

**β -Amiloid Peptidle İndüklenmiş Nörotoksisitede Çeşitli
Salvia Türlerinin GSK-3 β İnhibisyonu Üzerinden Koruyucu
Etkilerinin İncelenmesi**

Program Kodu: 3501

Proje No: 112S553

**Proje Yürütücüsü:
Yrd. Doç. Dr. Perihan Gürbüz**

Araştırmacı(lar):

Yrd. Doç. Dr. Mehmet Yavuz Paksoy

Danışman(lar):

Prof. Dr. L. Ömür Demirezer

Prof. Dr. Müberra Koşar

Doç. Dr. M. Betül Yerer Aycan

Bursiyer(ler):

Bilge Odabaşı

Duygu Eroğlu

Alim Hüseyin Dokumacı

Haziran 2015

KAYSERİ

ÖNSÖZ

Salvia cinsi ile ilk çalışmalarım bu cinse ait *S. trichoclada* ile Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmakognozi Anabilim Dalında, Prof. Dr. Ömür Demirezer danışmanlığında gerçekleştirdiğim yüksek lisans tezi sırasında başladı. Yüksek lisans tezimde bu türün taşıdığı Alzheimer hastalığında (AD) kullanılan ve günümüzde tek onaylı ilaç grubu olan asetilkolinesteraz enzim inhibitörü etki gösteren potansiyel ilaç etken maddeleri ve bu maddelerin radikal süpürücü etki gösterip göstermediği araştırdım. Doktora çalışmalarımı tamamladıktan sonra geldiğim Erciyes Üniversitesi Eczacılık Fakültesi'nde pratik çalışmalarımı yürütebileceğim bir laboratuvar kurma ihtiyacı doğmasıyla, fakülte imkanlarıyla kromatografik çalışmalarda kullanabileceğim küçük bir miktar sarf malzemeyi temin ettikten sonra, yeni bir proje konusu arayışına girdim. Radikal bir tedavisi bulunmayan AD için yeni potansiyel ilaç adayı molekül arayışına devam etmenin özellikle yeni başlayacağım kariyerim için iyi bir hedef oluşturduğunu düşündüm ve literatür araştırmalarımı bu yönde yoğunlaştırdım. Özellikle AD hastalığının en önemli patolojik bulgularından biri olan beta amiloit plaklarla ve oluşum mekanizmalarıyla ilgili literatürleri incelerken bu patolojinin son yıllarda yapılan çalışmalarla GSK-3 beta enziminin aktivitesiyle arttığının gözlemlendiğini gördüm. Projemi hazırlarken özellikle bu enzimin yeni ilaç geliştirilmesinde anahtar bir rolü olabileceğini ve bu enzimin aktivitesine etkileyen bileşiklerin önem taşıyabileceğini düşündüm ve hipotezimi de bu yönde geliştirdim.

Ülkemiz *Salvia* türleri için bir gen kaynağı niteliğinde olup, son kaynaklarla %53 oranında endemizm oranıyla 99 taksonun varlığı tespit edilmiştir. Bu türlerin tamamına yakını asetilkolin esteraz aktivite açısından incelenmiş; kimyasal içerikleri özellikle taşıdıkları diterpenler, uçucu yağ ve uçucu yağ bileşenleri de çeşitli çalışmalarla gösterilmiştir.

Bu çalışmalara ait literatürler, projenin hazırlanma aşamasında özellikle tür seçimi konusunda benim için önemli esin kaynağı ve yol gösterici oldu. Proje çalışmalarımız esnasında özellikle aktivite deneylerinde önceden öngöremediğimiz birçok problem yaşadık ve bu problemleri çözmek için denediğimiz metodları modifiye ederek, bu metodlara farklılıklar getirdik.

Başarı ile tamamlamış olduğumuz bu proje ile burada geliştirdiğimiz aktivite tayin yöntemlerini daha geniş ve kapsamlı bir çalışma ile Türkiye'deki tüm *Salvia*'ları, özellikle GSK-3 beta inhibitör aktivite ve beta amiloit koruyucu etkileri ve açısından incelemeyi hedefledik.

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),
Projede yer alan moleküler farmakoloji deneylerini yürütmek için büyük bir özveriyle çalışan Ecz. Bilge Odabaşı' na ve aktivite grubuna sonradan dahil olan Ecz. Alim Hüseyin Dokumacı' ya, projenin hücre hatlarının çoğaltılmasında yardımcı olan Yrd. Doç. Dr. Eren Demirpolat' a, Kromatografi çalışmalarını yürüten sevgili öğrencilerim Ecz. Leyla Paşayeva, Bio. Duygu Eroğlu ve Ecz. Esra Köngül'e,
Ekstrelerin LC-MS analizini gerçekleştiren Dr. Biol. Fatih Göğer'e (Anadolu Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmakognozi Ab. D.),
Bileşiklerin yapı tayinlerinde büyük desteğini gördüğüm Yrd. Doç. Dr. Ş. Dilem Doğan' a,
Proje çalışmalarında maddi ve manevi anlamda en büyük destek ve motivasyon kaynağım olan sevgili eşime ve oğullarıma da en içten duygularıyla teşekkür ederim.
Akademik olarak henüz yolun başında olmama rağmen bu projeyi destekleyerek, öncelikle kendime olan güvenimi kazanmamı ve projenin başarıyla tamamlanması için gerekli olan maddi desteği sağlayan TÜBİTAK' a (Proje Kodu: 112S553) ve Erciyes Üniversitesi BAP birimine (Proje Kodu: TDA-2013-4624) sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Yrd. Doç. Dr. Perihan GÜRBÜZ

İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
ÖNSÖZ	ii
İÇİNDEKİLER	iv
RESİMLER	vi
ŞEKİLLER	vi
TABLolar	vii
ÖZET	viii
ABSTRACT	ix
1. GİRİŞ	1
2. LİTERATÜR ÖZETİ	3
3. GEREÇ VE YÖNTEM	9
3.1 Fitokimyasal Çalışmalar	9
3.1.1 Bitkisel Materyal	9
3.1.2 Kimyasal Maddeler ve Aletler	9
3.1.3 Kromatografik Yöntemler	11
3.1.4 Ekstraksiyon ve Fraksiyonlama Çalışmaları	13
3.2 Aktivite Çalışmaları	14
3.2.1 Kimyasal Maddeler ve Aletler	14
3.2.2 <i>in-vitro</i> GSK-3 β Aktivite Çalışmaları	15
3.2.3 Hücre Kültür Deneyleri	16
3.2.3.1 Hücrelerin Çoğaltılması ve Genel Hücre Kültür Uygulama Prosedürü	16
3.2.3.2 SRB Yöntemiyle Toksik Olmayan Doz Belirleme Çalışmaları	18
3.2.3.3 SHSY-5Y Hücrelerini A β (1-42) Toksisitesinden Koruyucu Etkinin Ölçülmesi	19
3.2.3.4 Ekstre ve Fraksiyonların Mitokondriyal Membran Potansiyeline Etkilerinin Ölçülmesi	20
3.2.3.5 Enzim Ekspresyon Düzeylerinin Ölçülmesi	21
4. BULGULAR	25
4.1 Aktivite Çalışmaları	25
4.1.1 <i>in-vitro</i> GSK-3 β İnhibitör Aktivite	25
4.1.2 SRB Yöntemiyle Toksik Olmayan Doz Belirleme Çalışmaları	27
4.1.3 SHSY-5Y Hücrelerini A β (1-42) Toksisitesinden Koruyucu Etkileri	29
4.1.4 Ekstre ve Fraksiyonların Mitokondriyal Membran Potansiyeline Etkileri	31

4.1.5 Enzim Ekspresyon Düzeylerinin Ölçülmesi	32
4.2 Kromatografik Çalışmalar	32
4.2.1 HPLC ve LC-MS/MS Çalışmaları	32
4.2.2 İzolasyon ve Yapı Tayin Çalışmaları	34
5. TARTIŞMA & SONUÇ	36
REFERANSLAR	41

RESİMLER

		Sayfa
Resim 1.	<i>Salvia</i> ' lara ait herbaryum örnekleri	9
Resim 2.	XCelligence cihazı	19

ŞEKİLLER

		Sayfa
Şekil 1	Alzheimer Hastalığı' nın patolojik mekanizması	3
Şekil 2	GSK-3 β enziminin sarmal yapısı	4
Şekil 3	GSK-3' ün etkilediği biyolojik olaylar ve hastalıklarla ilişkisi	5
Şekil 4	Artmış GSK-3 aktivitesinin nöronlar üzerine etkisi	5
Şekil 5	Kinaz-Glo ile GSK-3 beta aktivite ölçüm yönteminin mekanizması	15
Şekil 6.	<i>Salvia huberi</i> ' den hazırlanan ekstrelerin GSK-3 β inhibitör aktiviteleri (%)	25
Şekil 7.	<i>Salvia huberi</i> ' den hazırlanan n-BuOH ekstresinin ana fraksiyonlarının GSK-3 β inhibitör aktiviteleri (%)	25
Şekil 8.	<i>Salvia rosifolia</i> ' dan hazırlanan ekstrelerin GSK-3 β inhibitör aktiviteleri (%)	26
Şekil 9.	<i>Salvia rosifolia</i> ' dan hazırlanan n-BuOH ekstresinin ana fraksiyonlarının GSK-3 β inhibitör aktiviteleri (%)	26
Şekil 10.	Rozmarinik Asitin GSK-3 β inhibitör aktiviteleri (%)	26
Şekil 11, 12, 13	Standart maddelerin SRB yöntemine göre belirlenmiş % canlılık üzerine etkileri	27-28
Şekil 14.	<i>S. rosifolia</i> ve <i>S. huberi</i> ekstrelerinin SRB yöntemine göre belirlenmiş % canlılık üzerine etkileri	28
Şekil 15.	A β (1-42) muamele edilmiş ve edilmemiş hücrelerin büyüme profilleri	29
Şekil 16.	SHNBU ve SRNBU ekstrelerinin A β 22 μ M ile muamele edilmiş hücreler üzerine etkisi	30
Şekil 17.	SHNBU-FR4 ekstresinin A β 22 μ M ile muamele edilmiş hücreler üzerine etkisi	30
Şekil 18.	SRNBU-FR5' in A β 22 μ M ile muamele edilmiş hücreler	30

	üzerine etkisi	
Şekil 19.	Rozmarinik asit, SB 216763 bileşiklerinin A β 22 μ M ile muamele edilmiş hücreler üzerine etkisi	31
Şekil 20.	<i>S. huberi</i> , <i>S. rosifolia</i> n-BuOH ekstreleri ve Etkili Fraksiyonlarının MMP üzerine etkileri	31
Şekil 21.	Western Blot deneyinde elde edilen GAPDH (Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) proteinlerinin film görüntüsü.	32
Şekil 22.	SRNBU-FR5' in LC-MS/MS kromatogramı ve taşıdığı maddeler	33
Şekil 23.	SRNBU-FR5' in HPLC kromatogramına göre içerdği maddeler	33
Şekil 24.	SHNBU-FR4' ün LC-MS/MS kromatogramı ve taşıdığı maddeler	33
Şekil 25.	SHNBU-FR4' ün HPLC kromatogramına göre içerdği maddeler ve miktarları	33
Şekil 26	İzole edilen bileşiklerin kimyasal yapıları	34

TABLOLAR

		Sayfa
Tablo 3.1.	Kromatografik çalışmalarda kullanılan adsorbanlar	10
Tablo 3.2.	Kromatografik çalışmalarda kullanılan çözücü sistemleri	10
Tablo 3.3.	Her iki <i>Salvia</i> türüne ait n-BuOH ekstreleri ve fraksiyonlarının miktarları	14
Tablo 4.1.	Rozmarinik Asit bileşiğinin ¹³ C (100 MHz, CD ₃ OD) ve ¹ H (400 MHz, CD ₃ OD) NMR spektroskopik değerleri.	35

