol
NMR	: Nuclear Magnetic Resonance
OBSK	: Orta Basıncılı Sıvı Kromatografisi
ppm	: Milyonda bir kısım
q	: Kuartet
s	: Singlet
t	: Triplet
UV	: Ultraviyole
VSK	: Vakum Sıvı Kromatografisi

RESİMLER

Resim 1	<i>Salvia fruticosa</i>	xiv
Resim 2	Xcelligence sistemi	27

ŞEKİLLER

		Sayfa
Şekil 1	Alzheimer Hastalığı' nın patolojik mekanizması	4
Şekil 2	GSK-3 β enziminin sarmal yapısı	5
Şekil 3	GSK-3' ün etkilediği biyolojik olaylar ve hastalıklarla ilişkisi	6
Şekil 4	Artmış GSK-3 aktivitesinin nöronlar üzerine etkisi	7
Şekil 5	Kinaz-Glo ile GSK-3 beta aktivite ölçüm yönteminin mekanizması	19
Şekil 6	<i>Salvia fruticosa</i> ' dan hazırlanan ekstrelerin GSK-3 β inhibitör aktiviteleri (%)	27
Şekil 7	<i>Salvia fruticosa</i> ' dan hazırlanan n-BuOH ekstresinin ana fraksiyonlarının GSK-3 β inhibitör aktiviteleri (%)	27
Şekil 8.	Rozmarinik Asit' in % GSK-3 β enzim inhibitör etkisi	27
Şekil 9,10,11.	Standart maddelerin SRB yöntemine göre belirlenmiş % canlılık üzerine etkileri	28
Şekil 12.	<i>S. fruticosa</i> ekstrelerinin SRB yöntemine göre belirlenmiş % canlılık üzerine etkileri	30
Şekil 13.	A β (1-42) muamele edilmiş ve edilmemiş hücrelerin büyüme profilleri	31
Şekil 14.	<i>S. fruticosa</i> infüzyonunun A β 22 μ M ile muamele edilmiş hücreler üzerine etkisi	32
Şekil 15.	n-BuOH ekstresinin A β 22 μ M ile muamele edilmiş hücreler üzerine etkisi	32

Şekil 16.	FR5' in $A\beta$ 22 μ M ile muamele edilmiş hücreler üzerine etkisi	32
Şekil 17.	Rozmarinik asit, SB 216763 bileşiklerinin $A\beta$ 22 μ M ile muamele edilmiş hücreler üzerine etkisi	32
Şekil 18.	FR5' in LC-MS/MS Kromatogramı	33
Şekil 19.	FR5' in HPLC Kromatogramı	34

TABLOLAR

Tablo 3.1.	Kromatografik çalışmalarda kullanılan adsorbanlar	12
Tablo 3.2.	Kromatografik çalışmalarda kullanılan solvan sistemleri	13
Tablo 4.1.	FR5' in LC-MS/MS kromatogramına göre içerdiği maddeler	34
Tablo 4.2.	FR5' in HPLC kromatogramına göre içerdiği maddeler ve miktarları	35
Tablo 4.3.	Rozmarinik Asit bileşiğinin ^{13}C (100 MHz, CD_3OD) ve ^1H (400 MHz, CD_3OD) NMR spektroskopik değerleri.	36



Resim 1: *Salvia fruticosa*

1. GİRİŞ

İlaç adayı olabilecek model moleküller bugüne kadar öncelikle doğal kaynaklardan elde edilmiştir. Ayrıca bazı maddeleri sentezlemek mümkün olmayabilir ya da sentez sonucu doğal bileşik ile aynı kimyasal konfigürasyon sağlanamazsa etki görülmeyebilir. Bu durumda doğal yollardan elde edilmiş ya da yarı sentez yoluyla üretilmiş bileşikler kullanılır. Günümüzde hala doğal kaynaklardan elde edilen bileşikler doğrudan kullanımda ve/veya sentetik ilaç geliştirme sahasında model bileşik olarak önemlerini korumaktadır. Türkiye bitki çeşitliliği açısından yeni doğal bileşik araştırmalarında çok önemli bir yere sahiptir.

Alzheimer hastalığı, dejeneratif nörolojik bir rahatsızlık olup, amiloit β proteinini içeren senil plakların oluşumu ve beyinde kolinerjik nöromediyatörlerin kaybı ile karakterizedir. Hastalarda gözlenen en önemli biyokimyasal değişim asetilkolin düzeyinin hippokampus ve beyin korteksinde azalmasıdır. Bu nedenle asetil kolinin hidrolizinden sorumlu olan enzim asetilkolinesteraz (AChE) inhibisyonunu sağlamak, Alzheimer hastalığının en önemli tedavi yöntemlerinden biridir. Günümüzde Alzheimer hastalığının tedavisinde en iyi sonuçların alındığı tek ilaç grubu asetilkolinesteraz inhibitörleridir.

Asetilkolinesteraz inhibitörü olarak ilk kullanılan madde doğal kaynaktan izole edilen fizostigmindir. Daha sonra bu bileşiğe benzer maddeler sentezlenmiş ve diğer sentetikler AChE inhibitörleri olarak kullanılmıştır. Bunlar, takrin, donepezil, rivastigmin, metrifonat, eptastigmin ve fenserin gibi sentetiklerdir. *Galanthus* türlerinden elde edilen galantamin de önemli bir AChE inhibitörüdür. Günümüzde yaygın olarak *Ginkgo biloba* ekstraktlarını içeren preparatlar da hafıza üzerindeki iyi edici özelliklerinden dolayı kullanılmaktadır.

Alzheimer hastalığı için birçok patolojik mekanizma önerilmiş olsa da $A\beta$ 'nin Alzheimer hastalığının başlaması ve ilerlemesinde anahtar bir molekül olduğu düşünülmektedir. Amiloid kaskat hipotezine göre β -amiloid fragmanında (1-42) ($A\beta$ 42) meydana gelen artış β -amiloidin oligomerizasyon ve depozisyonu sonucunda birikmesine

neden olmaktadır. Birikmiş A β 42, oksidatif stres oluşturup, merkezi sinir sisteminin homeostazisini değiştirerek enflamatuvar cevap ile demansın asıl sebeplerinden biri olan nöronal hücre kaybına neden olmaktadır (36,37,41,43).

Glikojen sentaz kinaz (GSK-3) ilk olarak glikojen sentezini düzenleyen bir enzim olarak tanımlanmış olmakla beraber son zamanlarda bu enzimin apoptozis ve gen ekspresyonunu da kapsayan çok çeşitli biyolojik olaylarda da rol oynadığı saptanmıştır. GSK-3' ün iki homolog izoformundan biri olan GSK-3 β ' nin aktivasyonunun tau patolojisi, A β sentezi ve apoptotik nöronal hücre ölümünde katkısının olduğu çeşitli araştırmalarla gösterilmiştir. GSK-3 β ' nin AD' de kilit öneme sahip bir enzim olduğunun anlaşılmasıyla birlikte GSK-3 β inhibitör etki gösteren bileşik arayışı önem kazanmıştır (7,19,21,26,32).

Bu çalışmada dünya genelinde ilaç, kozmetik ve parfüm endüstrisinde öneme sahip *Salvia* türlerinden biri olan ve ülkemizde doğal olarak yetişen *Salvia fruticosa* bitkisi üzerinde Farmakognozik araştırmalar yapılması planlanmıştır. Labiatae familyasına ait *Salvia* cinsi Dünya' da yaklaşık 900, Türkiye' de ise % 53' ü endemik doğal olarak yetişen 99 türle temsil edilmektedir. Çeşitli *Salvia* türlerinin halk arasında diyare, peptik ülser, yüksek ateş, kısırlık tedavisinde, çeşitli deri rahatsızlıklarında, romatizmal hastalıklarda, idrar yolu enfeksiyonlarında, anti-spazmodik, hemostatik, antidiyabetik ve anti-enflamatuvar olarak kullanılışları da bulunmaktadır. *Salvia* türleri, eski zamanlardan beri çeşitli ülkelerin halk tıplarında hafıza iyi edici özelliklerinden dolayı kullanılmakla beraber Alzheimer hastalığının doğal tedavisinde bilimsel anlamda oldukça yeni bir potansiyeldir (67).

Geleneksel tıpta demans tedavisinde kullanımı olan ve son yıllarda yapılan birçok çalışmayla çeşitli mekanizmalarla nöroprotektif etkileri gösterilen *Salvia* türleri üzerinde β -amiloid ile indüklenmiş nörotoksisitede koruyucu etkilerinin olduğuna dair az sayıda çalışma bulunmaktadır ve yapılmış bu çalışmalarda bitkinin bu etkilerini GSK-3 β enziminin direkt inhibisyonuyla gösterip göstermediğiyle ilgili bir çalışma bulunmamaktadır. Yapılan

alışmalar daha çok bu enzimnin ekspresyon düzeylerinin aktive olup olmaması, oluşan β -amiloid fibrillerinin destabilizasyonu ile ilişkilendirilmiştir (14).

Planlanan proje çalışmasında, ekstre ya da saf maddelerin GSK-3 beta inhibitör etkileri ile beta amiloit toksisitesi arasında herhangi bir paralellik olup olmadığının araştırılması için Anadolu’ da doğal olarak yetişen ve *S. officinalis* yerine kullanılan olan *Salvia fruticosa* bitkisi seçilmiş ve çalışma üç aşamada gerçekleştirilmiştir.

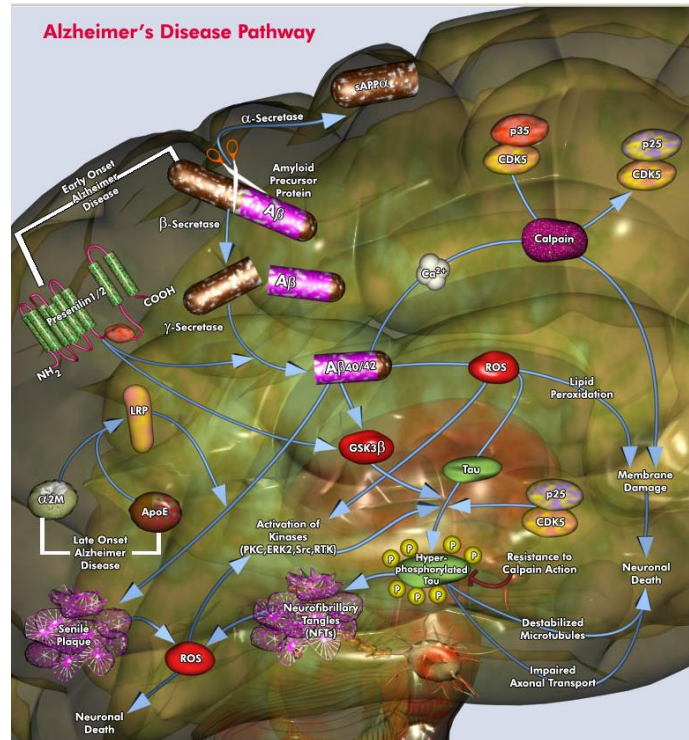
1. *Salvia fruticosa* bitkisinin toprak üstü kısımlarından hazırlanan MeOH, *n*-BuOH, Su ve Petrol eteri ekstrelerinin GSK-3 beta inhibitör etkilerinin saptanması,

2. GSK-3 β inhibitör etki gösteren ekstrelerin fraksiyonlanması ve bu fraksiyonların tekrar GSK-3 beta inhibitör etkilerinin araştırılması

3. Hücre hatları üzerinde Abeta (1-42) ile toksisite oluşturularak Aktif fraksiyonların bu toksisiteye karşı koruyucu etkilerinin ölçülmesi amaçlanmıştır.

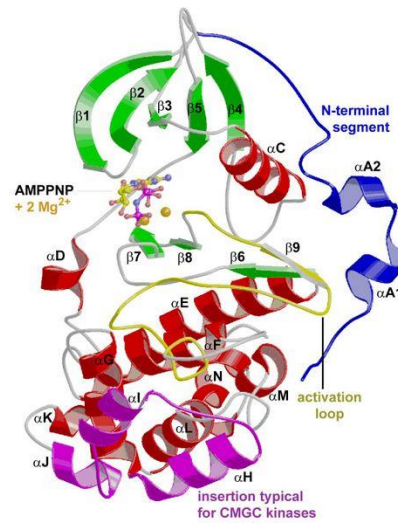
2. GENEL BİLGİLER

Alzheimer hastalığı (AD), beyinde ekstraselüler senil plak ve intranöronal nörofibriler düğüm (NFTs) oluşumuyla karakterize nörodejeneratif bir hastalıktır. Senil plakların ana bileşeninin normal metabolizma sonucu oluşan β -amiloid peptid ($A\beta$) olduğu saptanmıştır. Alzheimer hastalığı için birçok patolojik mekanizma önerilmiş olsa da $A\beta$ 'nin Alzheimer hastalığının başlaması ve ilerlemesinde anahtar bir molekül olduğu düşünülmektedir. Amiloid kaskat hipotezine göre β -amiloid fragmanında (1-42) ($A\beta_{42}$) meydana gelen artış β -amiloidin oligomerizasyon ve depozisyonu sonucunda birikmesine neden olmaktadır (Şekil 1). Birikmiş $A\beta_{42}$, oksidatif stres oluşturup, merkezi sinir sisteminin homeostazisini değiştirerek enflamatuvar cevap ile demansın asıl sebeplerinden biri olan nöronal hücre kaybına neden olmaktadır (36,37,41,43).



Şekil 1. Alzheimer Hastalığı' nın patolojik mekanizması

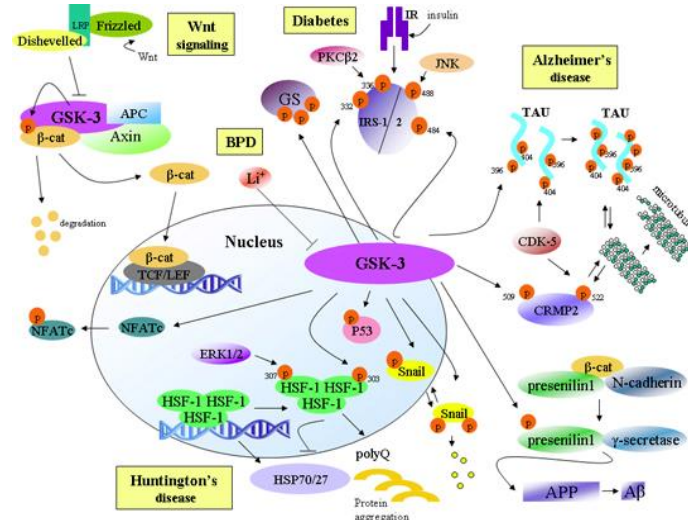
Glikojen sentaz kinaz (GSK-3) ilk olarak glikojen sentezini düzenleyen bir enzim olarak tanımlanmış olmakla beraber son zamanlarda bu enzimin apoptozis ve gen ekspresyonunu da kapsayan çok çeşitli biyolojik olaylarda da rol oynadığı saptanmıştır. GSK-3' ün iki homolog izoformundan biri olan GSK-3 β ' nın (Şekil 2) aktivasyonunun tau patolojisi, A β sentezi ve apoptotik nöronal hücre ölümünde katkısının olduğu çeşitli araştırmalarla gösterilmiştir. GSK-3 β ' nın AD' de kilit öneme sahip bir enzim olduğunun anlaşılmasıyla birlikte GSK-3 β inhibitör etki gösteren bileşik arayışı önem kazanmıştır (7,19,21,26,32).