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 *S. huberi* ve *S. rosifolia* bitkilerinden hazırlanan çeşitli ekstre ve fraksiyonların 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* türlerinin toprak üstü kısımlarının önce metanolle, daha sonra bu ekstre üzerinden sıvı-sıvı ekstraksiyon yöntemiyle farklı polaritelerdeki çözücülerle ekstre edilerek hazırlanmış ekstrelerinin GSK-3 β inhibitörü olup olmadıkları, öncelikle *in-vitro* olarak araştırılmıştır. En yüksek etki gösteren *n*-BuOH ekstreleri, Poliamit kolon kromatografisi yardımıyla fraksiyonlanmıştır. Elde edilen ana fraksiyonlar tekrar bu aktivite için denenmiştir. *S. huberi* için FR4, *S. rosifolia* için de FR5 en aktif fraksiyonlar olarak tespit edilmiştir. Gerçekleştirilen çeşitli açık ve kapalı kolon kromatografisi, teknikleriyle bu fraksiyonların taşıdığı ana bileşik olan Rozmarinik asit (RA) izole edilmiştir. Rozmarinik asitin yapısı, ^1H ve ^{13}C NMR' ları yardımıyla doğrulanmıştır. Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi yardımıyla standart maddeler kullanılarak ekstrelerdeki RA ve diğer bileşenlerin miktarları araştırılmıştır. Her iki bitki için de *n*-BuOH ekstreleri, SHNBU-FR4 ve SRNBU-FR5' in SH-SY5Y nöroblastoma hücre kültürü ortamında β -amiloid (1-42) peptidle indüklenmiş nörotoksisitede koruyucu rolü olduğu gerçek zamanlı hücre analizi yöntemi yardımıyla gösterilmiştir. Aynı zamanda bu fraksiyonların koruyucu etkilerinin mekanizmasının araştırılması amacıyla MMP ve enzim ekspresyon düzeyleri üzerine etkileri de araştırılmıştır. GSK-3 β inhibisyonu yapan ekstre ve fraksiyonların amiloit beta koruyucu etkinliklerini MMP' ni artırarak gösterdiği bulunmuştur. Bu ekstrelerin aynı zamanda enzim ekspresyonunu da azalttığı gözlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: *Salvia*, GSK-3 β , Alzheimer Hastalığı, Amiloit beta toksisitesi

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.

In this study protective effects of various extracts prepared from two *Salvia* species (*S. huberi* Hedge and *S. rosifolia* Sm.) were examined for β amyloid peptide induced neurodegeneration and the underlying mechanism studied regarding GSK-3 β inhibition.

The most effective GSK-3 β inhibitory extract is identified and the protective effects on $A\beta$ (1-42) induced neurotoxicity on SHSY-5Y neuroblastoma cells was investigated.

First *in-vitro* GSK-3 β inhibitory effects of methanolic extracts and other various extract which was prepared with different solvents were evaluated. The most effective *n*-BuOH extracts were fractionated with Polyamide column chromatography and the main fractions were tested for the activity again. SHNBU-FR4, SRNBU-FR5 were the most active ones and with the further chromatographic methods the main ingredient were determined as Rosmarinic acide (RA) and RA is isolated from the active fractions and the structure of the compound is confirmed with the ^{13}C and ^1H NMR techniques. The absolute quantities of the RA and other constituents were determined with HPLC.

The protective effects on $A\beta$ (1-42) induced neurotoxicity on SHSY-5Y neuroblastoma cells of two *n*-BuOH extracts, SHNBU-FR4, SRNBU-FR5 were indicated with the help of the real time cell analysing method. The MMP and expression of the GSK-3 β levels were identified for both of the extracts and the fractions as underlying mechanisms.

As a result the GSK-3 β inhibitory extracts and fractions induced MMP levels and reduced GSK-3 β expression.

Key Words: *Salvia*, GSK-3 β , Alzheimer's Disease, Amyloid beta toxicity

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 fizostigmin'dir. 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* ekstrelerini içeren preparatlar da hafıza üzerindeki iyi edici özelliklerinden dolayı kullanılmaktadır.

Alzheimer hastalığı için birçok patolojik mekanizma önerilmiş olsa da $A\beta$ ' nın 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 $A\beta_{42}$, oksidatif stres oluşturup, merkezi sinir sisteminin homeostazisini değiştirerek enflamatuvar cevap ile demansın asıl sebeplerinden biri olan nöronal hücre kaybına neden olmaktadır (Takashima vd. , 1996, Robinson ve Bishop, 2002, Selkoe, 2003, Verdile vd. , 2004).

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 aktivasyonunun tau patolojisi, $A\beta$ 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 (Martinez ve Perez, 2008, Eldar-Finkelman ve Martinez, 2011, Koistinaho vd. , 2011, Lei vd. , 2011, Perez vd. , 2011).

Bu çalışmada dünya genelinde ilaç, kozmetik ve parfüm endüstrisinde öneme sahip *Salvia* cinsine ait iki endemik tür olan *S. huberi* ve *S. rosifolia* bitkileri üzerinde farmakolojik aktivite ve kimyasal içerik araştırmaları yapılması planlanmıştır. Labiatae familyasına ait *Salvia* cinsi Dünya’da yaklaşık 900, Türkiye’de ise 51’i 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 tedavisinde bilimsel anlamda özellikle son 10 yılda daha da önem kazanmıştır.

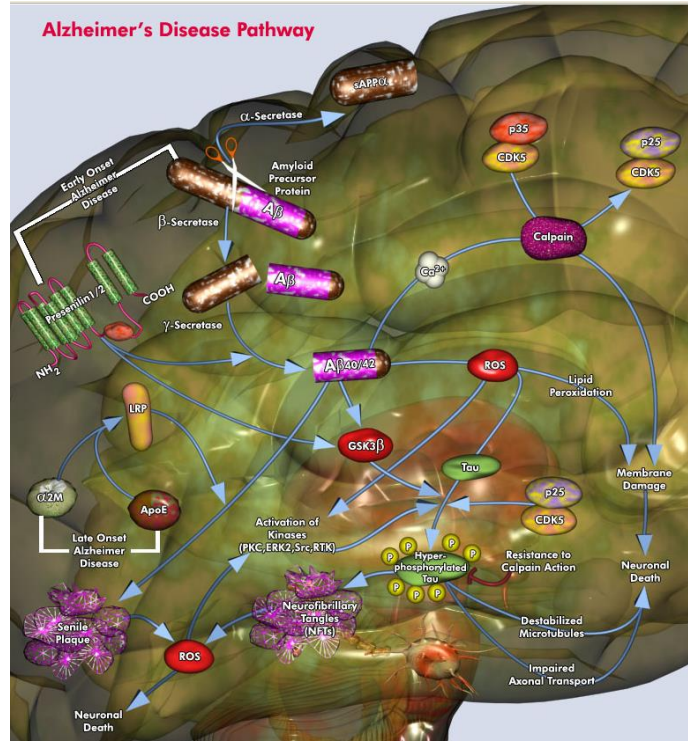
Geleneksel tıpta demans tedavisinde kullanımı olan ve son yıllarda yapılan birçok çalışmayla çeşitli mekanizmalarla nöroprotektif etkileri gösterilen *Salvia* türleri üzerinde β -amiloid ile indüklenmiş nörotoksisitede koruyucu etkilerinin olduğuna dair az sayıda çalışma bulunmaktadır ve yapılmış bu 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 (Iuvone vd. , 2006).

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 iki endemik tür olan *S. huberi* ve *S. rosifolia* bitkileri seçilmiş ve çalışma üç aşamada gerçekleştirilmiştir.

1. Bitkilerin toprak üstü kısımlarından hazırlanan MeOH, *n*-BuOH, Su ve Petrol eteri ekstraktlarının GSK-3 beta inhibitör etkilerinin saptanması,
2. GSK-3 β inhibitör etki gösteren ekstraktların fraksiyonlanması ve bu fraksiyonların tekrar GSK-3 beta inhibitör etkilerinin araştırılması,
3. Hücre hatları üzerinde A β (1-42) ile toksisite oluşturularak, aktif fraksiyonların bu toksisiteye karşı koruyucu etkilerinin ölçülmesi,
4. Etkinin mekanizmasının belirlenmesi,
4. Etkiden sorumlu bileşik ya da bileşiklerin tayin edilmesi amaçlanmıştır.

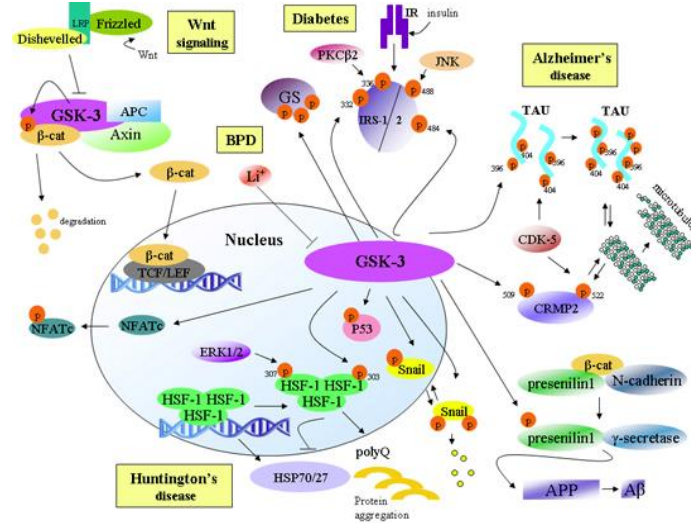
2. LİTERATÜR ÖZETİ

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 $A\beta$ ' nın 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 (Takashima, Noguchi vd., 1996, Robinson ve Bishop, 2002, Selkoe, 2003, Verdile, Fuller vd., 2004).



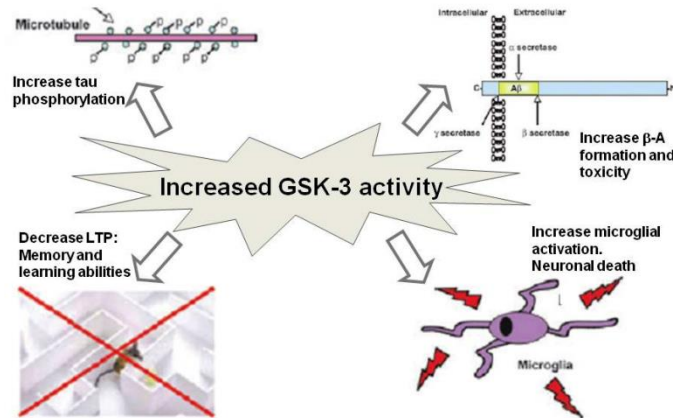
Şekil 1. Alzheimer Hastalığı' nın patolojik mekanizması

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, $A\beta$ sentezi ve apoptotik nöronal hücre ölümünde katkısının olduğu çeşitli araştırmalarla gösterilmiştir. GSK-3 β ' nın AD' de kilit öneme sahip bir enzim olduğunun anlaşılmasıyla



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. Bu 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 ekstraktlarının asetilkolinesteraz inhibitör etki, antioksidatif aktivite, A β üreten sekretazların modülasyonu, A β degradasyonu, ağır metal bağlama ve apoptotik mekanizmalarla ilişkileri *in-vitro* ve *in-vivo* çalışmalarla ortaya konmuştur (Takashima, Noguchi vd., 1996, Selkoe, 2003, Kimura vd. , 2011, Koistinaho vd. , 2011, Senol vd. , 2011, Zhang vd. , 2011). 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 radikale indüklenmiş sitotoksitede etkili olduğu gösterilmiştir (Liu vd. , 2010). 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 (Brühlmann Corinne, 2004). Çeşitli hayvan modellerinde nöroprotektif etkileri gösterilen ve geleneksel kullanıma sahip bitkilerin başında ise *Salvia officinalis*, *S. lavandulaefolia*, *S. 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 (Akhondzadeh vd. , 2003). 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 (Howes ve Houghton, 2003, Howes vd. , 2003, Ono vd. , 2004, Houghton ve Howes, 2005, Eckert, 2010, Liu vd. , 2010, Rhein vd. , 2010).

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 (Kiyoshi, 2010). 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 (Ono vd. , 2005, Kiyoshi, 2010). Başka bir çalışmada da *A. sinensis*' in içerdiği fenolik asitler olan ferulik asit ve ftalik asitin düşük dozlarda ekstreya göre daha yüksek nöroprotektif etki gösterdiği bulunmuştur (Huang vd. , 2008). Yine *A. sinensis*' in metanol ekstresinin GSK-3 β ' nın down-regülasyonu sonucu inhibe ederek A β ile indüklenmiş nörotoksiteyi ve tau hiperfosforilasyonunu azalttığı gösterilmiştir (Zhang vd. , 2011). Başka bir *Angelica* türü olan *A. officinalis* ile yapılan bir çalışmada da bitkinin içerdiği furanokumarinlerin yüksek bütiril kolinesteraz inhibitör aktivite gösterdiği saptanmıştır (Senol vd. , 2011).

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*' nın AchE inhibitör aktivite, A β koruyucu ve Nitrikoksit sentaz (NOS) inhibitör etkileri olduğu

yapılan çalışmalarla kanıtlanmıştır (Lin vd. , 2008). 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 (Liu vd. , 2010, Zhou vd. , 2011). Özellikle bir fenolik asit olan salvianolik asit B' nin A β fibril oluşumunu engelleyerek ve oluşan fibrilleri dağıtarak A β ile indüklenmiş nörotoksitede koruyucu rol oynadığı çeşitli çalışmalarla gösterilmiştir (Ming-Ke Tang, 2001, Durairajan vd. , 2008). Bununla birlikte *Salvia officinalis* ve *Salvia lavandulaefolia*' nın 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 (Akhondzadeh vd. , 2003, Perry vd. , 2003, Tildesley vd. , 2003, Kennedy vd. , 2011). Yine son yıllarda yapılan bir çalışmada *S. officinalis* ve içerdiği kafeik asit türevi bir fenolik asit olan rozmarinik asitin A β ile indüklenmiş nörotoksitede PC12 hücrelerini koruyucu etki gösterdiği bulunmuştur (Iuvone, De Filippis vd., 2006).

Çalışmada *Salvia huberi* ve *S. rosifolia*' nın seçilme nedeni; Alzheimer patogeneğinde 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.

Salvia türleri dünya üzerinde 1000 den fazla yayılış gösteren tür sayısı ile Lamiaceae familyasının en zengin üyelerinden biridir. Son kayıtlarla birlikte bu cins 51' i endemik olmak üzere Türkiye' de 99 türle temsil edilmektedir. Bu sayı birçok komşu ülkeden ve Avrupa' nın tamamından daha fazla türe sahip olduğumuzu göstermektedir (Kahraman Ahmet 2012). 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 (Orhan vd. , 2007, Kolak Ufuk, 2009, Şenol vd. , 2010, Orhan vd. , 2012). *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 (Eser, 2007).

Bazı *Salvia* türleri, ülkemizin ihraç ürünleri arasında yer almaktadır (Baytop, 1999). 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 (Iuvone, De Filippis vd., 2006).

3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1 Fitokimyasal Çalışmalar

3.1.1 Bitkisel Materyal

Salvia rosifolia bitkisi Temmuz 2013' te Erzurum; Oltu, Çamlıdere köyü üstleri, akıntılı yamaçlar, 1460 m yükseklikten toplanmıştır. *Salvia huberi* bitkisi Temmuz 2013' te Erzurum; Tortum, Balıklı köyü üzeri, Mezra civarı, akıntılı yamaçlar 1540 m yükseklikten toplanmıştır. Bitkilere ait örnekler sırasıyla Paksoy 1860 ve Paksoy 1859 toplayıcı numarası ile Elazığ Üniversitesi Fen Fakültesi Herbaryumu' nda saklanmaktadır. Bu çalışmada bitkinin, açık havada ve gölgede kurutulmuş çiçekli toprak üstü kısımları kullanılmıştır.



Salvia rosifolia



Salvia huberi

Resim 1. *Salvia* türlerine ait herbaryum örnekleri

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)

Çözücüler: Aseton, Diklorometan, Etilasetat, Kloroform, Metanol, n-Butanol, n-hekzan, Petrol Eteri, Sülfürik asit, Toluene (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 alüminyum plak, Kieselgel 60 F ₂₅₄ 0,2 mm, Merck 5554) Ters faz silika jel (Hazır alüminyum 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), Poliamit KK (Polyamide MN, Sigma)
MPLC	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.

Çözücü Sistemleri: Kromatografik çalışmalarda kullanılan çözücü sistemleri Tablo 3.2.'de verilmiştir.

Tablo 3.2. Kromatografik çalışmalarda kullanılan çözücü sistemleri

Çözücü 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)	MPLC, TF-İTK
Toluen	SK
Toluen - CH ₂ Cl ₂ (1 : 1)	SK

İTK: Normal faz silika jel ince tabaka kromatografisi, **MPLC:** Orta 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 çözücü sistemi ile süspansiyon haline getirilmiştir ve karışım alt ucuna pamuk yerleştirilmiş olan cam kolona aktarılmıştır. Kolondan yeterli miktarda çözücü sistemi geçirilerek adsorbanın yerleşmesi sağlanmıştır. Adsorban üzerinde 2 - 3 mm çözücü kalıncaya kadar beklenmiş ve çözücü sisteminde çözölmüş 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 çözücü kalınca MeOH'da çözölen numune kolona tatbik edilmiştir.

Kolon Kromatografisi İçin Numune Tatbiki

Çözücü yardımı ile tatbik: Numune yeterli miktarda çözücü / çözücü sistemi içinde tamamı çözöldükten 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 çözücü sistemi eklenerek elüsyona başlanmıştır.

Orta Basıncılı Sıvı Kromatografisi (MPLC)

Adsorban	: LiChroprep C ₁₈ (40 - 63 µm, Merck)
Kolon	: Sepacore Hazır Doldurulmuş Kartuş
Peristaltik Pompa	: Buchi C601
Çözücü Sistemi	: MeOH - H ₂ O (% 0 - 100 MeOH/ACN)
Akış Hızı	: 5 mL/dak
Basınç	: 5 - 15 bar
Fraksiyon Hacmi	: 5 - 10 mL
Fraksiyon Toplayıcı	: Büchi C-660

Yüksek Basıncılı 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)
Çözücü 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 : Çözücü 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 Basıncılı 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

Topraküstü Kısımlarından MeOH Ekstresinin Hazırlanması

S. rosifolia (1500 g) ve *S. huberi* (1280 g) bitkilerinin gölgede kurutulmuş, toz edilmiş topraküstü kısımları 37 °C’ de MeOH ile (2,5 L x 5) ekstre edilmiştir. MeOH ekstreleri süzülerek birleştirilmiş ve 37 °C’ de rotary evaporatörde yoğunlaştırılmıştır [SRME (126 g, % 8,5); SHME (176 g, %11,7)]*.

Topraküstü Kısımlarından *n*-BuOH Ekstresinin Hazırlanması:

S. rosifolia ve *S. huberi* bitkilerinin topraküstü kısımları MeOH ile ekstre edilip ham metanol ekstresi su (350 mL) ile süspande edildikten sonra bir ayırma hunisine alınmış ve ilk olarak petrol eteri (250 mL x 8) ile partisyona tabi tutulmuştur. Petrol eteri fazı ayrıldıktan sonra kalan sulu kısım *n*-butanol (250 mL x 8) ile çalkalanmış ve ayrılmıştır. Kalan su fazı ve ayrılan iki faz da birleştirilerek rotary evaporatörde alçak basınç altında 37 °C’ de kuruluğa kadar uçurulmuş; su ve *n*-butanol fazları çalışmanın başlamasına kadar liyofilize edilmiştir (SRNBU, 24 g, SRPE, 43 g, SRS, 30 g; SHNBU, 65 g, SHPE, 25 g, SHS, 66 g)*.

*[SRME: *S. rosifolia* Metanol Ekstresi, SRNBU: *S. rosifolia* *N*-butanol Ekstresi, SRS: *S. rosifolia* Su Ekstresi, SRPE: *S. rosifolia* Petrol Eteri Ekstresi; SHME: *Salvia huberi* Metanol Ekstresi, SHNBU: *Salvia huberi* *N*-butanol Ekstresi, SHS: *Salvia huberi* Su Ekstresi, SHPE: *Salvia huberi* Petrol Eteri Ekstresi]

N-BuOH Ekstresinin Fraksiyonlarının Hazırlanması

Ekstrelerin GSK-3 β aktivite testleri sonucunda her iki bitki için de diğer ekstrele göre (MeOH, H₂O, PE) en yüksek inhibitör etki gösteren *n*-BuOH ekstreleri Poliamit kolonla fraksiyonlanmıştır. Elüsyon çözücü sistemi olarak H₂O: MeOH' ın değişen polaritelerde (100:0, 75:25, 50:50, 25:75, 0:100) karışımları kullanılmıştır. İTK kromatogramlarına göre birleştirilen fraksiyonlar sonucunda toplam 5 fraksiyon elde edilmiş ve liyofilizatörde kurutulduktan sonra farmakolojik aktivite çalışmalarına kadar +4 °C' de saklanmıştır. Kurutulmuş fraksiyonların miktarları Tablo 3.3' de tabloda verilmiştir.

Tablo 3.3. Her iki *Salvia* türüne ait *n*-BuOH ekstreleri ve fraksiyonlarının miktarları

Ekstre/Fraksiyon	Miktarı (g)	Ekstre/Fraksiyon	Miktarı (g)
SHNBU	32	SRNBU	24
SH FR1 (<i>S. huberi</i> FR1)	14.4	SR FR1 (<i>S. rosifolia</i> FR1)	5.7
SH FR2 (<i>S. huberi</i> FR2)	4.3	SR FR2 (<i>S. rosifolia</i> FR2)	3.36
SH FR3 (<i>S. huberi</i> FR3)	2.6	SR FR3 (<i>S. rosifolia</i> FR3)	5
SH FR4 (<i>S. huberi</i> FR4)	4.3	SR FR4 (<i>S. rosifolia</i> FR4)	2.8
SH FR5 (<i>S. huberi</i> FR5)	6.1	SR FR5 (<i>S. rosifolia</i> FR5)	4.9

3.2 Aktivite Çalışmaları

3.2.1 Kimyasal Maddeler ve Aletler

Kimyasal Katı Maddeler: DMSO (Dimetilsülfoksit, Lab-Scan, Poland), HEPES [(4-(2-hidroksietil) piperazin-1-etansulfonik 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, Milipore), Fosfoglikojen sentaz peptit-2 (Millipore, USA), PMSF (fenilmetilsülfonil 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

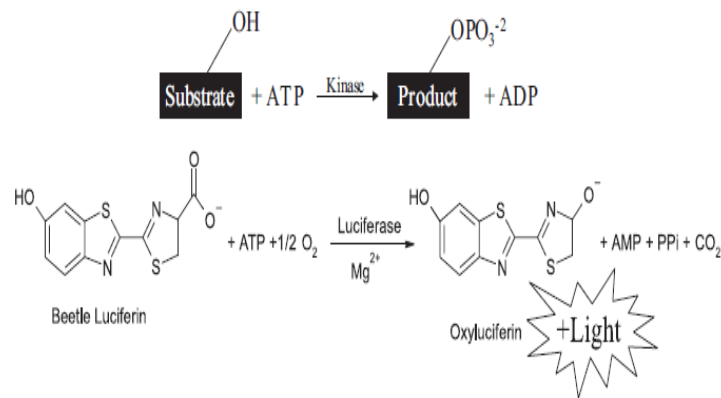
Çözeltilerin Hazırlanması

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-merkaptotanol) 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.



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

Bu yöntemle 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 °C' de 30 dakika inkübe edildi. 30 dakika inkübasyonun sonunda reaksiyon 40 µL Kinase-Glo reaktifi (Luciferin+Luciferaz) ilave edilerek durduruldu. 30°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-3β' 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-3β inhibitörü, pozitif kontrol olarak da herhangi bir inhibitör madde taşımayan test çözeltisi kullanıldı ve % inhibisyon değeri, aşağıdaki formülle hesaplandı.