Şekil 2. GSK-3 β enziminin sarmal yapısı

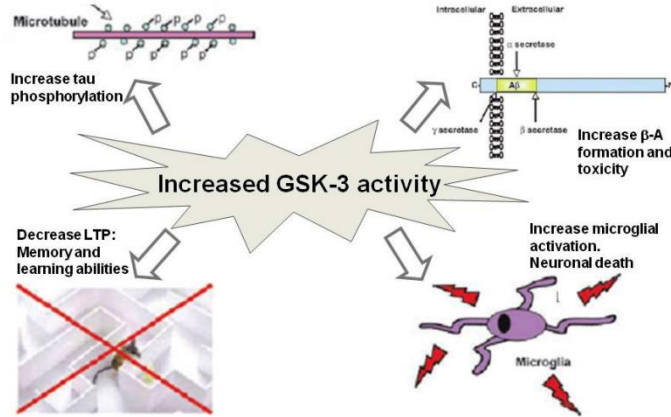
Bu arayış sonucunda birçok doğal ya da sentetik bileşik bu aktivite yönünden incelenmiş ve doğal bileşiklerden prenilli kemferol türevi bir flavonoit olan ikariin, deniz canlılarından elde edilen palinurin, himenialdisin, meridianin, indirubinler ve manzamin alkaloidlerinin, sentetik olarak da halometilketon, piridiloksadiazol, tiyadiazolidinon, pirazolpirimidin ve maleimit türevi maddelerin GSK-3 inhibitör etki gösterdiği bulunmuştur (7,9,34). Bu inhibitörlerden ikariinin GSK-3 β ' yı dolaylı olarak inhibe ederek PC12 nöroblastoma hücrelerinde tau hiperfosforilasyonunu engellediği gösterilmiştir (44). Sentetik bir non-ATP kompetitif inhibitör olan tiyadiazolidinon bileşiğinin transjenik farelerle yapılan bir çalışmada *in-vivo* olarak nöronal kaybı azalttığı gösterilmiştir (39). GSK-3 β enziminin A β nörotoksisitesindeki

rolü aydınlatılmış olmasına rağmen bu enzimin doğrudan inhibisyonunun Alzheimer patogenezindeki koruyucu rolleri ile ilgili çalışmalar (18) dikkate alındığında daha önce Alzheimer patogenezi ile asetilkolinesteraz üzerinden ilişkilendirilmiş olan *Salvia* türlerinin etkisini GSK-3 β enzimi üzerinden gerçekleştirip gerçekleştirmediği ilk kez bu çalışma ile gösterilecektir.



Şekil 3. GSK-3' ün etkilediği biyolojik olaylar ve hastalıklarla ilişkisi

GSK-3 β enzimi ile Alzheimer patogenezi arasında önemli bir bağlantı olabileceği son yıllarda oldukça önem kazanmıştır (Şekil 3). Öyle ki bu enzimin inhibisyonunun hastalığın patogenezinde yer alan tau fosforilasyonu ve beta-amiloid toksisitesi ile ilişkilendirilmiş olması oldukça dikkat çekicidir. O nedenle günümüzde GSK-3 β inhibisyonu gösteren veya yapısal olarak gösterme ihtimali olan bileşiklerin bulunabilmesi yeni tedavi rejimlerinin geliştirilebilmesine de ışık tutacaktır.



Şekil 4. Artmış GSK-3 aktivitesinin nöronlar üzerine etkisi

Alzheimer hastalığında geleneksel kullanıma sahip birçok bitki ve onların ekstrelerinin asetilkolinesteraz inhibitör etki, antioksidatif aktivite, $A\beta$ üreten sekretazların modülasyonu, $A\beta$ degradasyonu, ağır metal bağlama ve apoptotik mekanizmalarla ilişkileri *in-vitro* ve *in-vivo* çalışmalarla ortaya konmuştur (1,2,6,25,28,29). Hastalığın semptomatik tedavisinde daha çok fizostigmin, galantamin, huperzin A ve berberin gibi asetilkolinesteraz inhibitörü etki gösteren alkaloid yapısında doğal saf bileşikler ilgi görmüştür. Galantamin ve Huperzin A' nın aynı zamanda β -amiloid peptid fragmanına karşı nöroprotektif ve serbest radikalle indüklenmiş sitotoksistide etkili olduğu gösterilmiştir (25). Yapılan bir çalışmada alkaloid dışı farklı iskeletlere sahip çeşitli kalkon, naftokinon, furokumarin, flavonoid, lignan, fenilpropanoid, fenolik asit, tokoferol, sekoiridoit, triterpen ve ksanton bileşikleri incelendiğinde ksantonların galantamine yakın konsantrasyonlarda asetil kolinesteraz etki gösterdiği bulunmuştur (4). Çeşitli hayvan modellerinde nöroprotektif etkileri gösterilen ve geleneksel kullanıma sahip bitkilerin başında ise *Salvia officinalis*, *S. lavandulaefolia*, *Salvia miltiorrhiza*, *Melissa officinalis*, *Crocus sativus*, *Ginkgo biloba*, *Angelica sinensis*, *Dipsacus asper*, *Centella asiatica*, *Astragalus membranaceus*, *Cassia obtusifolia*, *Uncaria*

rhynchophylla, *Paeonia suffruticosa*, *Panax ginseng*, *Polygala tenuifolia*, *Magnolia officinalis* ve *Curcuma longa* gelmektedir (1). Bitkilerin bu etkileri monoterpenler, seskiterpen laktonlar, diterpenler, triterpenler (oleanan, ursan, dammaran), triterpenik saponinler, fenolik asitler, diarilheptanoitler, karotenoitler, bifenolik lignanlar ve oligosakkaritler gibi çok çeşitli madde gruplarına dayandırılmıştır (6,10-12,23,28,35).

Geleneksel Çin tıbbında kullanımı olan *Angelica* türlerinden *A. archangelica* ve *A. sinensis*' in birçok biyolojik etkilerinin yanı sıra β -amiloid ile indüklenmiş hücre ölümünde koruyucu etkilerinin olduğu ve bu etkilerini hücrel oksidasyon mekanizmalarına etki ederek gösterdikleri ortaya konmuştur (17). İçerisinde *Angelica archangelica* ekstresi ve ferulik asit bulunan Feruguard isimli ürünün Alzheimer hastaları üzerinde demansın davranışsal ve psikolojik semptomlarını anlamlı bir şekilde azalttığı; ferulik asitin aynı zamanda β -amiloid fibrillerinin stabilizasyonunu da bozduğu yapılan çalışmalarla gösterilmiştir (17,29). Başka bir çalışmada da *A. sinensis*' in içerdiği fenolik asitler olan ferulik asit ve ftalik asitin düşük dozlarda ekstreye göre daha yüksek nöroprotektif etki gösterdiği bulunmuştur (13). Yine *A. sinensis*' in metanol ekstresinin GSK-3 β ' nin down-regülasyonu sonucu inhibe ederek A β ile indüklenmiş nörotoksisiteyi ve tau hiperfosforilasyonunu azalttığı gösterilmiştir (45). Başka bir *Angelica* türü olan *A. officinalis* ile yapılan bir çalışmada da bitkinin içerdiği furanokumarinlerin yüksek bütirilkolinesteraz inhibitör aktivite gösterdiği saptanmıştır (38).

Yine geleneksel Çin tıbbında kökleri kalp-damar sistemi hastalıklarını tedavi etmek amacıyla kullanımı çok eskilere dayanan ve etkili madde olarak fenolik asitler ve abietan tip iskelete sahip tansinonlar adı verilen diterpenleri taşıyan başka bir bitki olan *Salvia miltiorrhiza*' nin AchE aktivite, A β toksisite ve Nitrikoksit sentaz (NOS) etkileri olduğu yapılan çalışmalarla kanıtlanmıştır (22). 2011 yılında yapılan bir çalışmada bitkinin köklerinin içerdiği fenolik asitlerin β -amiloid ile indüklenmiş sitotoksitede koruyucu, tansinonların ise asetilkolinesteraz inhibitör ve antioksidan etkileri olduğu gösterilmiştir (24,46). Özellikle bir

fenolik asit olan salvianolik asit B' nin A β fibril oluşumunu engelleyerek ve oluşan fibrilleri dağıtarak A β ile indüklenmiş nörotoksisitede koruyucu rol oynadığı çeşitli çalışmalarla gösterilmiştir (5,27). Bununla birlikte *Salvia officinalis* ve *Salvia lavandulaefolia*' nin etanolik ekstreleri ve uçucu yağlarının çok küçük dozlarda bile asetilkolinesteraz inhibitör etkileri olduğu gösterilmiş; bu ekstre ve uçucu yağlarla orta dereceli Alzheimer hastaları üzerinde yapılan klinik denemelerde hastaların kognitif fonksiyonlarında iyileşme olduğu gözlenmiştir (2,16,33,42). Yine son yıllarda yapılan bir çalışmada *S. officinalis* ve içerdiği kafeik asit türevi bir fenolik asit olan rozmarinik asitin A β ile indüklenmiş nörotoksisitede PC12 hücrelerini koruyucu etki gösterdiği bulunmuştur (14).

Çalışmada *Salvia fruticosa* Mill. (syn. *S. triloba*)' nin seçilme nedeni; Alzheimer patogenezinde koruyucu etkileri ile ilişkilendirilmiş olan *Salvia* türlerinin şimdiye kadar etki mekanizmalarının genellikle geleneksel bir yaklaşım olan asetilkolinesteraz inhibitör etkinlik üzerinden araştırılmış olup, bu bitkilerin doğrudan GSK-3 β inhibisyonu üzerinden Alzheimer patogenezi ile ilişkilendirildiğine dair mevcut literatür olmayışdır. Ayrıca *Salvia fruticosa* ülkemizde, tıbbi adaçayı olarak da bilinen *Salvia officinalis* yerine sıklıkla kullanılmaktadır.

Salvia türleri dünya üzerinde 1000 den fazla yayılış gösteren tür sayısıyla Lamiaceae familyasının en zengin üyelerinden biridir. Son kayıtlarla birlikte bu cins 51' i endemik olmak üzere Türkiye' de 97 türle temsil edilmektedir. Bu sayı birçok komşu ülkeden ve Avrupa' nın tamamından daha fazla türe sahip olduğumuzu göstermektedir (15). Son yıllarda yapılan çalışmalarda bu türlerin tamamı asetilkolinesteraz aktivite yönünden incelenmiş ve bazı türlerin yüksek etkiler gösterdiği bulunmuş ve bu bitkilerin aktivitelerinin yüksek polifenolik, özellikle fenolik asitlerce zengin içeriklerinden dolayı olduğu da düşünülmüştür (20,30,31,40). *Salvia* türleri halk arasında soğuk algınlığının, boğaz, karın ağrıların, menstrual bozuklukların tedavisinde, antimalaryal, dezenfektan, pürgatif ve şeker düşürücü olarak kullanılmaktadır. Ayrıca cins üzerinde yapılan farmakolojik aktivite çalışmalarında

bitkinin, ekstrelerinin, uçucu yağlarının ya da içerdiği bileşiklerin, hipoglisemik, antiseptik, antioksidan, immunomodülatör, antifungal, sitotoksik, platelet agregasyonunu inibe edici, antiasetilkolinesteraz ve halüsinojenik etkilerinin olduğu gösterilmiştir. Bitki üzerinde yapılan fitokimyasal çalışmalarda bugüne kadar özellikle abietan ve neoklerodan tip diterpenler, oleanan, ursan ve lupan iskeletlerine sahip triterpenler, apigenin ve luteolin ve bunların 6-hidroksilli türevlerini içeren flavonlar, kafeik asit monomer ve dimerlerinden oluşan fenolik asitler elde edilmiştir. Bitkinin uçucu yağı üzerinde yapılan çalışmalarda en fazla tespit edilen monoterpenler; 1,8-sineol, kafur, borneol, tuyon, α ve β -pinendir (8).

Bazı *Salvia* türleri, ülkemizin ihraç ürünleri arasında yer almaktadır (3). Cinsin ülkemiz açısından ekonomik öneminin yanı sıra tür sayısının ve endemizm oranının yüksek oluşu cinsi ülkemiz açısından bir gen merkezi konumunda olmasına da neden olmaktadır. Geleneksel tıpta demans tedavisinde kullanımı olan ve son yıllarda yapılan birçok çalışmayla çeşitli mekanizmalarla nöroprotektif etkileri gösterilen *Salvia* türleri üzerinde β -amiloid ile indüklenmiş nörotoksisitede koruyucu etkilerinin olduğuna dair az sayıda çalışma bulunmaktadır ve yapılmış bu çalışmalarda bitkinin bu etkilerini GSK-3 β enziminin direkt inhibisyonuyla gösterip göstermediğiyle ilgili bir çalışma bulunmamaktadır. Yapılan çalışmalar daha çok bu enzimin ekspresyon düzeylerinin aktive olup olmaması, oluşan β -amiloid fibrillerinin destabilizasyonu ile ilişkilendirilmiştir (14).

3. DENEYSEL KISIM

3.1. Fitokimyasal Çalışmalar

3.1.1. Bitkisel Materyal

Salvia fruticosa bitkisi Temmuz 2012’de Antalya; Kemer, Küçük Burun, maki içleri, 20-30 m yükseklikten toplanmıştır. Bitki örneği, Erciyes Üniversitesi Eczacılık Fakültesi *Araştırma IX* Laboratuvarında saklanmaktadır.

Çalışmalarımızda, bitkilerin gölgede kurutulmuş çiçekli toprak üstü kısımları kullanılmıştır.

3.1.2. Kimyasal Maddeler ve Aletler

Kimyasal Katı Maddeler: Vanilin (Merck), Kafeik asit (Caffeic acid, SIGMA®, China), Klorojenik asit (Chlorogenic acid, ALDRICH®, China), Rozmarinik asit (Rosamarinic acid, ALDRICH®, USA), Ferulik asit (trans- Ferulic acid, ALDRICH®, China), 3-Hidroksi sinnamik asit (3- hydroxycinnamic acid, MERCK®, Germany), p- Kumarik asit (p- Coumaric acid, SIGMA®, UK), Gallik asit (3,4,5- Trihydroxybenzoic acid, SIGMA®, China), Vanillik asit (Vanillic acid, MERCK®, Germany), 3,5-Dihidroksibenzoik asit (3,5-Dihydroxybenzoic acid, ALDRICH®, Germany), 3,4- Dihidroksibenzoik asit (3,4-Dihydroxybenzoic acid, ABRC®), 2,3- Dihidroksibenzoik asit (2,3-Dihydroxybenzoic acid, ALDRICH®), 4- Hidroksibenzoik asit (4-Hydroxybenzoic acid, ALDRICH®, Germany), Apigenin (SIGMA®), Apigenin-7-O-Glukozit (Apigenin-7- glucoside, FLUKA®, Switzerland), Luteolin (SIGMA®, Israel), Luteolin-7-O-Glukozit (Luteolin-7- O- glucoside, SIGMA®), Kemferol (Kaempferol, SIGMA®, France), Rutin (Rutin hydrate, SIGMA®, Brazil), Kersetin (Quercetin, SIGMA®, India)

Solvanlar: Aseton, Diklorometan, Etilasetat, Kloroform, Metanol, *n*-Butanol, *n*-hekzan, Petrol Eteri, Sülfürik asit, Toluen (Merck, Carlo Erba)

Adsorbanlar: Kromatografik çalışmalarda kullanılan adsorbanlar Tablo 3. 1’ de

verilmiştir.