% inhibisyon= $100 \times \frac{(\text{inhibitör test çözeltisinin lüminesansı} - \text{ortalama pozitif kontrol lüminesansı})}{(\text{ortalama negatif kontrol lüminesansı} - \text{ortalama pozitif kontrol lüminesansı})}$

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.
- Kabin 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.
- Flasktaki 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 kabin 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 µL alarak 2 mL' lik ependorf tüpüne pipetlenir.
- 20 µL tripan mavisini ilave edilir (1/1 seyreltme)
- Buradan da 10 µL 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 kuyucuk	12500
110 kuyucuk	110 x 12500

Toplamda 1375000 hücre $100 \mu\text{L} \times 110 \text{ kuyu} = 11 \text{ mL}$ de süspande edilir ve her kuyuya $100 \mu\text{L}$ 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 136 mM NaCl, 2mM KCl, 8mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{H}_2\text{O}$, 1,5 mM KH_2PO_4 kimyasalları kullanılarak da hazırlanabilir. 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 bazikse, 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 $\rightarrow 300 \mu\text{L}$ pen/strep

Hücre dondurma cryo çözeltisi

- Hücreler santrifüj edildikten sonra süpernatant atılır.
- Hücreler $950 \mu\text{L}$ besiyeri (%10 FBS ve penisilin-streptomisin ilaveli) ile süspande edilerek, steril ependorf tüpüne aktarılır üzerine $50 \mu\text{L}$ %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 flasktaki hücreler sayılarak 96 well plakalara ekim yapıldı. Kuyucuk başına $100 \mu\text{L}$ ' de 12 500 hücre olacak şekilde ekim yapılır.

- 24 saat sonunda plakalara yapışmış olan hücrelerin üstündeki besi yerleri atıldı ve hazırlanan ekstre konsantrasyonlarından $100 \mu\text{L}$ alınarak düşük konsantrasyondan yükseğe doğru plakalara eklendi.
- İnkübasyon süresi (24 saat) sonunda $+4^\circ\text{C}$ TCA (trikloro asetik asit) kuyucuklardaki final konsantrasyonu %10 olacak şekilde eklendi.
- 1 saat $+4^\circ\text{C}$ ' 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 $50 \mu\text{L}$ 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 absorbands ölçüldü.

3.2.3.3 SHSY-5Y Hücrelerini Aβ (1-42) Toksisitesinden Koruyucu Etkinin Ölçülmesi

Gerçek zamanlı hücre analizi çalışmaları

SRB yönteminde yapılan ekim ve dozlama işlemleri Xcelligence analizinde de yapılır. Tek fark kullanılan 96 lık plakaların 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 yaşamının 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 IC₅₀'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 cihazı

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

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 , SHNBU-FR4, SRNBU-FR5 (10, 50, 100, 250 μ g/mL), Rozmarinik asit (50, 100 μ M), SB 216763(5 μ M)]. Her grup 3 tekrarlı çalışılmıştır ve izleme 48 saat sürmüştür.

3.2.3.4 Ekstre ve Fraksiyonların Mitokondriyal Membran Potansiyeline Etkilerinin llmesi

Bu lmler ticari kit prosedürüne göre aşağıdaki şekilde gerçekleştirilmiştir (JC-1 Mitochondrial Membrane Potential Assay Kit item no:10009172).

Deney Prosedürü

Deney öncesinde 3 cell based assay buffer tableti 300 mL distile suda zlrerek deneye bařlamadan hazır hale getirilir.

1. 96 lık siyah hücre kültürü plakalarında 50 000- 500 000 arası hücre/mL ekilir. 96' lık plakada her kuyuya 12 500/100 μ L olacak şekilde hücreler ekilmiştir.
2. Hücreler 1 gece yapışıp çoğalması için bekledikten sonra etkisi araştırılan madde belirli dozlarda (Ekstreler için: 25, 50, 100 μ g/mL, 25 μ L; Rozmarinik asit için: 250, 100, 50 ug/ mL, 25 μ L) kuyulara eklenir.
3. Her kuyuya 100 μ L besiyeri içindeki 5 μ L JC-1 solüsyonu eklenir ve hafifçe çalkalanır. 15-30 dk (15 dk) inkübatörde bekletilir.
4. 5 dk oda sıcaklığında 400 G' de santrifüj edilir. Süpernatant atılır.
5. 200 μ L assay buffer her kuyuya eklenir ve 5 dk 400 g de santrifüj edilir. Süpernatant atılır.

6. 200 µL assay buffer her kuyuya eklenir ve 5 dk 400 g de santrifüj edilir. Süpernatant atılır.
7. Her kuyuya 100 µL assay buffer eklenir.
8. Floresan okuma gerçekleştirilir (560 eksitasyon, 595 emisyon; 485 eksitasyon, 535 emisyon).
- Sağlıklı hücreler güçlü ışığı JC-1 in J agregatlarına dönüştürerek yaparlar (560 eksitasyon, 595 emisyon). Apoptotik veya sağlıklı hücreler güçlü ışığı JC-1' i monomerlerine dönüştürerek yaparlar (485 eksitasyon, 535 emisyon).

3.2.3.5 Enzim Ekspresyon Düzeylerinin Ölçülmesi

β -Amiloid nörotoksitesinde koruyucu etki gösteren saf bileşiklerin GSK-3 β enziminin ekspresyon düzeyine etkisi Western blot analizi ile ölçülecektir.

Western blot uygulama basamakları aşağıda verilmiştir.

i. Hücre Ekstresinin Hazırlanması:

Hücre kültürü gruplarından alınan örneklerin besi ortamı aspire edildikten sonra, soğutulmuş PBS ile yıkanır. Üzerine örnek tamponu eklenerek (50 mM Tris-HCl, pH 7.9, 1 mM EDTA, 150 mM NaCl, 1 mM PMSF, 1 mM DTT, 5 µg/mL Aprotinin, 5 µg/mL Leupeptin, 5 µg/mL Pepstatin A) hücre ekstraktları hazırlanır.

ii. Protein Ölçümü

Lowry Metoduna göre yapılacaktır. Metodun uygulanışı aşağıdaki anlatıldığı gibi olacaktır.

Standart çözelti hazırlanması

Bovine Serum Albumin (BSA) 1mg/mL kullanılarak standart çözelti hazırlanması aşağıdaki tabloda gösterildiği gibidir.

STD	Su (µL)	BSA (µL)	Toplam Hacim (µL)
0	100	0	100
0.1	90	10	100
0.2	80	20	100
0.3	70	30	100
0.4	60	40	100
0.5	50	50	100

Lowry Çözeltisinin Hazırlanışı

0.5 mL 1% (a/h) CuSO₄ ve %2 0.5 mL Sodyumtartarat karıştırılarak üzerine 49 mL Sodyumkarbonat/NaOH çözeltisi ilave edilir ve karıştırılır.

Folin Çözeltisi Hazırlanışı (1N)

1:1 oranında suyla hazırlanır.

Ölçüm

1. 96 kuyucuklu plakaların her birine 5 µL örnek/standart çözeltisi ve 95 µL su ilave edilir.
2. Kuyucuklara 2.4 mL Lowry çözeltisinden ilave edilir ve 10 dakika bekletilir.
3. 200 µL 1N Folin reaktifi ilave edilir ve 10 dakika bekleme süresi sonunda 650 nm' de absorbans ölçülür.
4. Protein miktar tayini standartlarla oluşturulan doğru denklemi yardımıyla ölçülür.

iii. SDS-PAGE Jellerinin Hazırlanması

1. Seçilen konsantrasyondaki ayırıcı jel için monomer karışımı, aşağıdaki tablo izlenerek hazırlanır.

Ayırıcı (separating) Jel Hazırlanması: 0.375 M Tris, pH 8.8					
	%5 (mL)	%7 (mL)	%10 (mL)	%12 (mL)	%15 (mL)
Saf su	7.5	12.7	10.7	4.65	3.65
3 M Tris-HCl, pH 8.8	1.25	2.5	2.5	1.25	1.25
%20 (a/h) SDS	0.05	0,1	0,1	0.05	0.05
Akrilamid/Bis-akrilamid (%29.2/%0.8 a/h)	1.15	4.6	6.6	4.0	5.0
%10 (a/h) amonyum persülfat	0.05	0.2	0.2	0.05	0.05
TEMED	0.005	0.02	0.02	0.005	0.005
Toplam monomer karışımı	10.005	20.12	20.12	10.005	10.005

2. Jel yüzeyi izopropanol ile kaplanır.
3. 45-60 dakika polimerize olması için beklenir.
4. Jel yüzeyindeki izopropanol dökülür.

Paketleyici (stacking) Jel Hazırlanması: %4.0, 0.125 M Tris, pH 6.8	
Saf su	7.35 mL
1.5 M Tris-HCl, pH 6.8	1.25 mL
20% (a/h) SDS	0.05 mL
Akrilamid/Bis-akrilamid (%29.2/%0.8 a/h)	1.34 mL
%10 (a/h) amonyum persülfat	0.04 mL
TEMED	0.01 mL
Toplam monomer karışımı	10.13 mL

5. Paketleyici jel için monomer karışımı yukarıdaki tablo izlenerek hazırlanır.
6. Jel tarakları dikkatli bir biçimde polimerize olmamış karışım içine yerleştirilir.
7. Polimerizasyonun tamamlanması için 45-60 dakika beklenir

iv. Örnek Hazırlanması

1. Protein örnekleri 10-40 μ L'de yaklaşık 10-40 μ g olacak biçimde, en az 1:4 oranında örnek tamponu (% 10 beta merkaptotanol içeren) ile karıştırılır.
2. 95 °C'de 2-4 dakika (veya 100 °C'de 1 dakika) tutulur

v. Elektroforetik Yürütme

1. Örnek yüklendikten hemen sonra sistem kapatılır ve elektrotlar bağlanır.
2. Örnekler ayırıcı jele girinceye kadar düşük akımda 100 Volt gerilim uygulanır.
3. Örnek ayırıcı jele geçtikten sonra ise gerilim 150-200 Volt'a çıkarılır.
4. İlk denemelerde voltaj değişimleri izlenir ve not alınır.
5. Brom fenol mavisi jelin alt ucuna ulaşınca akım kesilir ve jel tanktan uzaklaştırılır.

vi. Semi-Dry Transfer

1. Transferde kullanılacak membran metanol ile doyurulur.
2. 3MM filtre kâğıtları Towbin transfer tamponu ile ıslatılır.
3. 2 adet 3MM filtre kağıdı en alta yerleştirilir, üzerine membran koyulur.
4. Membran üzerine jel yerleştirildikten sonra diğer iki 3MM filtre kağıdı koyulur.
5. Bu aşamalar sırasında arada hava kabarcığı kalmamasına dikkat edilir.
6. Kapaklar kapatıldıktan sonra 15 Volt'a 50 dakika süreyle transfer gerçekleştirilir.

vii. Bloklama

1. Transfer sonrası proteinleri bağlanmış olan membran, 1,5 saat %5' lik süt tozu ve %0,1' lik Tween 20 içeren PBS çözeltisi (bloklama çözeltisi) içinde çalkalamaya bırakılır.

viii. Birincil antikor ile inkübasyon

1. Membran bloklama çözeltisi içinde dilüe edilmiş birincil antikor ile inkübe edilir. Inkübasyon süresi her antikor için ayrı olarak belirlenmiştir.
2. Bu süre sonunda membran 3 kez %0.1'lik Tween 20 içeren PBS çözeltisi ile 5 dakika süre ile yıkanır.

ix. İkincil antikor ile inkübasyon

1. Membran bloklama çözeltisi içinde dilüe edilmiş horseradish peroksidaz bağlı ikincil antikor ile 1 saat oda sıcaklığında inkübe edilir.
2. Bu süre sonunda membran 3 kez %0.1'lik Tween 20 içeren PBS çözeltisi ile 15 dakika süre ile yıkanır.

x. ECL ile görüntüleme

İkincil antikora bağlı bulunan horseradish peroksidaz enzimi, ECL çözeltisi içinde bulunan Lumigen PS-3 substratını katalizler. Bu reaksiyon sonucu açığa çıkan luminol ışımaya yol açar. Bu ışımaya, Western blota özel filmler ile saptanır.

Bu çalışmada birincil ve ikincil antikor olarak GSK-3 β monoclonal antibody, GAPDH ve anti-rabbit antibody-HRP conjugated (anti-rabbit IgG-HRP) kullanılmıştır.

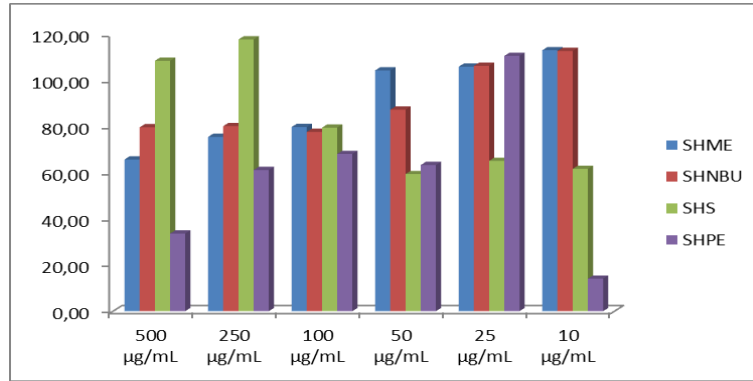
4. BULGULAR

4.1. Aktivite Çalışmaları

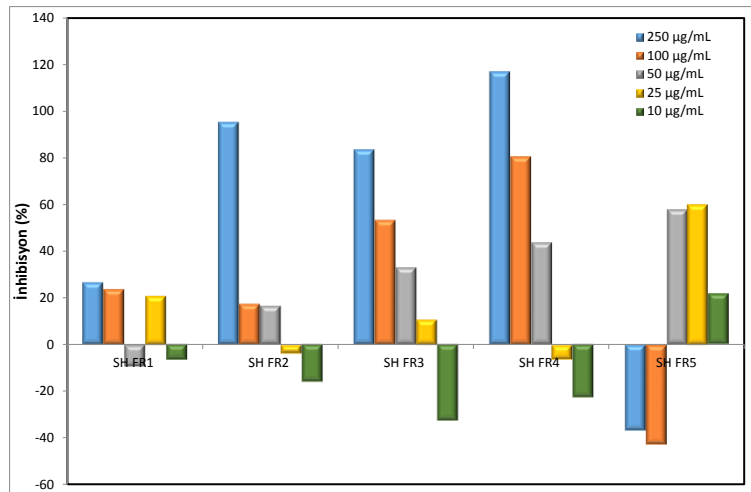
4.1.1. *in-vitro* GSK-3 β inhibitör aktivite

in vitro GSK-3 β enzim inhibisyonu deneylerinde öncelikle enzimin bilinen inhibitörleri için %100 inhibisyon yaptıkları dozlar belirlendi. Ferulik Asit (FA), Apigenin (APİ) ve TDZD8 dozunun belirlenmesinde pozitif kontrol olarak kullanıldı ve inhibisyon deneylerinde pozitif kontrol olarak %100 inhibisyon yapan 5 μ M/mL dozunda TDZD8 kullanılmasına karar verildi.

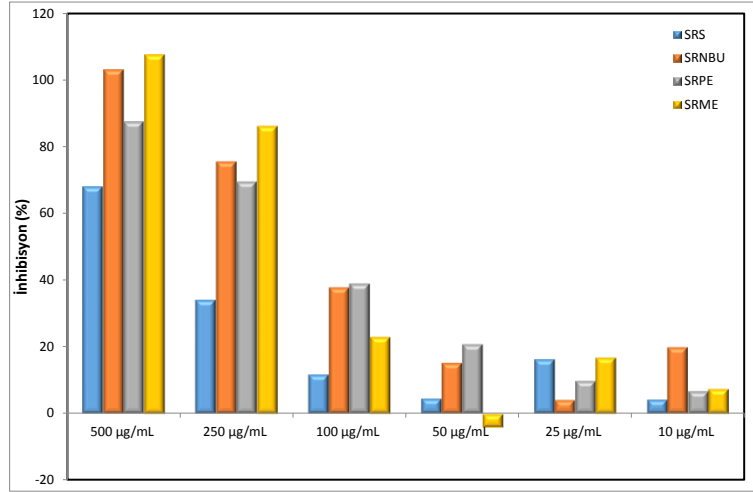
Daha sonra seçilen TDZD8 dozundaki inhibisyon pozitif kontrol olarak kullanılarak ekstrelerin enzim üzerindeki *in vitro* inhibisyon yüzdeleri hesaplandı. *S. huberi*, *S. rosifolia* ana ekstreleri ve alt fraksiyonlarına ait GSK-3 beta inhibitör aktivite çalışmalarına ait sonuçlar aşağıdaki grafiklerde verilmiştir.



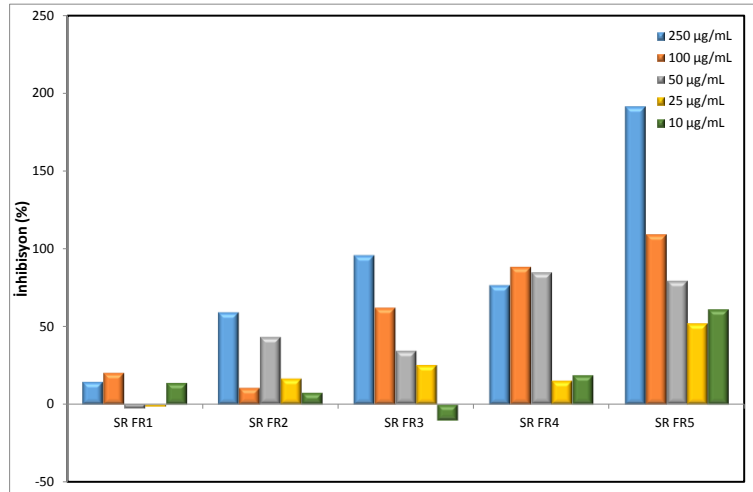
Şekil 6. *Salvia huberi*' den hazırlanan ekstrelerin GSK-3 β inhibitör aktiviteleri (%)



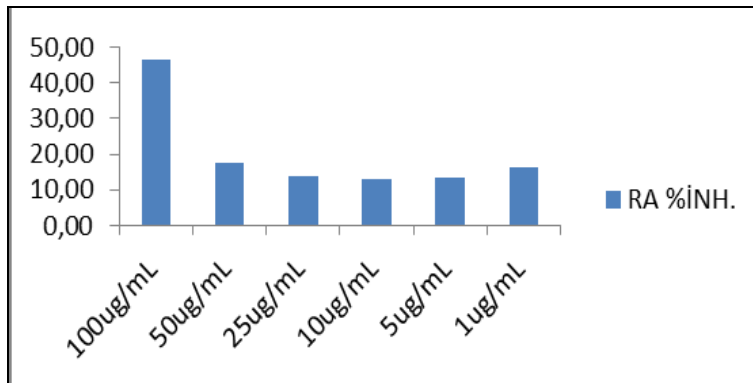
Şekil 7. *Salvia huberi*' den hazırlanan n-BuOH ekstresinin ana fraksiyonlarının GSK-3 β inhibitör aktiviteleri (%)



Şekil 8. *Salvia rosifolia*' dan hazırlanan ekstrelerin GSK-3 β inhibitör aktiviteleri (%)



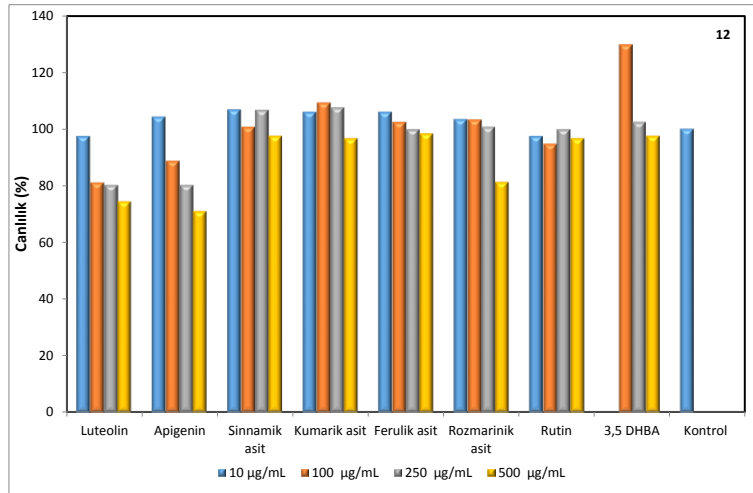
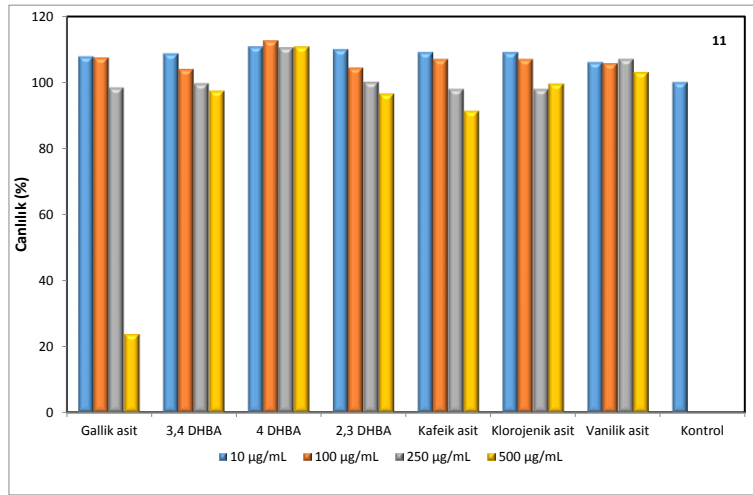
Şekil 9. *Salvia rosifolia*' dan hazırlanan n-BuOH ekstresinin ana fraksiyonlarının GSK-3 β inhibitör aktiviteleri (%)

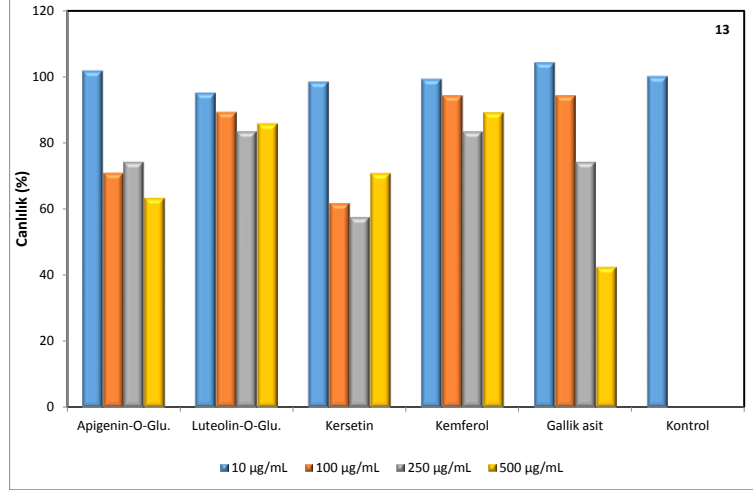


Şekil 10. Rozmarinik Asit' in % GSK-3 β enzim inhibitör etkisi

4.1.2. SRB yöntemiyle toksik olmayan doz belirleme çalışmaları

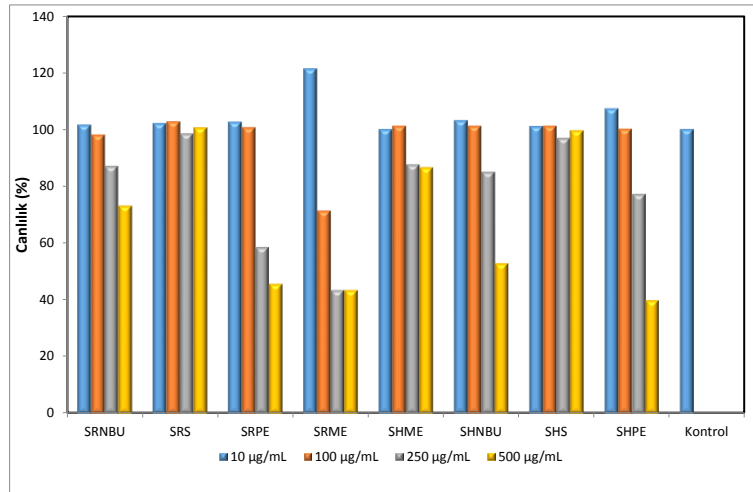
Bu deneyler sonucunda toksik olmayan ekstreler ve bu ekstrelerin amiloid beta toksisitesindeki koruyucu rollerinin araştırılmasında kullanılacak dozları belirlendi. Canlılık testleri için ekstreler 10, 100, 250, 500 µg/mL olmak üzere 4 farklı konsantrasyonda hazırlandı. HPLC çalışmalarında standart olarak 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 Şekil 11, 12 ve 13' te verilmiştir.)