Tablo 3.1. Kromatografik çalışmalarda kullanılan adsorbanlar

Yöntem	Adsorban
İTK	Normal faz silika jel (Hazır aluminyum plak, Kieselgel 60 F ₂₅₄ 0,2 mm, Merck 5554) Ters faz silika jel (Hazır aluminyum plak, RP-18, 0,2 mm, Merck 5559)
KK	Normal faz silika jel (Kieselgel 60, 0,063-0,2 mm, Merck 7734) Sephadex (LH-20, Fluka)
Prep. HPLC	Ters faz silika jel (LiChroprep RP-18, 40-63 µm, Merck)
HPLC	Ters faz silika jel (Teknokroma C18 analitik kolon (250 x 4.6 mm, partikül çapı 5 µm))

Revelatör: Vanilin / H₂SO₄ (Vanilin' in derişik sülfürik asit içindeki % 1'lik çözeltisi). Püskürtmeden sonra 110°C' de birkaç dakika ısıtılır.

Solvan Sistemleri: Kromatografik çalışmalarda kullanılan solvan sistemleri Tablo 3.2.'de verilmiştir.

Tablo 3.2. Kromatografik çalışmalarda kullanılan solvan sistemleri

Solvan Sistemi	Kromatografik Yöntem
Aseton	SK
CHCl ₃	SK
CHCl ₃ - EtOAc (97 : 3 → 90 : 10)	İTK, SK
CHCl ₃ - MeOH (98 : 2)	İTK, SK
CHCl ₃ - MeOH-H ₂ O (80 : 20 : 2)	İTK, SK
CHCl ₃ - MeOH-H ₂ O (70 : 30 : 3)	İTK, SK
CHCl ₃ - MeOH-H ₂ O (61 : 32 : 7)	İTK, SK
CHCl ₃ - MeOH (100 : 0 → 0 : 100)	SK
CH ₂ Cl ₂	SK
CH ₂ Cl ₂ - EtOAc (95 : 5 → 90 : 10)	İTK, SK
EtOAc	SK
MeOH	SFK, SK
MeOH-H ₂ O (0 : 100 → 100 : 0)	Prep. HPLC, TF-İTK
Toluen	SK
Toluen - CH ₂ Cl ₂ (1 : 1)	SK

İTK: Normal faz silika jel ince tabaka kromatografisi, **Prep. HPLC:** Preparatif yüksek basınçlı sıvı kromatografisi, **SK:** Silika jel kolon kromatografisi, **SFK:** Sephadex LH-20 kolon kromatografisi, **TF-İTK:** Ters faz silika jel ince tabaka kromatografisi

Aletler:

IR Spektrofotometresi : Mattson 1000 FT-IR

UV Spektrofotometresi : Agilent 8453

Kütle Spektrometresi : Agilent 5973 EI-MS

NMR Spektrometresi	: Varian Mercury Plus 400 MHz
Liyofilizatör	: Virtis Freezemobile 6
Rotavapor	: Büchi
UV Lambası	: Camag (Tip: 29000)
Kromatografi Tankı	: Camag (cam küvet, 22 x 23 x 8 cm)

3.1.3. Kromatografik Yöntemler

İnce Tabaka Kromatografisi (İTK)

Kolon kromatografisi çalışmalarında toplanan fraksiyonların izlenmesinde ve bileşiklerin şahit maddeler ile karşılaştırılmasında, normal faz ve ters faz silika jel kaplı hazır alüminyum plaklar kullanılmıştır.

Numune Tatbiki: Numuneler bir pastör pipeti yardımıyla, plağın alt ucunun 1 cm yukarısından ve 0,6 cm aralıklarla tatbik edilmiştir. Kromatografi tankına konulan plaklar 7 - 10 cm mesafe boyunca sürüklenmiştir.

Açık Kolon Kromatografisi

Çalışmalarımızda adsorban olarak ön fraksiyonlama için silika jel, saflaştırma için silika jel ve Sephadex LH-20 kullanılmış olan açık kolon kromatografisi yönteminden yararlanılmıştır. Fraksiyonlar ön fraksiyonlamada 100' er ml, saflaştırılma aşamalarında ise 5 - 10 ml toplanmış ve kontrolleri İTK ile yapılmıştır. Aynı R_f değerine sahip olan ve revelasyon sonucunda benzer görünen fraksiyonlar bir araya toplanmıştır.

Kolonun Hazırlanması

Normal faz silika jel kolon kromatografisi (SK):

İstenilen miktarda tartılan silika jel yeterli miktarda solvan sistemi ile süspansiyon haline getirilmiştir ve karışım alt ucuna pamuk yerleştirilmiş olan cam kolona aktarılmıştır. Kolondan yeterli miktarda solvan sistemi geçirilerek adsorbanın yerleşmesi sağlanmıştır. Adsorban üzerinde 2 - 3 mm solvan kalıncaya kadar beklenmiş ve solvan sisteminde çözülmüş olan numune kolona tatbik edilmiştir.

Sephadex LH-20 kolon kromatografisi (SFK):

İstenilen miktarda tartılan Sephadex LH-20, yeterli miktarda metanol ile karıştırılmıştır. Karışım, alt ucuna pamuk yerleştirilmiş olan cam kolona doldurulmuş ve adsorban tamamen yerleşinceye kadar kolondan metanol geçirilmiştir. Adsorbanın üzerinde 1 - 2 mm solvan kalınca MeOH'da çözülen numune kolona tatbik edilmiştir.

Kolon Kromatografisi İçin Numune Tatbiki

Çözücü yardımı ile tatbik: Numune yeterli miktarda solvan/solvan sistemi içinde tamamı çözüldükten sonra, bir pastör pipeti yardımı ile kolona tatbik edilmiştir. Kolon musluğu açılarak numune adsorbana emdirilmiştir. Kolonun üzerine, adsorban yüzeyinin bozulmasını engellemek için pamuk yerleştirilmiş ve kolona yeterli miktarda solvan sistemi eklenerek elüsyona başlanmıştır.

Preparatif Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi (Prep. HPLC)

Adsorban	: LiChroprep C ₁₈ (40 - 63 µm, Merck)
Kolon	: Sepacore Hazır Doldurulmuş Kartuş
Peristaltik Pompa	: Dionex P680 HPLC Pumps
Enjektör	: Rheodyne (Loop 2 ml)
Solvan Sistemi	: MeOH - H ₂ O (% 0 - 100 MeOH)
Akış Hızı	: 5 ml/dak
Basınç	: 5 - 15 bar

Fraksiyon Hacmi : 5 - 10 ml

Fraksiyon Toplayıcı : Büchi C-660

Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografisi Çalışmaları (HPLC)

Cihaz : Agilent Technologies 1200 Series

Dedektör : UV-DAD; 280 nm, 320 nm ve 360 nm

Kolon : Ters Faz C18 kolon (Teknokroma Mediterranea Sea 18)

Solvan Sistemi : A) metanol/su/asetik asit (10:88:2, h/h/h),

: B) metanol/su/asetik asit (90:8:2, h/h/h)

: C) metanol

Akış Hızı : 1 mL/dak

Gradient : Solvent karışımı içerisinde B'nin oranı; 15 dakikada %15' e, 3 dakikada %40' a çıkar ve 12 dakika boyunca bu şekilde devam eder, 5 dakika içinde %100' e ulaştıktan sonra C'nin oranı 2 dakikada %15'e, 11 dakikada %30' a ulaşır ve ardından 2 dakikada içinde başlangıç durumuna geri döner.

Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografisi Kütle-Spektrometresi (HPLC-MS/MS)

Cihaz : Shimadzu 20A HPLC MS/MS

Dedektör : Applied Biosystems 3200 Q-Trap MS/MS

İyonlaşma Modu : Elektro Sprey İyonizasyon (ESI), negatif iyonlaşma

Kolon : GL Science Intersil ODS 4,6 x 250 mm, 5 µ

Kolon sıcaklığı 40 °C

Mobil Faz : A) metanol/su/formik asit (10:89:1, h/h/h),

: B) metanol/su/asetik asit (89:10:1, h/h/h)

Akış Hızı : 1 mL/dak

Gradient : Mobil Faz B, 30 dakika içinde 0–100%' e çıkmıştır.

3.1.4. Ekstraksiyon ve Fraksiyonlama Çalışmaları

Gölgede kurutulmuş, toz edilmiş bitkisel materyal (250 g) 2,5 L MeOH ile 37 °C’ de 8 saat süreyle 3 defa ekstre edilmiştir. Ekstreler sıcakken süzgeç kağıdından süzölmüş ve süzöntöler birleştirilmiştir. Birleştirilen süzöntöler, rotavaporda, düşük ısıda ve alçak basınç altında kuruluğa kadar yoğunlaştırılmıştır (MeOH ekstresi, 33 g, % 13,2).

Ham metanol ekstresi 250 mL suda çözüldükten sonra bir ayırma hunisine alınmış, sırasıyla PE (4 x 250 mL) ve *n*-BuOH (4 x 250 mL) ile ekstre edilmiştir. PE ve *n*-BuOH ekstreleri birleştirilerek rotavaporda, 40 °C’de ve alçak basınç altında kuruluğa kadar uçurulmuş ve liyofilize edilmiştir (*n*-BuOH ekstresi, 9 g, % 3,6; PE Ekstresi 4,1 g %1,64).

9 g *n*-BuOH ekstresi, suyla çözümlerek PA kolona tatbik edilmiştir. Elüsyonda solvan sistemi olarak H₂O:MeOH’ ın 100:0, 75:25, 50:50, 25:75, 0:100 oranlarda karışımı kullanılmıştır. Kolondan 250’er mL toplanan fraksiyonlar İTK ile kontrol edilerek 5 ana fraksiyonda (Fr. 1-5) toplanmış ve yoğunlaştırılmışlardır (Fr. 1: 500 mg, Fr. 2: 600 g, Fr. 3: 200 mg, Fr. 4: 400 mg, Fr. 5: 4,2 g).

3.2. Aktivite Çalışmaları

3.2.1. Kimyasal Maddeler ve Aletler

Kimyasal Katı Maddeler: DMSO (Dimetilsölfoksit, Lab-Scan, Poland), HEPES [(4-(2-hidroksietil) piperazin-1-etansülfonik asit); Sigma Aldrich, USA], EDTA (BioShop, Canada), EGTA (Bio Basic Canada Inc. Canada), Magnezyum asetat (BioShop, Canada), Apigenin, (Sigma Aldrich, USA), Ferulik asit, (Sigma Aldrich, USA), TDZD-8 (Sigma Aldrich, USA), SB 415286 (Sigma Aldrich, USA), Glikojen sentaz kinaz-3 β (GSK-3 β , Novus Biologicals, USA, Millipore), Fosfoglikojen sentaz peptit-2 (Millipore, USA), PMSF (fenilmetilsölfonil florid, AppliChem, Germany), EGTA (Bio Basic Canada Inc. Canada), Benzamidine (Sigma Aldrich, USA), 2-Merkaptoetanol (Merck, Germany), Sukroz (BioShop, Canada), Brij-35

(AppliChem, Germany), Tris-HCl (Multicell, Canada), NaCl (Sodyum klorür, AppliChem, Germany), NaOH (Sodyum Hidroksit, Merck, Germany). Pen/strep: (Sigma P4333)

L-glutamine (Sigma, 67513), FBS (Fetal Bovine Serum, Biochrom, cat no:S0113), Tripsin edta (Life technologies, Kat no: 25200-056), PBS (Phosphate Buffer Saline Oxoid, Kat no:BR00146).

Aletler/Ekipman

Plate Incubator	:Biosan Thermo Shaker
Microplate Reader	: Bioek Synergy HT, Gen5
Vortex	: Wise mix
Laminar Kabin	:Safe Fast Elite
-80 Buzdolabı	:New Brunswick, U570-86
Hücre Sayım Cihazı	: Cedex innovatis XS
XCelligence	: ROCHE, ACEA
CO ₂ ’ li inkübatör	: New Brunswick 170R

3.2.2. *In-vitro* GSK-3 β Aktivite Çalışmaları

Çözeltilerin Hazırlanması

İnhibitör aktivitesi denenecek olan maddeler final konsantrasyonda (Ekstre ve fraksiyonlar için; 50, 100, 250, 500 $\mu\text{g/mL}$) %1’i geçmeyecek oranda DMSO da çözülerek istenilen konsantrasyona assay buffer (analiz tampon) ile tamamlanmıştır.

Analiz tamponu; 50 mM HEPES (pH 7,5), 15 mM magnezyum asetat, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA’ dan oluşmaktadır. Enzim ise enzim tamponu (50 mM Tris/HCl (pH: 7,5), 150 mM NaCl, 0,1 mM EGTA, 0,03% Brij-35, 270 mM sukroz, 0,2 mM PMSF, 1 mM benzamidine, % 0,1 2-merkaptetanol) içinde hazırlanmıştır.

Deney Prosedürü

Salvia huberi Hedge ve *Salvia rosifolia* Sm. ekstresi, ana fraksiyonu, bu fraksiyonlardan elde edilen saf maddelerin ve daha önce yapılan çalışmalarda *Salvia* türlerinde varlığı saptanan fenolik asit ve flavonoit yapısındaki saf maddelerin GSK-3 β inhibisyon düzeyleri ölçümü Kinase-Glo Luminescent Kinase Assay (Promega) yöntemine göre gerçekleştirilmiştir.

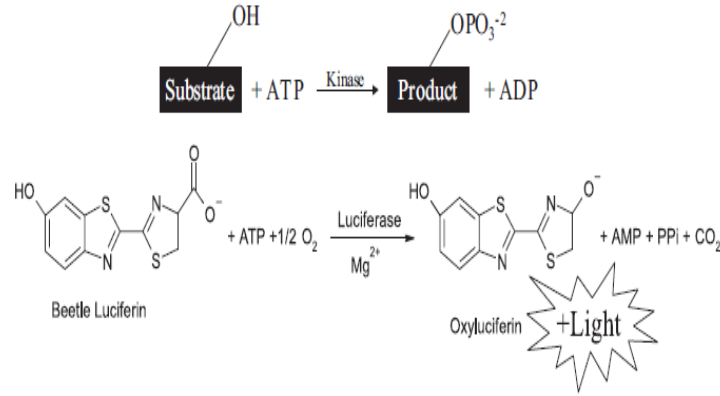


FIG. 1. Assay principle of the Kinase-Glo luminescent kinase assay.