Şekil 11, 12, 13. Standart maddelerin SRB yöntemine göre belirlenmiş % canlılık üzerine etkileri

Ekstrelerle gerçekleştirilen canlılık deneylerinde ise her iki *Salvia* türünde de 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.



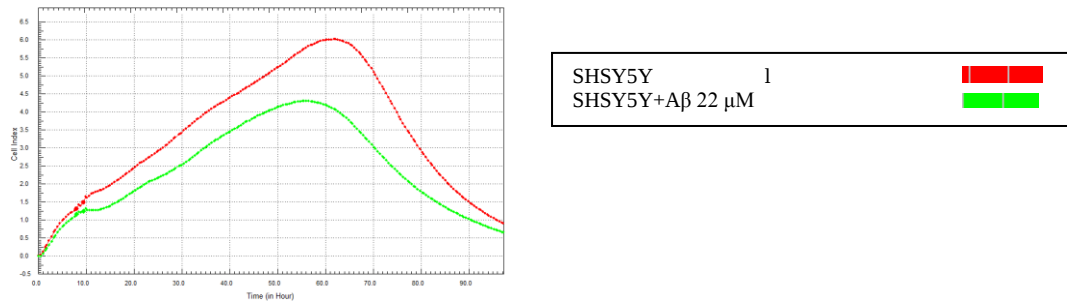
Şekil 14. *S. rosifolia* ve *S. huberi* ekstralarının SRB yöntemine göre belirlenmiş % canlılık üzerine etkileri

Sonuç olarak *Salvia huberi* Hedge ile hazırlanan ekstrelerin farklı dozlarda GSK-3 beta enzimi üzerinde inhibisyon derecelerine bakıldığında en düşük dozda (10 µg/mL) en yüksek inhibisyonun MeOH ve n-BuOH ekstrelerinde olduğu görülmüştür. Saf maddelerden ise gallik asit, rozmarinik 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 ekstrelerde rozmarinik asit miktarının fazla olduğu bulunmuştur. Bu nedenle ekstrelerdeki inhibitör etkinin rozmarinik 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 amiloit beta toksisitesi üzerinde hücrelerdeki koruyucu etkilerinin denenmesi çalışmalarına başlanmıştır. 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 Ölçülmesi

Ekstre ya da maddelerin etkilerine bakılmadan önce nöroblastoma hücreleri ve 22 µM Aβ (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.

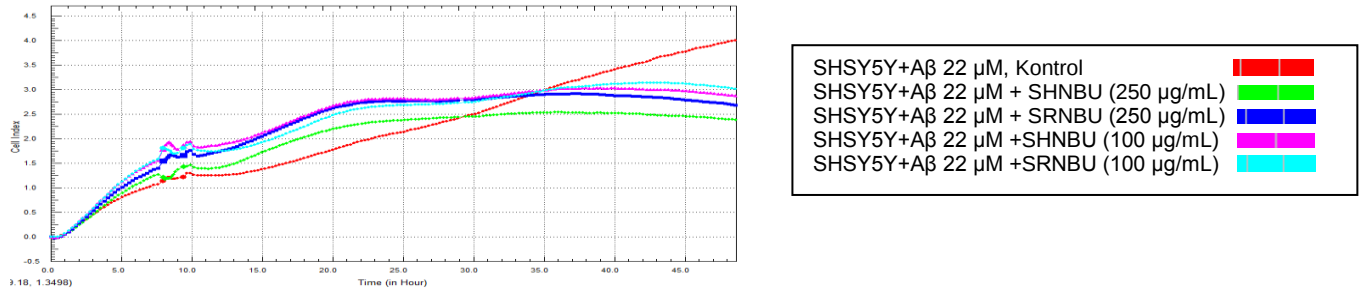


Şekil 15. Aβ (1-42) muamele edilmiş ve edilmemiş hücrelerin büyüme profilleri

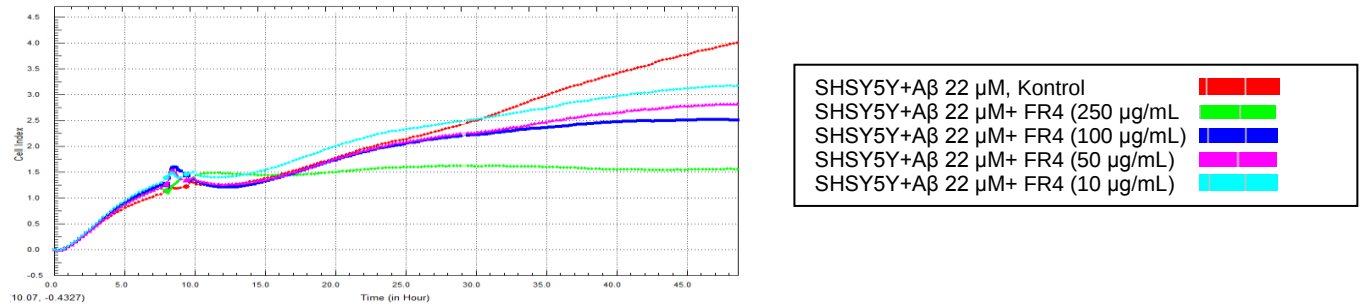
Görüldüğü gibi Aβ hücrelerin büyüme eğrisini negatif etkilemiş, hücre indeksi 60. saatlerde amiloit beta uygulanan hücrelerde 4 civarında iken, amiloit beta uygulanmayan hücrelerde 6 civarındadır. Profil belirledikten sonra, 24 saat boyunca n-BuOH ekstreleri (100 µg/mL, 250 µg/mL) ve aktif fraksiyonlar olan SHNBUFR4 ve SRNBUFR5 (10, 50, 100, 250 µg/mL) ile muamele edilen hücreler amiloit beta toksisitesine maruz bırakıldılar ve bu şekilde tekrar bir profillemeye yapıldı. SHNBU ve SRNBU ekstrelerinin iki dozda koruyucu etkinlikleri ölçüldüğünde, 30. saate kadar görülen büyüme eğrilerine bakılarak, denemesi yapılan iki ekstrenin kırmızıyla gösterilen 22 µM Aβ (1-42) toksisitesi uygulaması yapılmış eğrinin

üstünde seyrettiği görülmüştür. Toksikite uygulanmış hücrelere ait profil altta seyrederken, ekstre uygulanmış hücrelerin hücre indisinin bu bağlı olarak da hücre canlılığının artarak üstte seyrettiğini görmekteyiz. Bu durum ekstrelerin koruyucu etkinliğe sahip olduğu hakkında ön bilgi vermektedir. Şekil 17 ve 18' e bakıldığında Fraksiyonlar için denenen en düşük doz olan 10 µg/mL' de koruyucu etkinliğin en yüksek düzeyde olduğu görülmektedir. Bu etki dozun artmasına bağlı şekilde azalmaktadır. Bu da fraksiyonların taşıdığı ana madde olan RA miktarının, ekstrelerdeki oranla arttığı için hücreler üzerindeki toksik etkinin artması şeklinde yorumlanabilir.

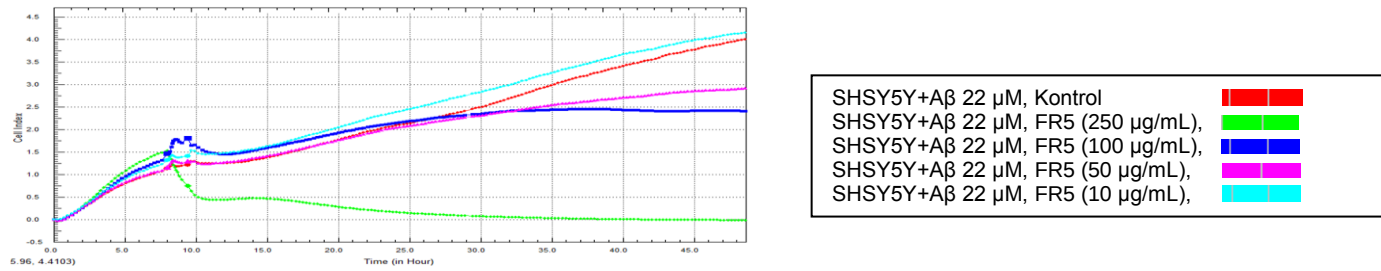
Şekil 19' da gene eğrinin 30. saate kadar olan kısmı incelendiğinde RA' nın 100 µg/mL dozda kontrol eğrisiyle birlikte gittiği, ilerleyen saatlerde diğer SB 216763 ve 50 µg/mL dozda RA' nın hücre indisinde azalma gözlenirken, RA' nın 100 µg/mL dozuna ait hücre indeksi eğrisinde artış görülmeye devam etmiştir.



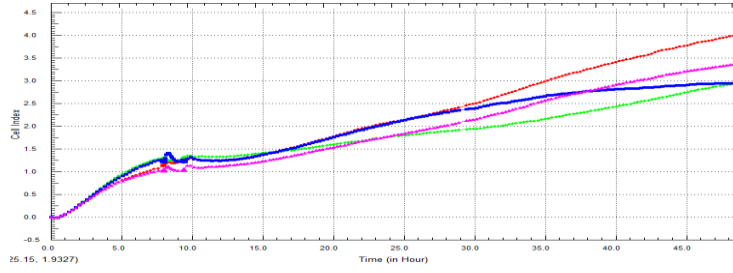
Şekil 16. SHNBU ve SRNBU ekstrelerinin Aβ 22 µM ile muamele edilmiş hücreler üzerine etkisi



Şekil 17. SHNBU-FR4 ekstresinin Aβ 22 µM ile muamele edilmiş hücreler üzerine etkisi



Şekil 18. SRNBU-FR5' in Aβ 22 µM ile muamele edilmiş hücreler üzerine etkisi

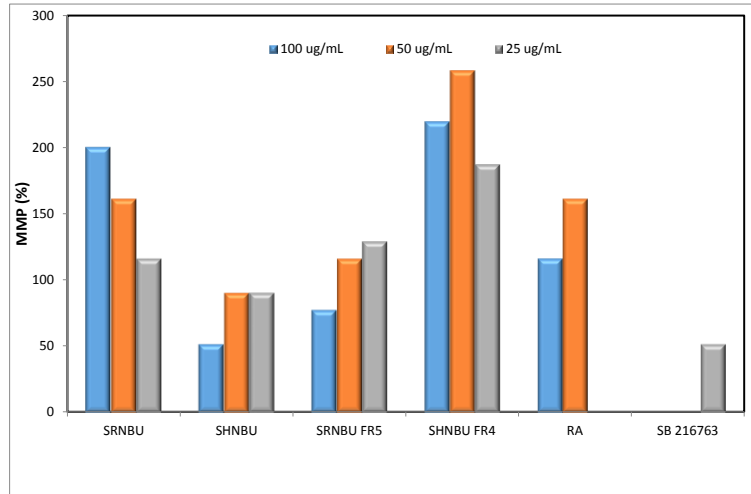


SHSY5Y+Aβ 22 μM, Kontrol
 SHSY5Y+Aβ 22 μM, SB 216763 5 uM,
 SHSY5Y+Aβ 22 μM, RA (100 μg/mL)
 SHSY5Y+Aβ 22 μM, RA (50 μg/mL)