Şekil 5. Kinaz-Glo ile GSK-3 beta aktivite ölçüm yönteminin mekanizması

Bu yönteme göre, 96'lık siyah renkli plakaların içerisine assay buffer (analiz tampon) ile hazırlanmış 10 μL test inhibitor eklendi üzerine enzim buffer(enzim tampon) ile hazırlanmış 10 μL (20 ng) GSK-3 β eklenerek inhibitör maddeyle karıştırıldı sonra assay buffer(analiz tampon) la hazırlanmış 20 μL (1 μM ATP ve 25 μM substrat) eklenerek 30 $^{\circ}\text{C}$ ' de 30 dakika inkübe edildi. 30 dakika inkübasyonun sonunda reaksiyon 40 μL Kinase-Glo reaktifi (Luciferin+Luciferaz) ilave edilerek durduruldu. 30 $^{\circ}\text{C}$ ' de 10 dakikalık inkübasyondan sonra Synergy multifonksiyonel mikropate (BioTek Instruments, Inc., Winooski, Vermont, USA) okuyucuda lüminesans değerleri okundu. Deney, inhibisyon varsa, inhibe olmadan geriye kalan GSK-3 β ' nin yeteri kadar ortama eklenen ATP ve substratı kullanması, bu reaksiyondan kalan ATP yardımı ile luciferazın, luciferini oksiluciferine çevirmesi ve oluşan ışımının ölçülmesi esasına dayanır. İnhibe olmamış enzimden geriye kalan ATP ne kadar fazla ise inhibisyon ve ışım o kadar fazladır.

Hesaplar

Negatif kontrol olarak standart GSK-3 β inhibitörü, pozitif kontrol olarak da herhangi bir inhibitör madde taşımayan test çözeltisi kullanıldı ve % inhibisyon değeri, aşağıdaki formülle hesaplandı.

% inhibisyon= 100 x (inhibitör test çözeltisinin lüminesansı- ortalama pozitif kontrol lüminesansı)/(ortalama negatif kontrol lüminesansı- ortalama pozitif kontrol lüminesansı)

Tüm test çözeltileri en az iki bağımsız denemede her konsantrasyon için üç defa tekrarlanarak hesaplandı.

3.2.3. Hücre Kültür Deneyleri

3.2.3.1. Hücrelerin çoğaltılması ve Genel Hücre Kültür Uygulama Prosedürü

Çalışmada SH-SY5Y (Human Neuroblastoma Cell, ATCC No: CRL-2266) hücreleri DMEM-F12 besi yerinde çoğaltılarak, ekstre ve saf maddelerin SH-SY5Y nöroblastoma hücrelerinde hücre canlılığı üzerine etkileri (SRB yöntemi) ile belirlendi.

50 mL Besiyeri Hazırlamak için

- %5 Penisilin/streptomisin → 0,5 mL
- %10 Fetal Bovine serum (inaktive)* → 5 mL
- L-glutamin → 0,5 mL
- DMEM-F12 → 44 mL

*FBS inaktive etmek için

- Su banyosu 37 °C'ye ısıtılır. -20°C'deki Fetal Bovine serum 37 °C'de eridikten sonra 56 °C'ye ısı yükseltilir. Yarım saat bekletilir. Ve 10 mL' lik hacimlerde falkon tüplerine ayrılarak -20 °C' de muhafaza edilir.
- Bu işlemi yapmamızın amacı zararlı proteinleri ısıyla inaktive etmektir.

Hücreleri, dondurma, donmuş hücreleri çözme, yıkama işlemleri

Hücre çözme (Cryodan çözme) ve Flaska alma

- Hücreler -80 °C'den alınıp +37 °C' de çözünmeleri sağlanır.
- Hücreler PBS içeren tüpe alınır ve birkaç kez pipetaj yapılır [1mL cryo (freezing medium) için 10 mL PBS]
- 1000 rpm' de 5 dk +20 °C' de santrifüj edilir.
- Pellet (hücre) kısmı alınıp süpernatant atılır.
- Pellet hazırlanan besi yerinin 1 mL' sinde süspande edilerek, flaska alınır, üzeri flaskın büyüklüğüne göre taze besi yeri ile tamamlanıp inkübatöre koyulur.

Yıkama işlemi (PASAJ)

Yapışan karakterdeki SHSY-5Y hücreleri için aşağıdaki işlemler sırasıyla uygulanır.

- Yıkama işlemi için önce flaskın içindeki eski besi yeri atılır.
- Kabın içine yaklaşık 5 mL PBS koyulur. PBS ile hücreler tekrar yıkanır ve PBS atılır. (Tüm proteinleri uzaklaştırmak için)
- Bu işlem esnasında flaskın hücrelerin yapışık olduğu tarafı fazla zedelenmemelidir.
- Flastaki hücrelerin üzerine yapışan hücre olduğu için, hücreleri kaldırmak için 3-5 mL Tripsin edta koyulur ve 37 °C' lik CO₂' li etüvde 3-4 dk bekletilir.
- Bu işlem sonunda hücreler kalkmamışsa hücre kültür kabının kenarına kuvvetlice vurulur.
- 5 dk yı geçirmeden hücre kültür kabının tripsin-edta miktarının iki katı kadar yaklaşık 10 mL taze besi yeri eklenir (Tripsini bloke etmek için)
- Bu karışım santrifüj tüpüne alınıp 1500 rpm' de oda ısısında 5 dk santrifüj edilir.
- Üst kısım uzaklaştırılarak pelleti taze besi yerinde çözülür, kültür kabına alınarak etüve koyulur.

- Yapışan hücrelerde devamlı tripsinize etme işlemine gerek yoktur. Hücreler kabın tabanını tamamen kaplamamışsa eski besi yeri uzaklaştırılıp yerine taze besi yeri koyulur.
- Eğer hücreler çok çoğalmışsa tripsinle kaldırıp iki ayrı kültür kabına alınabilir ya da yarısı dondurularak kaldırılır.

Hücre sayımı

- 1 mL besi yerinde süspande edilmiş hücreden 20 μ L alarak 2 mL' lik ependorf tüpüne pipetlenir.
- 20 μ L tripan mavisi ilave edilir (1/1 seyreltme)
- Buradan da 10 μ L alınarak hücre sayım cihazının lamellerine koyularak hücre sayılabilir.
- Cihazın yaptığı sayım bize mL' de hücre sayısını verir. Burada dikkat edilmesi gereken çok sayıda pipetaj yapılması ve olası agregasyonun en aza indirilmesidir. Cihaz tüm hücre sayısını ve canlı hücre sayılarını ayrı ayrı verir. Hesaplama yapmak için canlı hücre sayısı kullanılmalıdır. Hesaplama aşağıdaki şekilde yapılır.

1 well 12500

110 well 110 x 12500

Toplamda 1375000 hücre 100 μ L * 110 kuyu= 11 mL de süspande edilir ve her kuyuya 100 μ L pipetlenir.

1mL' de X adet Hücre varsa; (X= cihazda sayılan hücre sayısı)

A mL' de 1 375 000 hücre vardır.

PBS (phosphate buffer saline-fosfat tamponu) pH= 7.4

4 ticari PBS tableti 400 mL distile su ile mavi kapaklı sterilizasyon şişesinde çözülüp, şişenin kapağı alüminyum ile kaplanarak sterilize edilir.

Elimizde tampon tabletlerinden yoksa aşağıdaki kimyasallarla da tampon çözelti hazırlanabilir.

<u>İçeriği</u>	<u>Tartılan miktar (g) (500mL)</u>	<u>1000 mL</u>
136 mM NaCl→(Ma: 58.443)	3,97	7,94
2 mM KCl → (Ma: 74,555)	0,075	0,15
8 mM Na ₂ HPO ₄ H ₂ O → (Ma: 177,99)	0,71	1,42
1,5 mM KH ₂ PO ₄ →(Ma: 136,09)	0,102	0,204

- Hazırlanan çözelti distile su ile 500 mL' ye tamamlanır. pH metrede balık yardımıyla karıştırılarak homojen hale getirilir.
- Çözeltinin pH' sın 7,4' e ayarlamak için hazırlanan çözelti bazıkse→ HCl asidikse→ NaOH ile pH 7,4'e ayarlanır.
- Hazırlanan tampon çözeltisi otoklavda 121 °C' de 20 dk sterilize edilir.
- **Hazırlanan 50 mL PBS' nin içerisine 1,5 mL penisilin/strep. koyulur ve hücre yıkama çözeltisi olarak kullanılır.**

10 ml PBS'ye → 300 µL pen/strep

Hücre dondurma cryo çözeltisi

- Hücreler santrifüj edildikten sonra süpernatant atılır.
- Hücreler 950 µL besiyeri (%10 FBS ve penisilin-streptomisin ilaveli) ile süspande edilerek, steril ependorf tüpüne aktarılır üzerine 50 µL %100 lük DMSO çözeltisi eklenir (final % 5 DMSO) ve -80 °C' de dondurulur.

3.2.3.2. SRB Yöntemiyle Toksik Olmayan Doz Belirleme Çalışmaları

SRB Prosedürü

SRB: Sulphorhodamine B (Santa cruz, SC253615A)

Çalışmadan 24 saat önce flastaki hücreler sayılarak 96 well plakalara ekim yapıldı. Kuyucuk başına 100 μL ' de 12 500 hücre olacak şekilde ekim yapılır.

- 24 saat sonunda plakalara yapışmış olan hücrelerin üstündeki besi yerleri atıldı ve hazırlanan ekstre konsantrasyonlarından 100 μL alınarak düşük konsantrasyondan yükseğe doğru plakalara eklendi.
- İnkübasyon süresi (24 saat) sonunda +4 °C TCA (trikloro asetik asit) kuyucuklardaki final konsantrasyonu %10 olacak şekilde eklendi.
- 1 saat +4 °C' de bekletildi.
- Kuyuların içeriği uzaklaştırıldı ve 5 defa deiyonize su ile yıkandı.
- Kuyular kurutulduktan sonra %1 asetik asit içinde hazırlanmış % 0,4 SRB boyası kuyulara 50 μL eklendi.
- 30 dk oda sıcaklığında bekletildi
- Kuyuların içeriği uzaklaştırıldı ve 5 defa %1 asetik asit çözeltisi ile yıkandı
- Kuyular kurutulduktan sonra 10 nM Tris bazı 100 μL eklendi.
- 5 dk çalkalayıcıda çalkalandıktan sonra 492 nM' de absorban ölçüldü.

3.2.3.3. SHSY-5Y hücrelerini Amiloit beta (1-42) toksisitesinden koruyucu etkinin gerçek zamanlı hücre analiz cihazı ile ölçülmesi

Gerçek zamanlı hücre analizi çalışmaları

SRB yönteminde yapılan ekim ve dozlama işlemleri Xcelligence analizinde de yapılır. Tek fark kullanılan 96 lık plate lerin impedans ölçümüne olanak veren bir yapıda olmasıdır. Bu test ile uygulanan maddelerin hücre canlılığı üzerine yaptıkları etki gerçek zamanlı olarak izlenecektir.

Xcelligence, gerçek zamanlı olarak hücre yaşayabilirliğini ölçümüne olanak veren bir protokoldür. Bu test ile hücre kültürü ortamında uygulanan maddelerin zamana bağlı hücre

canlılığı üzerine etkileri incelenebilmektedir. E- plate cihaza yerleştirildikten sonra deney başlatılır ve belirlenen periyotta (minimum 1 dakika) cell indeks hesaplayarak hücre canlılığını anlık olarak bilgisayara aktarır ve hücre profilleri elde edilir. Cihaz yazılımı sayesinde hücrelerin yarısını öldüren inhibitör doz IC_{50} 'yi istenilen saatte veya saat aralığında hesaplar.

Hücre ekimi ve etken madde uygulamaları SRB yönteminde yapıldığı gibi yapılır. İki deney arasındaki fark;

- 96 lık altın plate (e-plate) kullanılır
- Ekim işlemi yapıldıktan sonra plate şekilde görülen cihaza bağlanarak inkübatöre yerleştirilir.
- Canlılık analizi cihazın yazılımı aracılığıyla belirlenen periyotta ölçülür.



Resim 2. Xcelligence sistemi

A β (1-42) toksisitesinin gerçek zamanlı hücre analiz cihazı ile profillenmesi;

A β (1-42) oligomeri hazırlanışı

A β (1-42) (anaspec AS-20276-5) sırasıyla 80 μ L NH₄OH ve hemen ardından 420 μ L PBS (fosfat tamponu) süspande edilir ve pipetleme yapılır. Ardından 500 μ L besiyeri eklenerek pipetaj yapılır. 4 $^{\circ}$ C de 24 saat bekletilerek A β oligomeri oluşturulur.

Hesaplamalar;

1 L	1 M A β (1-42)	4514,04 g (MA)
1 L	1 mM A β (1-42)	4514,04 mg
1 mL	0,22 mM A β (1-42)	1 mg

Böylece 1 mg katı halde gelen A β (1-42) dan 220 μ M lık 1 mL stok hazırlanmış olur.

Uygulama

Xcelligence, gerçek zamanlı olarak hücre canlılığı ölçümüne olanak veren bir protokoldür. Bu test ile hücre kültürü ortamında uygulanan maddelerin zamana bağlı hücre canlılığı üzerine etkileri incelenebilmektedir. E- plate cihaza yerleştirildikten sonra deney başlatılır ve belirlenen periyotta (minimum 1 dakika) cell indeks hesaplayarak hücre canlılığını anlık olarak bilgisayara aktarılır ve hücre profilleri elde edilir.

Xcelligence gerçek zamanlı hücre analiz cihazı ile A β (1-42) oligomerlerinin hücre büyümesi ve çoğalmasına etkisi profillenmiştir.

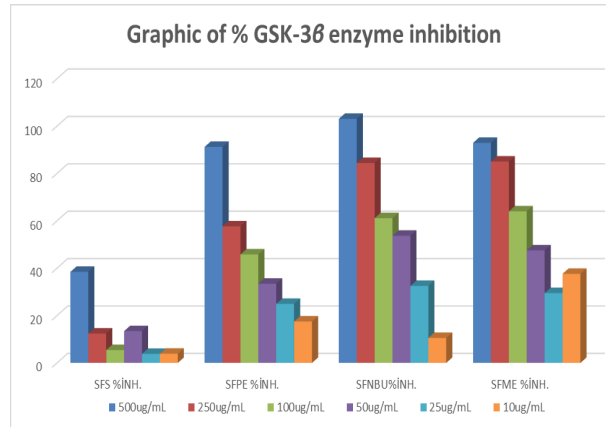
96 lık altın plate' in her kuyusuna 12 500/ 100 μ L SHSY 5Y nöroblastoma hücresi gelecek şekilde pipetlenmiştir. Besi yeri olarak L-glutamin ve penisilin-streptomisin ile zenginleştirilmiş DMEM-F12 kullanılmıştır. Gruplar: [C, C+22 μ M A β , SFNBU-FR5, SFINF (10, 50, 100, 250 μ g/mL), Rozmarinik asit (50, 100 μ M), SB 216763(5 μ M)]. Her grup 3 tekrarlı çalışılmıştır ve 48 saat srmştir.

4. BULGULAR

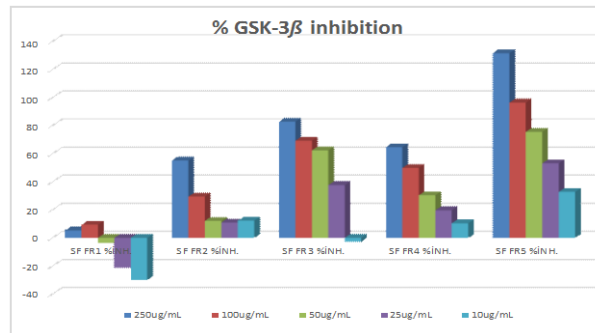
4.1. Aktivite Çalışmaları

4.1.1. *in-vitro* GSK-3 β inhibitör aktivite

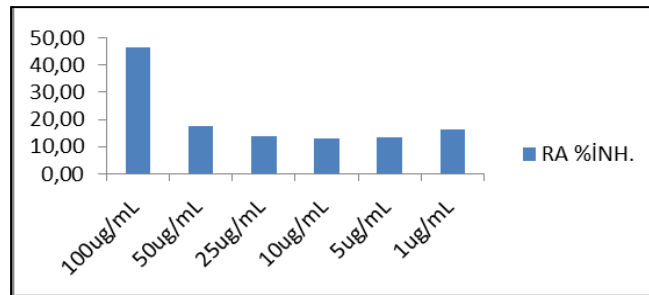
S. fruticosa ana ekstreleri ve alt fraksiyonlarına ait GSK-3 beta inhibitör aktivite çalışmalarına ait sonuçlar aşağıdaki grafiklerde verilmiştir.



Şekil 6. *Salvia fruticosa*' dan hazırlanan ekstrelerin GSK-3 β inhibitör aktiviteleri (%)



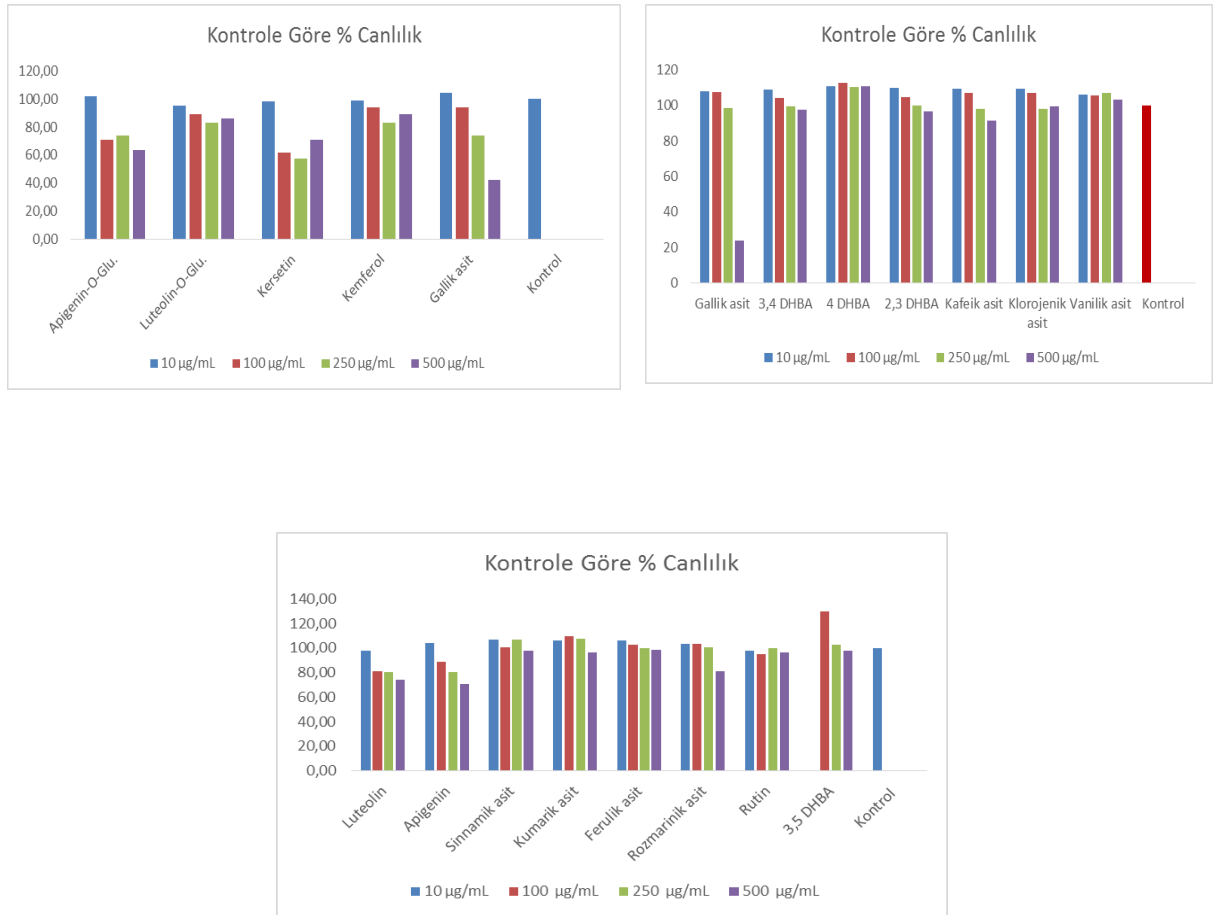
Şekil 7. *Salvia fruticosa*' dan hazırlanan n-BuOH ekstresinin ana fraksiyonlarının GSK-3 β inhibitör aktiviteleri (%)



Şekil 8. Rozmarinik Asit' in % GSK-3 β enzim inhibitör etkisi

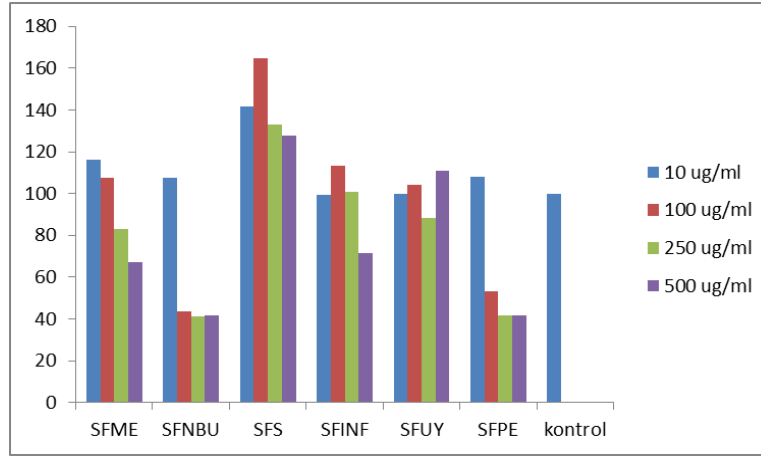
4.1.2. SRB yöntemiyle toksik olmayan doz belirleme çalışmaları

Bu deneyler sonucunda toksik olmayan ekstreler ve bu ekstrelerin amiloid beta toksisitesindeki koruyucu rollerinin araştırılmasında kullanılacak dozları belirlendi. Canlılık testleri için ekstreler 10, 100, 250, 500 $\mu\text{g/mL}$ olmak üzere 4 farklı konsantrasyonda hazırlandı. HPLC çalışmalarında standart olarak kullanılan saf maddeler ise 10, 100, 250, 500 μM dozlarında çalışıldı. Saf maddelerle gerçekleştirilen canlılık deneyleri sonucunda gallik asitin doza bağımlı olarak toksisitesinin arttığı ancak diğer saf maddelerin kullanılan dozlarda herhangi bir sitotoksik etkisinin olmadığı belirlendi. (Standart saf maddelerin çeşitli konsantrasyonlarına ait % Canlılık Grafikleri aşağıda verilmiştir.)



Şekil 9,10,11. Standart maddelerin SRB yöntemine göre belirlenmiş % canlılık üzerine etkileri

Ekstrelerle gerçekleştirilen canlılık deneylerinde *Salvia fruticosa*'da petrol eteri ve N-butanol ekstralarının doza bağımlı olarak toksisitesinin arttığı, sulu ekstre ve metanol ekstralarının ise çalışılan dozlarda herhangi bir sitotoksik etki göstermediği bulundu. Bu çalışmalar sonucunda sulu ekstre ve metanol ekstralarının her dozu, petrol eteri ve butanol ekstralarının ise 100 µg/mL'yi geçmeyen dozlarının amiloid beta toksisitesindeki koruyucu rollerini araştırmak üzere bundan sonraki deneylerde kullanılabileceği sonucuna varıldı.



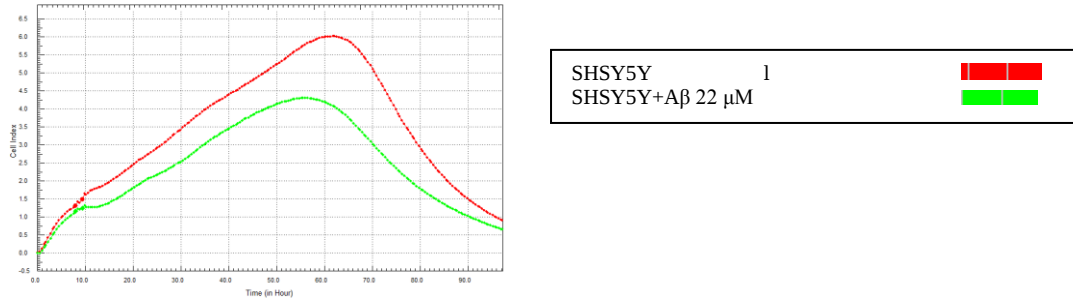
Şekil 12. *S. fruticosa* ekstralarının SRB yöntemine göre belirlenmiş % canlılık üzerine etkileri

Sonuç olarak *Salvia fruticosa* ile hazırlanan ekstralarının farklı dozlarda GSK-3 beta enzimi üzerinde inhibisyon derecelerine bakıldığında en düşük dozda (10 µg/mL) en yüksek inhibisyonun MeOH ve n-BuOH ekstralarında olduğu görülmüştür. Saf maddelerden ise gallik asit, rosmarinik asit, klorojenik asit ve DHBA ile gerçekleştirilen deneylerde %70-%100 oranında inhibisyon gözlenmiştir. HPLC analizlerine göre de düşük dozda enzim inhibisyonunun en yüksek olduğu bu ekstralarda rosmarinik asit miktarının fazla olduğu bulunmuştur. Bu nedenle ekstradaki inhibitör etkinin rosmarinik asitten kaynaklandığı sonucuna varılabilir. O nedenle proje önerisinde de belirtildiği üzere ilk aşamada etkili ekstre ve saf maddeler tespit edilmiş olup, bu ekstre ve maddelerin amiloid beta toksisitesi üzerinde

hücrelerdeki koruyucu etkileri denenmiştir. Hücre kültür çalışmalarına geçilmeden önce de tüm ekstre ve saf maddelerin kullanılacak non-toksik dozları SRB yöntemiyle belirlenmiştir.

4.1.3. SHSY-5Y hücrelerini Amiloit beta (1-42) toksisitesinden koruyucu etkinin gerçek zamanlı hücre analiz cihazı ile ölçülmesi

Ekstre ya da maddelerin etkilerine bakılmadan önce nöroblastoma hücreleri ve 22 μM $A\beta$ (1-42) ile muamele edilen nöroblastoma hücrelerinin gerçek zamanlı büyüme profilleri (zamana karşı cell indisi) ortaya koyulmuştur. Aşağıda belirtilen grafikte yeşil renkte olan profil 22 μM amiloit beta ile muamele edilen hücreleri, kırmızı renkte olan ise sadece besi yeri eklenen nöroblastoma hücrelerini göstermektedir.

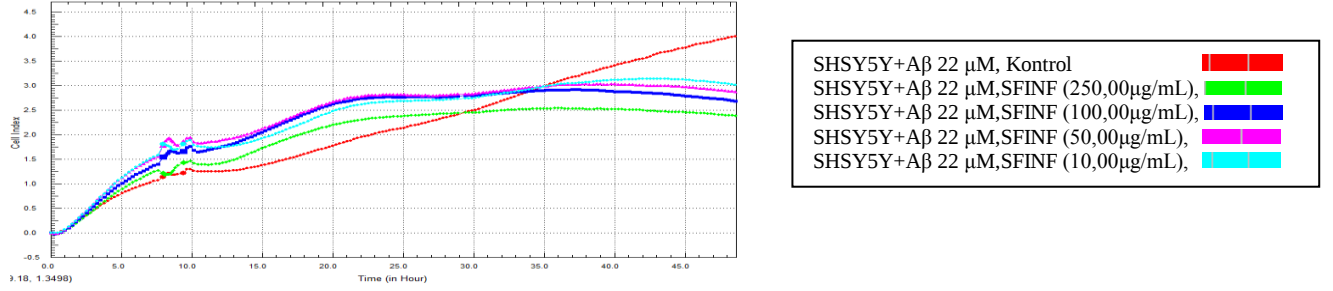


Şekil 13. $A\beta$ (1-42) muamele edilmiş ve edilmemiş hücrelerin büyüme profilleri

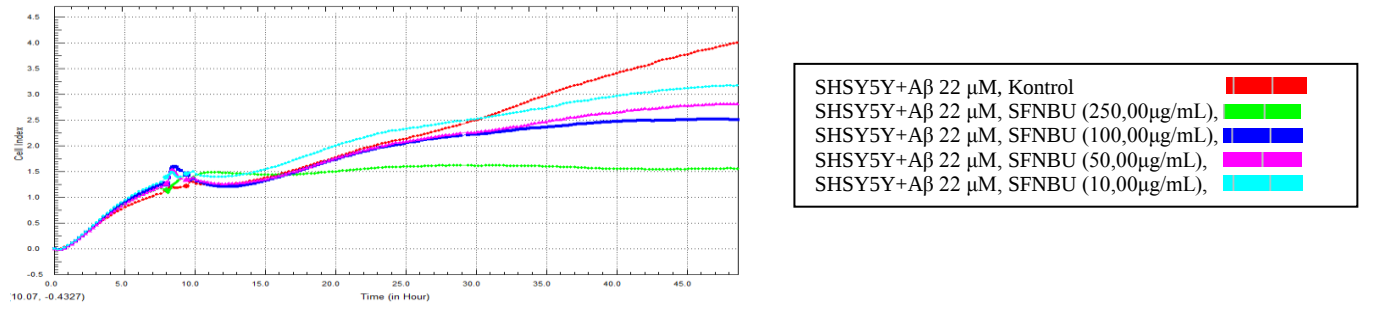
Görüldüğü gibi amiloit beta hücrelerin büyüme eğrisini negatif etkilemiş, cell indeks 60. saatlerde amiloit beta uygulanan hücrelerde 4 civarında iken, amiloit beta uygulanmayan hücrelerde 6 civarındadır.