Şekil 19. Rozmarinik asit, SB 216763 bileşiklerinin Aβ 22 μM ile muamele edilmiş hücreler üzerine etkisi

4.1.4 Ekstre ve Fraksiyonların Mitokondriyal Membran Potansiyeline Etkilerinin Ölçülmesi

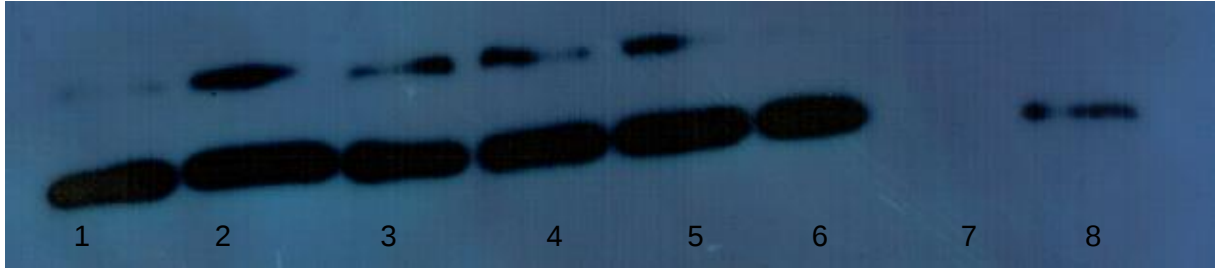
Ekstre ve fraksiyonlarda gözlenen koruyucu etkinliğin mekanizmasını araştırmak amacıyla, SHNBU, SRNBU ve SHNBU-FR4 ve SRNBU-FR5' in hücreler üzerinde mitokondriyal membran potansiyeline etkileri ölçülmüş ve sonuçlar Şekil 20' de verilmiştir.



Şekil 20. *S. huberi*, *S. rosifolia* n-BuOH ekstreleri ve Etkili Fraksiyonlarının MMP üzerine etkileri

Mitokondriyal membran potansiyeli mitokondrial fonksiyonun önemli bir göstergesi olup, mitokondrial hiperpolarizasyon ATP üretimini azaltmak suretiyle hücre ölümüne neden olabilmektedir. Çalışmamızda SHNBU-FR4 ve rozmarinik asit kullanılan her üç dozda da mitokondriyal membran potansiyelini artırmıştır. SRNBU ise yine doza bağımlı bir artış gösterirken SRNBU-FR5 mitokondriyal membran potansiyelini değiştirmemiştir.

4.1.5. Enzim Ekspresyon Düzeylerinin Ölçülmesi



(1: Kontrol, 2: SRNBU, 3: SHNBU-FR4, 4. SRNBU-FR5, 5: SHNBU, 7: SB216763, 8: RA)

Şekil 21. Western Blot deneyinde elde edilen GAPDH (Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) proteinlerinin film görüntüsü.

GAPDH proteini hücrelerde eşit miktarda olması beklenen bir proteindir. Western blot deneyinde jeldeki her kuyuya yüklenen protein lizatlarındaki GAPDH miktarı normalize edildikten sonra GSK-3 β proteininin miktarı karşılaştırılmıştır.

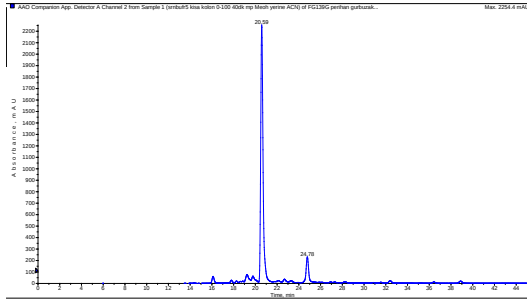
Filmdeki görüntülerin yorumlanabilmesi için image j programı kullanılmıştır. SB 216763 ve rozmarinik asit gruplarında kuyulara yüklenen protein miktarları görüntülenecek düzeye ulaşamamıştır. Bu yüzden hesaplamalara katılmamıştır.

GSK-3 β miktarındaki değişimler image j programında piksel yoğunluğuna göre bir hesaplama yöntemiyle karşılaştırıldığında; SRNBU ekstresi GSK-3 β miktarını kontrole göre %7 artırmıştır. SHNBU-FR4, SRNBU-FR5, SHNBU ekstreleri ise GSK-3 β miktarını kontrole göre sırasıyla %50, % 13, % 18 oranında azaltmıştır.

4.2. Kromatografik Çalışmalar

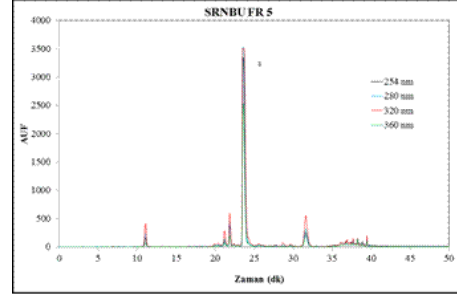
4.2.1. HPLC ve LC-MS/MS çalışmaları

Kromatografik çalışmalarda her iki aktivite testinde en yüksek aktiviteye sahip olan SRNBU-FR5 ve SHNBU-FR4' ün içerikleri HPLC ve LC-MS/MS gerçekleştirilmiş, buna göre hem HPLC hem LC-MS/MS çalışmalarında en fazla miktarda olan maddenin rozmarinik asit olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca her iki fraksiyon üzerinde izolasyon çalışmaları gerçekleştirilerek, RA izole edilerek saflaştırılmıştır.



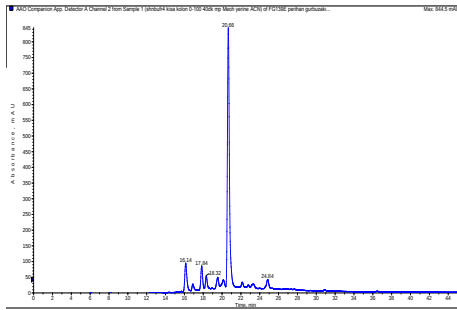
(20:59: rozmarinik asit ve dimeri, 24.78: metil rozmarinat)

Şekil 22. SRNBU-FR5' in LC-MS/MS kromatogramı ve taşıdığı maddeler



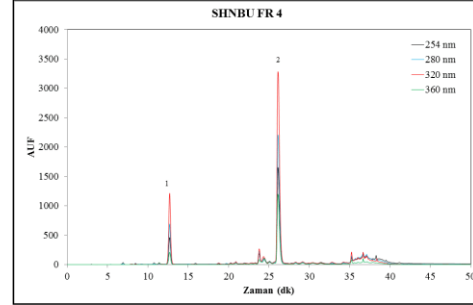
(1: Rozmarinik asit)

Şekil 23. SRNBU-FR5' in HPLC kromatogramına göre içerdiği maddeler



(16.4= kafeik asit, 16.7= luteolin/kemferol rutinozit, 17.8= luteolin /kemferol glikozit, 18.32= luteolin/kemferol glukronit, **20.66 Ana pik = rozmarinik asit**, 24.84= metil rozmarinat)

Şekil 24. SHNBU-FR4' ün LC-MS/MS kromatogramı ve taşıdığı maddeler

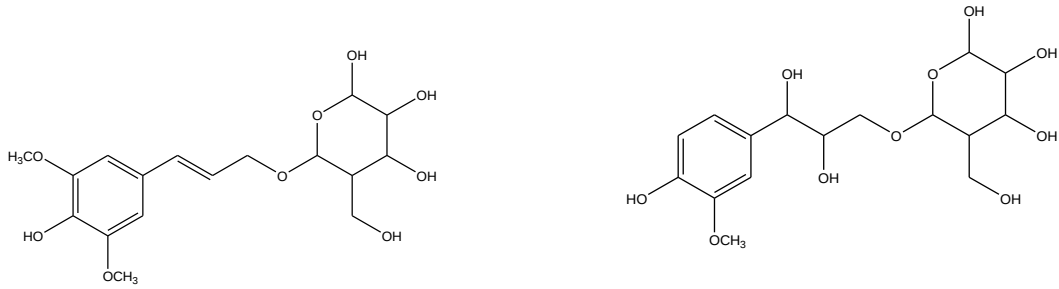


[1: Kafeik Asit ($788,55 \pm 0,54 \mu\text{g/g}$ ekstre, 2: Rozmarinik Asit ($7477,17 \pm 16,96 \mu\text{g/g}$ ekstre)]

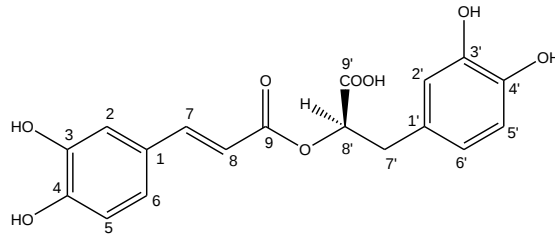
Şekil 25. SHNBU-FR4' ün HPLC kromatogramına göre içerdiği maddeler ve miktarları

4.2.2. İzolasyon ve yapı tayin çalışmaları

n-BuOH ekstrelerinden Poliamit kolon kromatografisi kullanılarak(%100 H₂O→% 100 MeOH) elde edilen ana fraksiyonlar olan SRNBU-FR5 ve SHNBU-FR4' ten önce Sephadex LH-20 ile (MeOH) ardından Sigel [80:20:2 (CHCl₃:MeOH: H₂O)] kullanılarak gerçekleştirilen açık kolon kromatografisi kullanılarak gerçekleştirilen izolasyon çalışmalarında İTK kromatogramlarına göre bu fraksiyonların taşıdığı ana madde rozmarinik asit izole edilmiştir. Rozmarinik asite ait spektral bulgular Tablo 4.1' de yer almaktadır. Bununla birlikte SRNBU-FR5' ten biri triterpen değerinin de fenolik asit türevi olduğu düşünülen 2 madde daha izole edilmiştir. Maddelerin yapı tayin çalışmaları devam etmektedir. Bu fraksiyonlar dışında kalan fraksiyonlar üzerinde de öncelikle LC-MS/MS ve HPLC çalışmaları yapılmış ve içerikleri standart maddeler ve kütüphaneler yardımıyla belirlenmiştir. Ayrıca her iki bitkinin FR-1 kodlu fraksiyonları, yani poliamit kolondan sadece suyla gelen fraksiyonlar üzerinde izolasyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Bu fraksiyonlardan iki adet 3-(4-hidroksi-3,5, dimetoksi)-fenil-2-propenil-1β-D-glukopiranozit ve Guaiacylglycerol 9-O-glukopiranozit isimli fenil etanoit glikozitleri izole edilmiş ve yapıları tayin edilmiştir. Bu iki bileşiğin yapısı Şekil 26' da verilmiştir. Proje kapsamında daha çok aktif fraksiyonlara öncelik verildiği için bu bileşiklere ait spektral bulgular ve kalan diğer fraksiyonların içerikleri ile ilgili bilgiler burada yer almamaktadır.