Daha sonrasında nöroblastoma hücreleri ve amiloit beta ile muamele edilen nöroblastoma hücrelerine ekstreler ve aktif fraksiyon olan FR5 ilave edilerek hücreler üzerindeki koruyucu etkileri araştırılmıştır (Şekil 14, 15, 16). Aşağıdaki grafikte *S. fruticosa* infüzyonunun, n-buOH ekstresinin ve GSK-3 β etkinliği en yüksek olan FR5' in değişen konsantrasyonlarda 22 μM $A\beta$ ile muamele edilen SHSY-5Y nöronları üzerine etkileri görülmektedir. Şekil 17' de görüldüğü gibi Amiloit beta toksisitesine karşı rozmarinik asit ve FR5 in cell indeksi amiloit

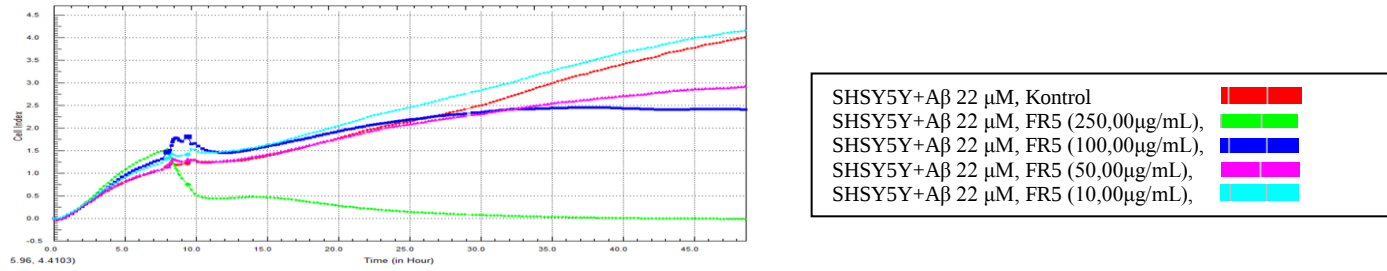
beta kontrolünün üzerine çıkmıştır. Bu etki amiloit beta toksisitesinden koruyucu olabilecekleri anlamına gelmektedir.



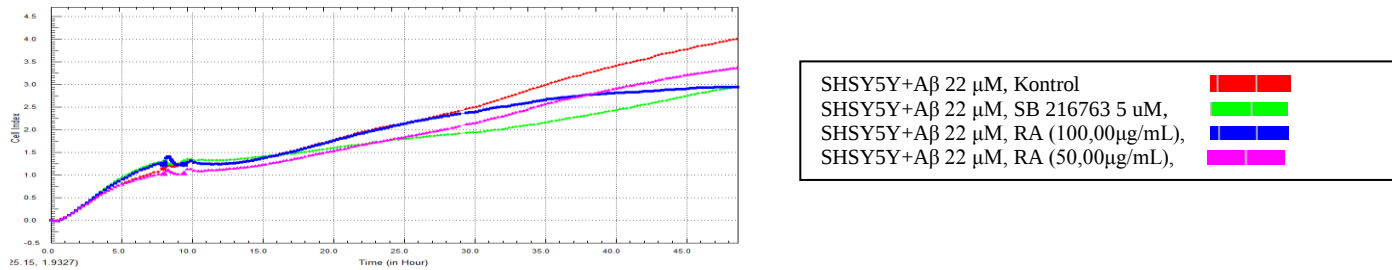
Şekil 14. *S. fruticosa* infüzyonunun $A\beta$ 22 μ M ile muamele edilmiş hücreler üzerine etkisi



Şekil 15. n-BuOH ekstresinin $A\beta$ 22 μ M ile muamele edilmiş hücreler üzerine etkisi



Şekil 16. FR5' in $A\beta$ 22 μ M ile muamele edilmiş hücreler üzerine etkisi

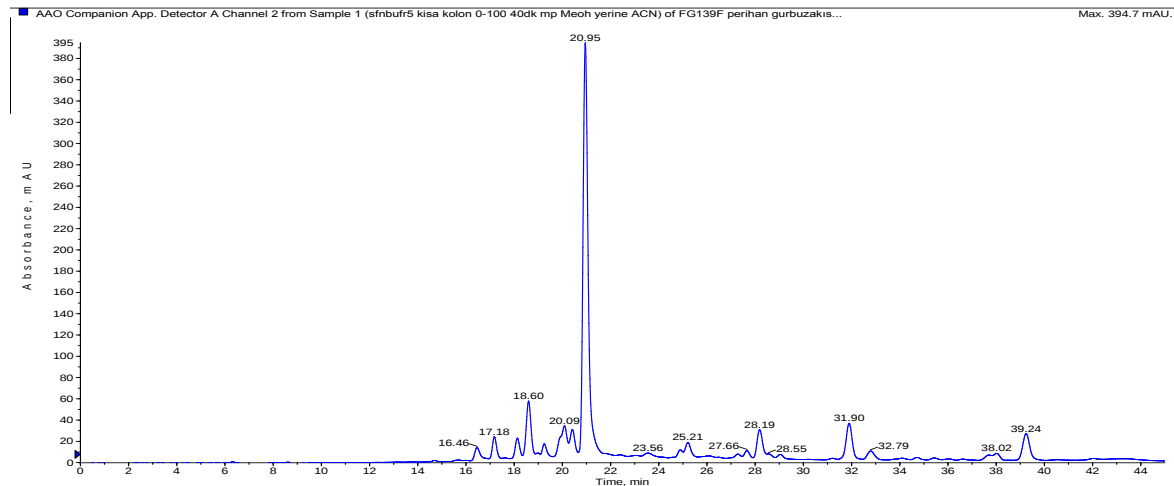


Şekil 17. Rozmarinik asit, SB 216763 bileşiklerinin $A\beta$ 22 μ M ile muamele edilmiş hücreler üzerine etkisi

4.2. Kromatografik Çalışmalar

4.2.1. HPLC ve LC-MS/MS çalışmaları

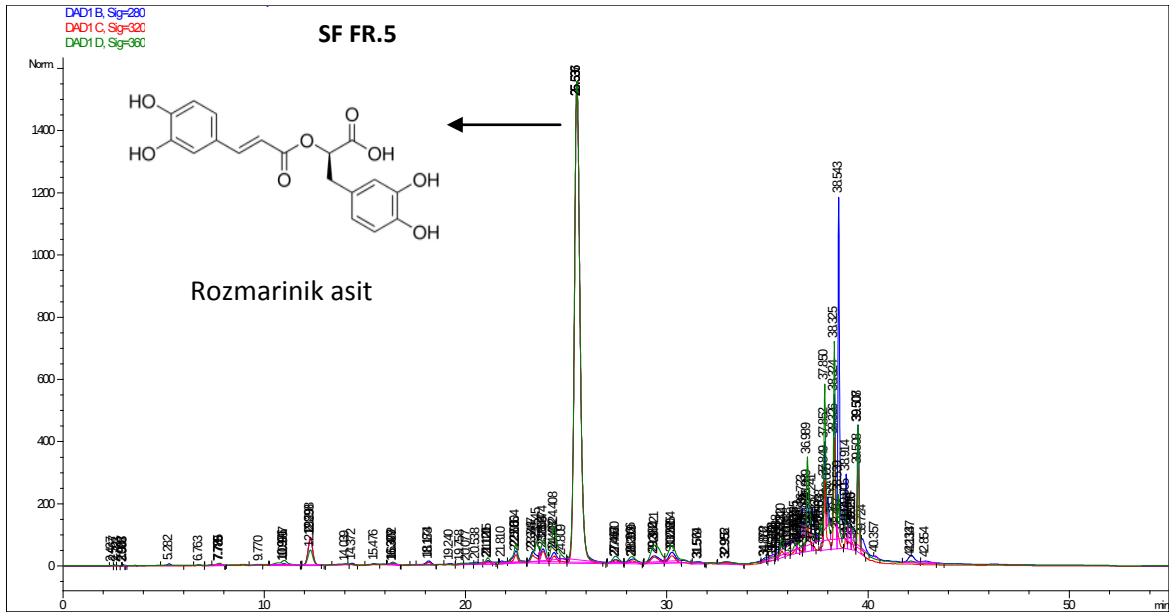
Kromatografik çalışmalarda her iki aktivite testinde en yüksek aktiviteye sahip olan FR5' in içeriği HPLC ve LC-MS/MS çalışmaları ile tespit edilmiştir. Ayrıca fraksiyon üzerinde izolasyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Buna göre hem HPLC hem LC-MS/MS çalışmalarında en fazla miktarda olan maddenin rozmarinik asit olduğu tespit edilmiştir. Diğer fraksiyonların da içerik analizleri gerçekleştirilmiş ve aktivitenin fraksiyonların içerdiği rozmarinik asit miktarıyla doğru orantılı olarak arttığı belirlenmiştir. LC analizine göre fraksiyonun içerdiği diğer maddeler aşağıda verilmiştir.



Şekil 18. FR5' in LC-MS/MS Kromatogramı

Tablo 4.1. FR5' in LC-MS/MS kromatogramına göre içerdiği maddeler

Rt	Madde*	Rt	Madde*
16.4	Kafeik asit ve dihidroksi kumarin	20.09	Apigenin glukronit
16.7	Luteolin/kamferol rutinozit	20.66	Rozmarinik asit
17.8	Luteolin /kamferol glikozit	27.7	300 ma'lı bir metoksiflavanoit (diosmetin, kamferid, pratensein, farresol, hispidulin vb.)
18.3	Rhamnetin/isorhamnetin glukozit	28.1	Cirsiliol
18.5	Luteolin/ kamferol glukronit	31.9	Cirsimaritin
18.6	Diosmin/neodiosmin	39.2	Hydroxy-tetramethoxyflavone
* www.scbt.com/datasheet-203022-daphnetin.html			



Şekil 19. FR5' in HPLC Kromatogramı

Tablo 4.2. FR5' in HPLC kromatogramına göre içerdiği maddeler ve miktarları

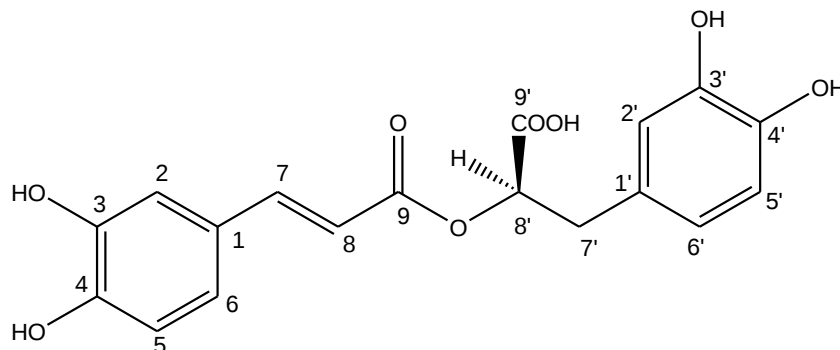
SFNBU FR.5 (µg/g ekstre)		
Flavonoitler	Lut-7-O-glu	58,13 ± 4,09
	Api 7-O-glu	60,25 ± 2,41
Hydroksisinnamik asitler	Kafeik Asit	58,75 ± 0,75
	Rozmarinik asit	3138,54 ± 37,51

4.2.2. İzolasyon ve yapı tayin çalışmaları

Fraksiyon 5' in farklı kromatografik metodlar kullanılarak gerçekleştirilen izolasyon çalışmalarında FR5' ten birinin rozmarinik asit olduğu kesinleştirilen 3 madde izole edilmiştir. Diğer iki maddenin İTK davranışlarına bakılarak, birinin triterpen ve diğerinin de fenolik asit türevi bir madde olduğu düşünülmektedir. Maddelerin yapı tayin çalışmaları devam etmektedir. Aşağıda rozmarinik asite ait spektral bulgular yer almaktadır.

Rozmarinik Asit

(= α -O-kafeoil-3',4'-dihidroksifenilaktik asit)



$C_{18}H_{16}O_8$ (MA:360)

UV $\lambda_{maks.}$ (MeOH) nm	IR $\nu_{maks.}$ (% 1 KBr) cm^{-1}
215	1600 (C=C)
296	1680 (COOH)
321	3180-3400 (OH)

Rozmarinik Asit

Krem renkli, amorf bir toz görünümünde olan **STB-2** bileşiğinin İTK analizinde, vanilin/ H_2SO_4 reaktifi kullanılarak ısıtılması sonucunda, zamanla solan pembe bir renk gözlenmiştir. Bileşiğin UV spektrumunda ($\lambda_{maks.}$ 215 nm, 296 nm, 321 nm) görülen absorpsiyon pikleri ve IR spektrumunda gözlenen hidroksil (OH), ester karbonili, asidik karbonil gruplarına (C=O) ve aromatik halkalara ait absorpsiyon bantları iki aromatik halkalı ester yapısında bir fenolik asit varlığını göstermiştir.

EI Kütle Spektrumunda m/z 360 $[M]^{\ominus}$ moleküler iyon piki, 1H NMR spektrumu ve ^{13}C NMR spektrumu yardımıyla bileşiğin kapalı formülü $C_{18}H_{16}O_8$ olarak bulunmuştur.

Bileşiğin tüm proton ve karbon değerleri, 1D ve 2D NMR (DQF-COSY, HMQC ve HMBC) spektrumları birlikte yorumlanarak belirlenmiştir.

STB-2 bileşiğinin ^1H NMR spektrumu, fenil laktik asit bileşiğinin ^1H NMR spektrumuna benzemekle birlikte **STB-2** bileşiğinde ikinci bir aromatik yapının varlığı görülmüştür. 3-(3',4'-dihidroksifenil)-laktik asitteki 2', 5', 6' numaralı konumlardaki aromatik halkaya ait proton rezonansları, rozmarinik asitte δ_{H} 6,47 (*dd*, $J = 8/1,5$ Hz, H-6'), 6,58 (*d*, $J = 8$ Hz, H-5') ve 6,65 (*d*, $J = 1,5$ Hz, H-2')' de gözlenmiştir. δ_{H} 2,74 (*dd*, $J = 13,9/10,6$ Hz, H-7_a') ve δ_{H} 3,07 (*d*, $J = 13,9$ Hz, H-7_b') de iki proton değerindeki dublet-dublet sinyaller ve δ_{H} 4,85 (*d*, $J = 10,6$ Hz, H-8') düşünülen dihidroksi fenil laktik asit yapısını doğrulamıştır. Bu sinyallere ilave olarak 6,16 ppm (*d*, $J = 15,7$ Hz, H-8), 6,72 ppm (*d*, $J = 8$ Hz, H-5), 6,90 ppm (*d*, $J = 8$ Hz, H-6), 7,02 ppm (*s*, H-2), 7,35 ppm (*d*, $J = 15,7$ Hz, H-7)' da kafeik asite ait karakteristik piklerin de varlığı doğrulanmıştır.

^{13}C NMR spektrumunda gözlenen altı tane aromatik karbon sinyali δ_{C} 116,6 (*d*, C-5'), 117,3 (*d*, C-2'), 120,3 (*d*, C-6'), 130,5 (*s*, C-1'), 145 (*s*, C-3') ve 145, 6 (*s*, C-4')], bir karbinol sinyali [δ_{C} 76,5 (*d*, C-8')] ve bir karboksil sinyali [δ_{C} 173,6 (*s*, C-9')] ile DEPT 90 spektrumundaki δ_{C} 37,8 [*t*, C-7'] sinyali bir CH_2 grubunun varlığı düşünülen dihidroksi fenil laktik asit yapısını doğrulamıştır. Bununla birlikte spektrumda görülen: δ_{C} 115,4 (*d*, C-8), 115,7 (*d*, C-2), 116 (*d*, C-5), 121,5 (*d*, C-6), 126,2 (*s*, C-1), 144,2 (*d*, C-7), 146,6 (*s*, C-3), 149,3 (*s*, C-4) ve 166,9 (*s*, C-9).sinyalleri, yapıda esterleşmiş bir kafeik asit bulunduğuna işaret etmiştir.

STB-2'nin proton DQF-COSY spektrumunda 2,74 ppm ve 3,07 ppm' de gözlenen H₂-7' protonları ile 4,85 ppm' de gözlenen H-8' protonu arasında ve δ_{H} 6,47 (H-6') ile δ_{H} 6,58 (H-5') arasında yakın mesafe etkileşimleri görülmüştür. DQF-COSY yardımıyla ayrıca diğer spin sistemleri: H-7/H-8 ve H-5/H-6 protonları olarak saptanmıştır. Bileşiğin HMBC spektrumunda 8' protonunun, C-9, C-1' ve C-9' konumlarındaki karbon atomlarıyla uzak mesafe etkileşimleri saptanmış ve bu da bileşiğin kafeik asit kısmıyla 8' konumundan bağlanmış olduğunu doğrulamıştır.

Bileşiğin yapısında yer alan proton ve karbon sinyallerinin çözümlemelerinde kullanılan 1D ve 2D NMR analizlerine dayanarak bileşiğin kafeik asit içeren disüstitüe bir fenolik asit olduğu saptanmıştır.

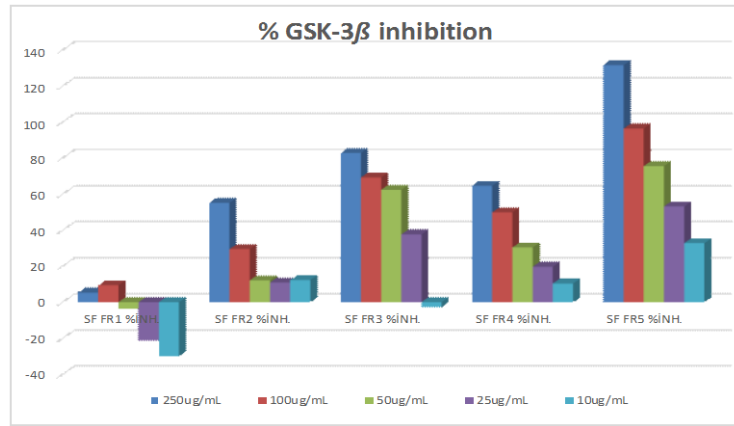
STB-2 bileşiğinin yapısı, elde edilen bulgular ve literatürde kayıtlı bulguların birlikte değerlendirilmesi sonucunda **rozmarinik asit (α -O-kafeoil-3',4'-dihidroksifenilaktik asit)** olarak aydınlatılmıştır (47,48).

Tablo 4.3. Rozmarinik Asit (**STB-2**) bileşiğinin ^{13}C (100 MHz, CD_3OD) ve ^1H (400 MHz, CD_3OD) NMR spektroskopik değerleri.

C/H	DEPT	δ_{C} (ppm)	δ_{H} (ppm), J (Hz)	HMBC (H→C)
1	C	126,2		
2	CH	115,7	7,02 s	C-3
3	C	146,0		
4	C	149,3		
5	CH	116,0	6,72 d (8)	C-1, C-3, C-4,C-6
6	CH	121,5	6,90 d (8)	
7	CH	144,2	7,35 d (15,7)	C-1, C-2, C-6, C-8, C-9
8	CH	115,4	6,16 d (15,7)	C-1, C-9
9	C	166,9		
1'	C	130,5		
2'	CH	117,3	6,65 d (1,5)	C-3'
3'	C	145,0		
4'	C	145,6		
5'	CH	116,6	6,58 d (8)	C-1', C-3', C-4'
6'	CH	120,3	6,47 dd (8/1,5)	C-2'
7'	CH ₂	37,8	2,74 dd (13,9/10,6) 3,07 d (13,9)	
8'	CH	76,5	4,85 d (10,6)	C-1', C-9, C-9'
9'	C	173,6		

enzimin %100' e yakın inhibe olduğu görülmektedir. Bunun üzerine 9 g *n*-BuOH ekstresi, suyla çözülerek PA kolona tatbik edilmiştir. Elüsyonda solvan sistemi olarak H₂O:MeOH' ın 100:0, 75:25, 50:50, 25:75, 0:100 oranlarda karışımı kullanılmıştır. Kolondan 250'er mL toplanan fraksiyonlar İTK ile kontrol edilerek 5 ana fraksiyonda (Fr. 1-5) toplanmış ve yoğunlaştırılmışlardır (Fr. 1: 500 mg, Fr. 2: 600 g, Fr. 3: 200 mg, Fr. 4: 400 mg, Fr. 5: 4,2 g).

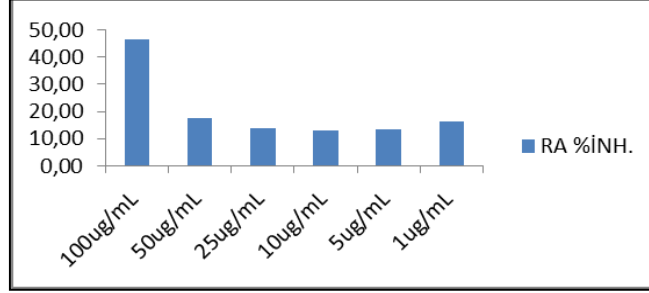
Elde edilen fraksiyonlar tekrar in-vitro GSK-3 β aktivite testlerine tabi tutulmuştur. Fraksiyonlara ait sonuçlar aşağıda verilmiştir.



Şekil 7. *Salvia fruticosa*' dan hazırlanan *n*-BuOH ekstresinin ana fraksiyonlarının GSK-3 β inhibitör aktiviteleri (%)

Grafikten de görüleceği üzere PA kolondan %100 MeOH ile elüe edilen FR5 kullanılan en yüksek dozda enzimi tamamen inhibe etmiştir. En düşük doz olan 10 µg/mL' de dahi % 40' a varan inhibisyon görülmektedir. Bunun üzerine FR5 üzerinde kromatografik çalışmalar yürütülmüş ve içeriği HPLC, LC-MS/MS yöntemleriyle aydınlatılmış. Fraksiyonun taşıdığı major maddeler çeşitli kromatografik yöntemler kullanılarak izole edilmiştir. Fraksiyona ait HPLC ve LC-MS/MS kromatogramları aşağıda verilmiştir.

konsantrasyonda enzimi % 46 inhibe ettiği gözlenmiştir. RA' nın GSK-3 beta inhibisyon aktivitesini gösteren grafik aşağıda verilmiştir.

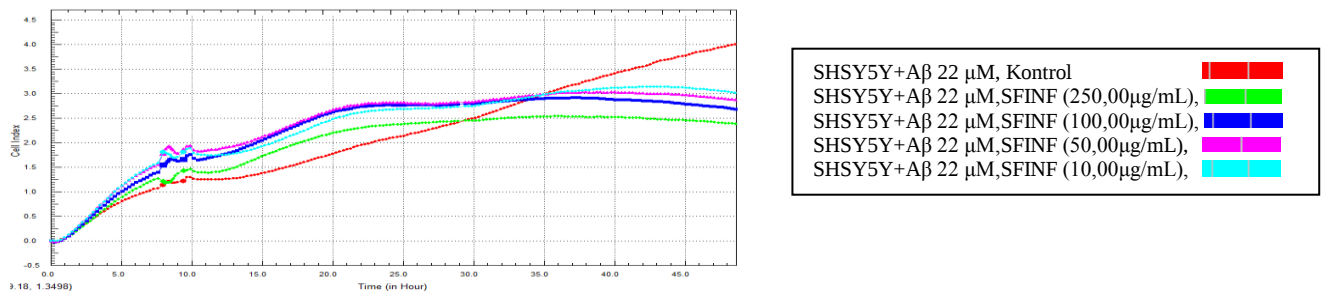


Şekil 8. Rozmarinik Asit' in % GSK-3 β enzim inhibitör etkisi

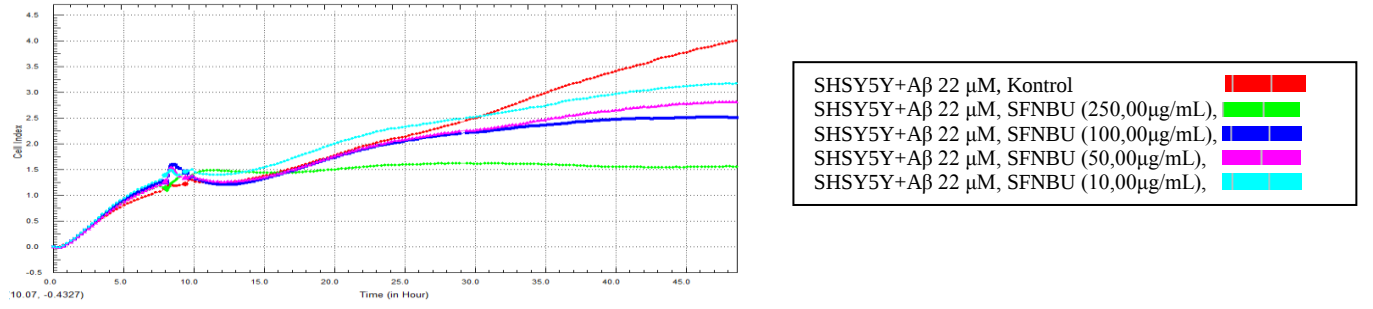
RA' nın 100 µg/mL (~277,7 µM) konsantrasyonda dahi aktivitesinin % 50' lere ulaşamaması maddeye ait IC₅₀ değerinin hesaplanmasına imkan tanımamıştır. Bu dozda ekstrelerdeki gibi yüksek etki görülmemesi, RA' nın tek başına değil birlikte bulundukları maddelerle daha yüksek etki gösterdiğini göstermiştir.

GSK-3 β deneylerinin tamamlanmasından sonra hücre kültür deneyleri gerçekleştirilmiştir. Hücre kültür deneylerinde standart saf maddeler ve ekstreler kullanılacağından öncelikle hücreler üzerinde toksisite oluşturmeyen dozlar SRB yöntemiyle belirlenmiştir. Sonrasında bu dozlardan daha düşük dozlar kullanılarak A β (1-42) kullanılarak oluşturulan toksisitede ekstre ve fraksiyonların koruyucu etkileri tam zamanlı hücre analizi yöntemiyle ölçülmüştür. Buna göre infüzyon ve n-BuOH ekstrelerine ait sonuçlar aşağıda verilmiştir.

olabilecekleri anlamına gelmektedir.

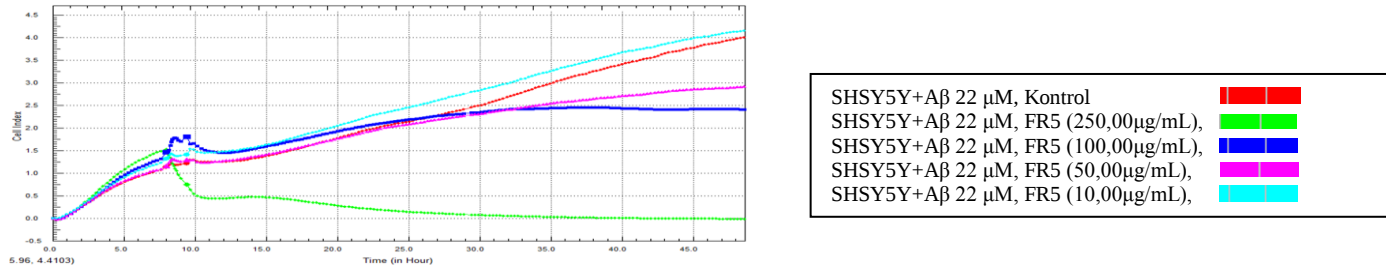


Şekil 14. *S. fruticosa* infüzyonunun A β 22 μ M ile muamele edilmiş hücreler üzerine etkisi

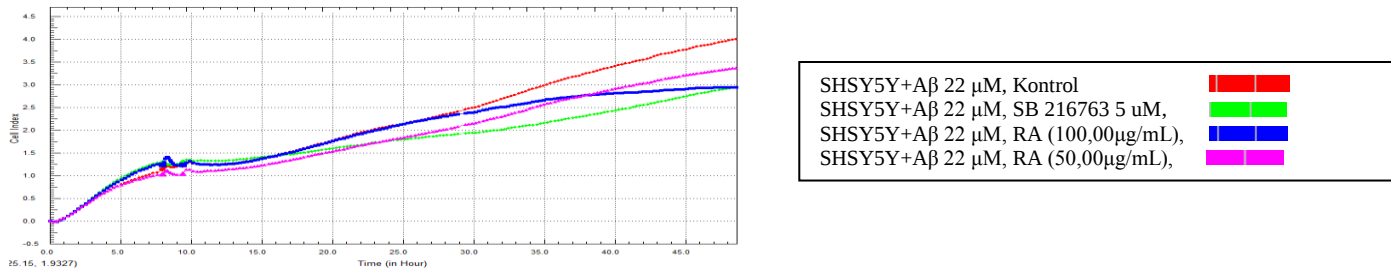


Şekil 15. n-BuOH ekstresinin A β 22 μ M ile muamele edilmiş hücreler üzerine etkisi

Bu iki grafik incelendiğinde ekstrelerin doza bağımlı etkilerinin olduğunu ve en düşük dozlarda daha etkin olduklarını söyleyebiliriz. FR5' in koruyucu etkisine bakıldığında ise (Şekil 16) 10 μ g/ mL dozda koruyucu daha yüksek konsantrasyonlarda ise toksik olduğu görülmüştür. FR5' in ana maddesi olan RA' nın tek başına etkinliği incelendiğinde ise (Şekil 17) A β (1-42) toksisitesi üzerine anlamlı bir etkinliğini olmadığını görülmektedir.



Şekil 16. FR5' in A β 22 μ M ile muamele edilmiş hücreler üzerine etkisi



Şekil 17. Rozmarinik asit, SB 216763 bileşiklerinin A β 22 μ M ile muamele edilmiş hücreler üzerine etkisi

Bu sonuçlar GSK-3 β aktivite testleriyle paralellik göstermekte ve ekstrelerde görülen aktivite fraksiyonlama ve saflaştırma ile azalmaktadır.

Ülkemizde infüzyonu şeklinde sıklıkla tüketilen bir çay olan *S. fruticosa*' nın su ekstresinin hücre kültür deneylerinde diğer ekstrelere göre daha etkili olduğu görülmüş, fakat

GSK-3 beta inhibisyon deneylerinde diğ er ekstrelerden daha az etki g sterdiğı saptanmıştır. Aynı şekilde GSK 3  inhib t r aktivitesi diğ er ekstrelerden daha yüksek olan n-BuOH ekstresi ise A  (1-42) toksisitesine karşı infüzyondan daha düşük etki göstermiştir. Bu sonuçlar bize hücre kültür denemelerinde GSK-3  inhibisyonu dışında diğ er koruyucu mekanizmaların da rol oynayabileceğini göstermiştir.

6. SONUÇ & ÖNERİLER

Bu proje çalışması kapsamında Farmakognozik açıdan incelenen *S. fruticosa* bitkisinin GSK-3 beta inhibitör etkisi araştırılmış ve bitkinin özellikle bu etkiden sorumlu bileşikleriyle diğer sekonder metabolitlerinin yapıları tayin edilmiştir. Fraksiyonlarda bileşiklerin önemli kısmını oluşturan rozmarinik asit etkiden sorumlu bileşik olarak saptanmıştır.

S. fruticosa bitkisi fenolik maddeler açısından çok zengin bulunmuştur. Bunlardan fenolik izole edilmiş ve yapıları spektroskopik yöntemlerle aydınlatılmıştır ve aydınlatılmaya devam etmektedir. HPLC ve LC-MS/MS ile tespit edilen kimyasal içeriğe bakılırsa fenolik yapıda bileşiklerin büyük bir kısmının aynı fraksiyonda toplanmış olması, *S. fruticosa* ekstre ve fraksiyonlarının uygun formülasyonları halinde Alzheimer tedavisinde yardımcı rol oynayabileceğini düşündürmüştür.

Özellikle Akdeniz ve Kıyı Ege’de geniş yayılım gösteren bu bitki zengin fenolik içeriği sebebiyle ilaç adayı moleküllerin elde edilmesinde potansiyel bir kaynak olarak düşünülebilir.

S. fruticosa bitkisi Türkiye’de de ekonomik ve endüstriyel öneme sahip bitkiler arasında olmaya aday bir türdür.

Referanslar

1. Akhondzadeh S.,Noroozian M.,Mohammadi, M.,Ohadinia S.,Jamshidi A.H., Khani M., Melissa officinalis extract in the treatment of patients with mild to moderate Alzheimer's disease: a double blind, randomised, placebo controlled trial, *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry*, 74(7), 863-66, (2003).
2. Akhondzadeh S.,Noroozian M.,Mohammadi M.,Ohadinia S.,Jamshidi A.H., Khani M., Salvia officinalis extract in the treatment of patients with mild to moderate Alzheimer's disease: a double blind, randomized and placebo-controlled trial, *Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics*, 28(1), 53-59, (2003).
3. Baytop, T., Türkiye' de Bitkiler ile Tedavi (Geçmişte ve Bugün), Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul, (1999), 142-144.
4. Brühlmann C., Marston. A., Hostettmann K., Carrupt P.A., Testa B., Screening of Non-Alkaloidal Natural Compounds as Acetylcholinesterase Inhibitors, *Chemistry & Biodiversity*, 1, 819-29, (2004).
5. Durairajan S.S.K.,Yuan Q.,Xie L.,Chan W.-S.,Kum W.-F.,Koo I.,Liu C.,Song Y.,Huang J.-D.,Klein W.L., Li M., Salvianolic acid B inhibits A β fibril formation and disaggregates preformed fibrils and protects against A β -induced cytotoxicity, *Neurochemistry International*, 52(4-5), 741-50, (2008).
6. Eckert G.P., Traditional used Plants against Cognitive Decline and Alzheimer Disease, *Frontiers in Pharmacology*, 1, 1-10, (2010).

7. Eldar-Finkelman H., Martinez A., GSK-3 inhibitors: preclinical and clinical focus on CNS, *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 4, 1-18, (2011).
8. Eser, P., *Salvia trichoclada* Benth. Üzerinde Farmakognozik Araştırmalar, (M.Sc.), Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Ankara, (2007).
9. Hamann M.,Alonso, D.,Martín-Aparicio, E.,Fuentes, A.,Pérez-Puerto, M.J.,Castro, A.,Morales, S.,Navarro, M.L.,del Monte-Millán, M.,Medina, M.,Pennaka, H.,Balaiah, A.,Peng, J.,Cook, J.,Wahyuono, S., Martínez, A., Glycogen Synthase Kinase-3 (GSK-3) Inhibitory Activity and Structure–Activity Relationship (SAR) Studies of the Manzamine Alkaloids. Potential for Alzheimer’s Disease, *Journal of Natural Products*, 70(9), 1397-405, (2007).
10. Houghton P.J., Howes M.J.R., Natural Products and Derivatives Affecting Neurotransmission Relevant to Alzheimer’s and Parkinson’s Disease, *Neurosignals*, 14(1-2), 6-22, (2005).
11. Howes M.J.R., Houghton, P.J., Plants used in Chinese and Indian traditional medicine for improvement of memory and cognitive function, *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 75(3), 513-27, (2003).
12. Howes M.J.R.,Perry N.S.L., Houghton P.J., Plants with traditional uses and activities, relevant to the management of Alzheimer's disease and other cognitive disorders, *Phytotherapy Research*, 17(1), 1-18, (2003).
13. Huang S.-H.,Lin C.-M., Chiang B.-H., Protective effects of *Angelica sinensis* extract on amyloid β -peptide-induced neurotoxicity, *Phytomedicine*, 15(9), 710-21, (2008).

14. Iuvone T., De Filippis D., Esposito G., D'Amico A., Izzo A.A., The Spice Sage and Its Active Ingredient Rosmarinic Acid Protect PC12 Cells from Amyloid- β Peptide-Induced Neurotoxicity, *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 317(3), 1143-49, (2006).
15. Kahraman A., Bagherpour S., Karabacak E., Doğan M., Doğan H. M., Uysal İ., Celep F., Reassessment of conservation status of the genus *Salvia* (Lamiaceae) in Turkey II, *Turkish journal of Botany*, 36, 1-22, (2012).
16. Kennedy D.O., Dodd F.L., Robertson B.C., Okello E.J., Reay J.L., Scholey A.B., Haskell C.F., Monoterpenoid extract of sage (*Salvia lavandulaefolia*) with cholinesterase inhibiting properties improves cognitive performance and mood in healthy adults, *Journal of Psychopharmacology*, 25(8), 1088-100, (2011).
17. Kimura T., Hayashida H., Murata M., Takamatsu J., Effect of ferulic acid and *Angelica archangelica* extract (Feruguard) on behavioral and psychological symptoms of dementia in frontotemporal lobar degeneration and dementia with Lewy bodies, *Geriatrics Gerontology International*, 11 (3), 309-14, (2011).
18. Koh S.H., Noh M.Y., Kim S.H., Amyloid-beta-induced neurotoxicity is reduced by inhibition of glycogen synthase kinase-3, *Brain Research*, 1188 (0), 254-62, (2008).
19. Koistinaho J., Malm T., Goldsteins G., Glycogen Synthase Kinase-3 β : A Mediator of Inflammation in Alzheimer's Disease?, *International Journal of Alzheimer's Disease*, 2011, 1-9, (2011).

20. Kolak U., Hacıbekiroğlu I., Öztürk M., Özgökçe F., Topçu G., Ulubelen A., Antioxidant and anticholinesterase constituents of *Salvia pocolata*, *Turkish journal of Chemistry*, 33, 813-23, (2009).
21. Lei P., Ayton S., Bush A.I., Adlard P.A., GSK-3 in Neurodegenerative Diseases, *International Journal of Alzheimer's Disease*, 2011, 1-9, (2011).
22. Lin H.Q., Ho M.T., Lau L.S., Wong K.K., Shaw P.C., Wan D.C.C., Anti-acetylcholinesterase activities of traditional Chinese medicine for treating Alzheimer's disease, *Chemico-Biological Interactions*, 175(1-3), 352-54, (2008).
23. Liu P., Hu Y., Guo D.H., Lu B.-R., Rahman K., Mu L.-H., Wang D.X., Antioxidant activity of oligosaccharide ester extracted from *Polygala tenuifolia* roots in senescence-accelerated mice, *Pharmaceutical Biology*, 48(7), 828-33, (2010).
24. Liu T., Jin H., Sun Q.R., Xu J.H., Hu H.T., The neuroprotective effects of tanshinone IIA on β -amyloid-induced toxicity in rat cortical neurons, *Neuropharmacology*, 59(7-8), 595-604, (2010).
25. Liu X., Xu K., Yan M., Wang Y., Zheng X., Protective effects of galantamine against A β -induced PC12 cell apoptosis by preventing mitochondrial dysfunction and endoplasmic reticulum stress, *Neurochemistry International*, 57(5), 588-99, (2010).
26. Martinez A., Perez D.I., GSK-3 Inhibitors: A Ray of Hope for the Treatment of Alzheimer's Disease?, *Journal of Alzheimer's Disease*, 15(2), 181-91, (2008).
27. Ming-Ke T., Zhang J.T., Salvianolic acid B inhibits fibril formation and neurotoxicity of amyloid beta-protein in vitro, *Acta Pharmacologica Sinica*, 22(4), 380-84, (2001).

28. Ono K.,Hasegawa K.,Naiki H., Yamada M., Curcumin has potent anti-amyloidogenic effects for Alzheimer's β -amyloid fibrils in vitro, *Journal of Neuroscience Research*, 75(6), 742-50, (2004).
29. Ono K.,Hirohata M., Yamada M., Ferulic acid destabilizes preformed β -amyloid fibrils in vitro, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 336(2), 444-49, (2005).
30. Orhan I.,Kartal M.,Naz Q.,Ejaz A.,Yilmaz G.,Kan Y.,Konuklugil B.,Şener B., Choudhary I.M., Antioxidant and anticholinesterase evaluation of selected Turkish Salvia species, *Food Chemistry*, 103(4), 1247-54, (2007).
31. Orhan I.E.,Senol F.S.,Ozturk N.,Akaydin G., Sener B., Profiling of in vitro neurobiological effects and phenolic acids of selected endemic Salvia species, *Food Chemistry*, 132(3), 1360-67, (2012).
32. Perez D.I.,Palomo V.,Pérez C.n.,Gil C.,Dans P.D.,Luque F.J.,Conde S., Martínez A., Switching Reversibility to Irreversibility in Glycogen Synthase Kinase 3 Inhibitors: Clues for Specific Design of New Compounds, *Journal of Medicinal Chemistry*, 54(12), 4042-56, (2011).
33. Perry N.S.L.,Bollen C.,Perry E.K., Ballard C., Salvia for dementia therapy: review of pharmacological activity and pilot tolerability clinical trial, *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 75(3), 651-59, (2003).
34. Rao K.V.,Donia M.S.,Peng J.,Garcia-Palomero E.,Alonso D.,Martinez A.,Medina M.,Franzblau S.G.,Tekwani B.L.,Khan S.I.,Wahyuono S.,Willett K.L., Hamann M.T., Manzamine B and E and Ircinal A Related Alkaloids from an Indonesian

- Acanthostrongylophora Sponge and Their Activity against Infectious, Tropical Parasitic, and Alzheimer's Diseases, *Journal of Natural Products*, 69(7), 1034-40, (2006).
35. Rhein V., Giese M., Baysang G., Meier F., Rao S., Schulz K.L., Hamburger M., Eckert A., Ginkgo Biloba Extract Ameliorates Oxidative Phosphorylation Performance and Rescues A β -Induced Failure, *PLoS ONE*, 5(8), e12359, (2010).
 36. Robinson S.R., Bishop G.M., A β as a bioflocculant: implications for the amyloid hypothesis of Alzheimer's disease, *Neurobiology of Aging*, 23(6), 1051-72, (2002).
 37. Selkoe D.J., Aging, Amyloid, and Alzheimer's Disease: A Perspective in Honor of Carl Cotman, *Neurochemical Research*, 28(11), 1705-13, (2003).
 38. Senol F.S., Woźniak S., Khan K., Hasan, M.T., Orhan E.I., Sener B., Głowniak K., An in vitro and in silico approach to cholinesterase inhibitory and antioxidant effects of the methanol extract, furanocoumarin fraction, and major coumarins of *Angelica officinalis* L. fruits, *Phytochemistry Letters*, 4(4), 462-67, (2011).
 39. Serenó L., Coma M., Rodríguez M., Sánchez-Ferrer P., Sánchez M.B., Gich I., Agulló J.M., Pérez M., Avila J., Guardia-Laguarta C., Clarimón J., Lleó A., Gómez-Isla T., A novel GSK-3 β inhibitor reduces Alzheimer's pathology and rescues neuronal loss in vivo, *Neurobiology of Disease*, 35(3), 359-67, (2009).
 40. Şenol F.S., Orhan I., Celep F., Kahraman A., Doğan M., Yılmaz G., Şener B., Survey of 55 Turkish *Salvia* taxa for their acetylcholinesterase inhibitory and antioxidant activities, *Food Chemistry*, 120(1), 34-43, (2010).

41. Takashima A.,Noguchi K.,Michel G.,Mercken M.,Hoshi M.,Ishiguro K., Imahori K., Exposure of rat hippocampal neurons to amyloid β peptide (25–35) induces the inactivation of phosphatidyl inositol-3 kinase and the activation of tau protein kinase I/glycogen synthase kinase-3 β , *Neuroscience Letters*, 203(1), 33-36, (1996).
42. Tildesley N.T.J.,Kennedy D.O.,Perry E.K.,Ballard C.G.,Savelev S.,Wesnes K.A., Scholey A.B., *Salvia lavandulaefolia* (Spanish Sage) enhances memory in healthy young volunteers, *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 75(3), 669-74, (2003).
43. Verdile G.,Fuller S.,Atwood C.S.,Laws S.M.,Gandy S.E., Martins R.N., The role of beta amyloid in Alzheimer's disease: still a cause of everything or the only one who got caught?, *Pharmacological Research*, 50(4), 397-409, (2004).
44. Zeng K.-W.,Ko H.,Yang H.O., Wang X.-M., Icariin attenuates β -amyloid-induced neurotoxicity by inhibition of tau protein hyperphosphorylation in PC12 cells, *Neuropharmacology*, 59(6), 542-50, (2010).
45. Zhang Z.,Zhao R.,Qi, J.,Wen S.,Tang Y., Wang D., Inhibition of glycogen synthase kinase-3 β by *Angelica sinensis* extract decreases β -amyloid-induced neurotoxicity and tau phosphorylation in cultured cortical neurons, *Journal of Neuroscience Research*, 89(3), 437-47, (2011).
46. Zhou Y.,Li W.,Xu L., Chen L., In *Salvia miltiorrhiza*, phenolic acids possess protective properties against amyloid β -induced cytotoxicity, and tanshinones act as acetylcholinesterase inhibitors, *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 31(3), 443-52, (2011).

47. Kelley, C. J., Harruff, R. C. ve Carmack, M. (1976). The polyphenolic acids of *Lithospermum ruderale*. II. Carbon-13 nuclear magnetic resonance of lithospermic and rosmarinic acids. *Journal of Organic Chemistry*. 41(3), 449-455.
48. Mehrabani M., Ghassemi N., Sajjadi E., Ghannadi A. ve Ardakani M. S. (2005). Main phenolic compound of petals of *Echium amoenum* Fisch. and C. A. Mey., a famous medicinal plant of Iran. *Daru*, 13(2), 65-69.
49. Baki, A., Bielik, A., Molnar, L., Szendrei, G., Keserü, G., A High Throughput Luminescent Assay for Glycogen Synthase Kinase-3 β Inhibitors, Assay and Drug Development Technologies, 5(1), 75-83, (2007).

Proje Çalışması Sonucunda Üretilen Yayınlar

1. Gürbüz P., Köngül E., Koşar M., Odabaşı B., Aycan M.B., Paşayeva L., Eroğlu D., Paksoy M., "Salvia Fruticosa Mill.' In Gsk-3 β İnhibitör Etki Gösteren Bileşiklerinin Hplc-Dad İle Analizi", BİHAT 2014-21. BİTKİSEL İLAÇ HAMMADDELERİ TOPLANTISI, NEVŞEHİR, TÜRKİYE, 28 Mayıs - 1 Haziran 2014, ss.P10-P10
2. Gürbüz P., "Hplc-Dad Analysis Of Gsk-3 β Inhibitors From Salvia Fruticosa Mill.", Natural products and Drug Discovery- Future Perspectives, Viyana , AVUSTURYA, 13-14 Kasım 2014, no.30, pp.30-30