3-(4-hidroksi-3,5, dimetoksi)-fenil-2-propenil-1β-D-glukopiranozit Guaiacylglycerol 9-O-glukopiranozit



Rozmarinik Asit

Şekil 26. İzole edilen bileşiklerin kimyasal yapıları

Tablo 4.1 Rozmarinik Asit (**SRNBU-1**) 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 <i>d</i> (8)	C-1, C-3, C-4,C-6
6	CH	121,5	6,90 <i>d</i> (8)	
7	CH	144,2	7,35 <i>d</i> (15,7)	C-1, C-2, C-6, C-8, C-9
8	CH	115,4	6,16 <i>d</i> (15,7)	C-1, C-9
9	C	166,9		
1'	C	130,5		
2'	CH	117,3	6,65 <i>d</i> (1,5)	C-3'
3'	C	145,0		
4'	C	145,6		
5'	CH	116,6	6,58 <i>d</i> (8)	C-1', C-3', C-4'
6'	CH	120,3	6,47 <i>dd</i> (8/1,5)	C-2'
7'	CH ₂	37,8	2,74 <i>dd</i> (13,9/10,6) 3,07 <i>d</i> (13,9)	
8'	CH	76,5	4,85 <i>d</i> (10,6)	C-1', C-9, C-9'
9'	C	173,6		

5. TARTIŞMA & SONUÇ

Planlanan aktivite ve izolasyon çalışmaları için, *S. rosifolia* (1500 g) ve *S. huberi* (1280 g) bitkilerinin gölgede kurutulmuş, toz edilmiş kısımları 37 °C’ de MeOH ile (2.5 L x 5) ekstre edilmiştir. MeOH ekstreleri süzülerek birleştirilmiş ve 37 °C’ de rotary evaporatörde yoğunlaştırılmıştır [SRME (126 g, % 8.5); SHME (176 g, %11.7)]. Ham metanol ekstreleri su (350 mL) ile süspande edildikten sonra bir ayırma hunisine alınmış ve ilk olarak petrol eteri (250 mL x 8) ile partisyona tabi tutulmuştur. Petrol eteri fazı ayrıldıktan sonra kalan sulu kısım *n*-butanol (250 mL x 8) ile çalkalanmış ve ayrılmıştır. Kalan su fazı ve ayrılan iki faz da birleştirilerek rotary evaporatörde alçak basınç altında 37 °C’ de kuruluğa kadar uçurulmuş; su ve *n*-butanol fazları çalışmanın başlamasına kadar liyofilize edilmiştir (SRNBU, 24 g, SRPE, 43 g, SRS, 30 g; SHNBU, 65 g, SHPE, 25 g, SHS, 66 g)*. Hazırlanan bu ekstreler öncelikle Baki et al. (Baki vd. , 2007) yöntemi esas alınarak modifiye edilmiş GSK-3 β aktivite tayin yöntemiyle ölçülmüştür. Ekstrelelere ait sonuçlar Şekil 6 ve 8’ de verilmiştir.

Grafiklerden anlaşılacağı üzere *her* iki bitkiden hazırlanan *n*-BuOH alt ekstresinin GSK-3 β ’ yı inhibe edici özelliği doza bağımlı olarak artmakta ve kullanılan en yüksek konsantrasyonda enzimin %100’ e yakın inhibe olduğu görülmektedir. Bunun üzerine bitkilerin *n*-BuOH ekstreleri suyla çözülerek ayrı ayrı PA kolona tatbik edilmiştir. Elüsyonda çözücü 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. Elde edilen fraksiyonların miktarları tablo 3.3’ te özetlenmiştir.

Elde edilen fraksiyonlar tekrar in-vitro GSK-3 β aktivite testlerine tabi tutulmuştur. Fraksiyonlara ait sonuçlar Şekil 7 ve 9’ da verilmiştir.

Şekil 9 incelendiğinde PA kolondan %100 MeOH ile elüe edilen FR5 kullanılan en yüksek dozda enzimi tamamen inhibe etmiştir. FR5’ in denenen en düşük dozda bile açıkça diğer fraksiyonlara göre daha yüksek oranda GSK-3 β ’ yı inhibe ettiği gözlenmiştir.

Şekil 7’ ye bakıldığında ise PA kolondan %75 MeOH ile elüe edilen SHNBU-FR4’ ün diğer fraksiyonlara oranla daha yüksek inhibitör etki gösterdiği saptanmıştır. Bu sebeple *S. rosifolia*’ nın *n*-BuOH ana fraksiyonlarından SRNBU-FR5, *S. huberi n*-BuOH ana fraksiyonlarından SSNBU-FR4’ ün hücre kültür deneylerinde SHSY-5Y nöroblastoma hücrelerini A β (1-42) toksisitesinden koruyucu etkilerinin incelenmesine karar verilmiştir. En yüksek etkinlik gözlenen bu iki fraksiyonun içerdikleri maddeler, çeşitli kromatografik yöntemler (HPLC, LC-MS/MS) kullanılarak aydınlatılmıştır ve her iki fraksiyonun taşıdığı ana bileşiğin rozmarinik olduğu anlaşılmıştır. Ayrıca rozmarinik asit bu fraksiyonlardan izole edilerek yapısı tayin edilmiştir. Buna göre **Rozmarinik Asit (SRNBU-1)** Krem renkli, amorf bir toz olarak elde edilmiştir ve bileşiğinin İTK analizinde, vanilin/H₂SO₄ reaktifi kullanılarak ısıtılması sonucunda, zamanla solan pembe bir renk gözlenmiştir. Bileşiğin UV

spektrumunda ($\lambda_{\text{maks.}}$ 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 $[M]^+$ moleküler iyon piki, ^1H NMR spektrumu ve ^{13}C NMR spektrumu yardımıyla bileşiğin kapalı formülü $\text{C}_{18}\text{H}_{16}\text{O}_8$ olarak bulunmuştur.

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

SRNBU-1 bileşiğinin ^1H NMR spektrumu, fenil laktik asit bileşiğinin ^1H NMR spektrumuna benzemekle birlikte **SRNBU-1** 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.

SRNBU-1'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.

SRNBU-1 bileşiğinin yapısı, elde edilen bulgular ve literatürde kayıtlı bulguların birlikte değerlendirilmesi sonucunda **rozmarinik asit (α -O-kafeoil-3',4'-dihidroksifenilaktik asit)** olarak aydınlatılmıştır (Kelley vd. , 1976, Mehrabani vd. , 2005). Bu bulgu, *Salvia* cinsinini kemotaksonomisi açısından önem taşımaktadır; çünkü literatürde şu ana kadar *Salvia* türlerinden fenil etanoit glikoziti maddelerin izole edildiğine dair bir veri bulunmamaktadır.

Elde edilen Rozmarinik asitin yapısı doğrulandıktan sonra tek başına gösterdiği GSK-3 β inhibitör aktivite ölçülmüştür. Buna göre rozmarinik asitin GSK-3 β 'yı inhibe ettiği konsantrasyonlar ve inhibisyon dereceleri Şekil 10' da verilmiştir.

RA' nın 100 μ g/mL (~277,7 μ M) 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 fraksiyonlarda birlikte bulundukları maddelerle daha yüksek etki gösterdiğini göstermiştir.

Hücre kültür deneylerinde çalışılacak dozların belirlenmesi amacıyla SRB yöntemiyle ana ekstre, fraksiyonların ve *Salvia* türlerinde varlığı daha önce saptanmış olan çeşitli standartların hücre canlılığına etkileri ölçülmüştür ve bu sonuçlara göre hücre kültür deneylerinde kullanılacak olan toksik olmayan dozlar belirlenmiştir. Bu denemelere göre 100 μ g/mL doz toksisitenin görülmediği maksimum doz olarak belirlenmiştir.

Gerçek zamanlı hücre analizi yardımıyla, her iki bitkiye ait *n*-BuOH ekstrelerinin, SRNBU-FR5, SHNBU-FR4 ve RA' nın SHSY-5Y nöroblastoma hücreleri üzerinde koruyucu etkileri ölçülmüştür (Şekil 16, 17, 18, 19). Bu deneyler 45 saat boyunca izlenmiştir. Ancak 30. saatten sonra kuyucuklardaki konfluensin de artmasıyla eğride görülen değişiklikler dikkate alınmamıştır.

Şekil 16' ya bakıldığında ana ekstrelerin doza bağımlı etkilerinin olduğunu 100 μ g/mL' de daha etkin olduklarını söyleyebiliriz. SHNBU-FR4 ve SRNBU-FR5' in koruyucu etkileri incelendiğinde ise (Şekil 17, 18) 10 μ g/ mL dozlarda koruyucu daha yüksek olduğu görülmektedir. Fraksiyonların dozunun artmasıyla koruyucu etkinliğin de azaldığı görülmektedir. Bunun sebebinin dozun artmasıyla oluşan toksisite olduğu düşünülebilir. Yüksek konsantrasyonlarda ise toksik olduğu görülmüştür. SRNBU-FR5 ve SHNBU-FR4' ün ana maddesi olan RA' nın etkisi tek başına etkinliği incelendiğinde ise (Şekil 19) A β (1-42) toksisitesi üzerine anlamlı bir etkinliğini olmadığını görülmektedir. Bu sonuçlara göre GSK-3 β aktivite deneyleriyle paralellik göstermekte ve ekstrelerde görülen aktivite fraksiyonlama ve saflaştırma ile azalmaktadır. Bu sonuçlar bize ayrıca hücre kültür denemelerinde GSK-3 β inhibisyonu dışında diğer koruyucu mekanizmaların da rol oynayabileceğini göstermiştir.

Ekstre ve fraksiyonlarda gözlenen koruyucu etkinliğin mekanizmasını araştırmak amacıyla, SHNBU, SRNBU ve SHNBU-FR4 ve SRNBU-FR5' in hücreler üzerinde mitokondriyal membran potansiyeline etkileri ölçülmüş ve sonuçlar Şekil 20' de verilmiştir.

Mitokondriyal membran potansiyeli mitokondrial fonksiyonun önemli bir göstergesi olup, mitokondriyal hiperpolarizasyon yeterince ATP üretilmemesi ve ATP ilişkili hücre içi mekanizmaların yerine getirilememesi nedeni ile hücre ölümüne yol açan önemli faktörlerden birisidir. Nörodejeneratif hastalıklarda mitokondriyal disfonksiyon geliştiğine dair birçok çalışma mevcuttur (Canevari vd. , 1999, Parks vd. , 2001, Abramov vd. , 2004, Shi vd. , 2014). Bu çalışmalarda amiloid beta toksisitesinin mitokondriyal membran potansiyelini azalttığı özellikle Complex 4 aktivitesini azalttığı gösterilmiştir. Bu durum hücre içi kalsiyum dengesinin bozulması ve NF-kappaB yolağı gibi birçok mekanizma ile ilişkilendirilmiştir. Bizim çalışmamızda ise GSK-3beta ile ilişkili olup olmadığı araştırılmıştır. Çalışmanın sonuçlarına göre SHNBU Fr4 ve rozmarinik asit kullanılan her üç dozda da mitokondriyal membran potansiyelini artırmıştır. SRNBU ise yine doza bağımlı bir artış gösterirken SRNBU Fr5 mitokondriyal membran potansiyelini değiştirmemiştir. Gerçekleştirilen *in vitro* GSK-3 β aktivite deneyleri sonucunda hem SHNBU Fr 4 ve hem de SRNBU Fr5 enzimi güçlü bir şekilde inhibe etmesi nedeni ile amiloid beta toksisitesi deneylerinde hücre kültüründe mitokondriyal fonksiyonla ve hücre canlılığı ile ilişkisi aydınlatılmaya çalışılmıştır. SHNBU Fr4 gerçekleştirilen western blotlama deneylerinde de GSK-3beta enzimi %50 oranında inhibe ederken SRNBU Fr5 %13 oranında inhibisyon yapabilmektedir. Bu sonuçlar mitokondriyal membran potansiyeli deneyleri ile paralellik göstermektedir. Rozmarinik asit ise *in vitro* enzim aktivitesi deneylerinde tek başına yeterli inhibisyon yapamazken mitokondriyal membran potansiyelini hücre kültürü ortamında artırmıştır. Hücre canlılığı deneyleri ile mitokondriyal fonksiyon ve GSK-3 beta aktivitesi arasındaki ilişki incelendiğinde SHNBU ve SRNBU ana ekstraktlarda hücre indeksinin özellikle 100ug/mL dozunda arttığı, SHNBU-FR4 ve SRNBU-FR5' in koruyucu etkileri incelendiğinde ise (Şekil 17, 18) 10 μ g/ mL dozlarda koruyucu daha yüksek olduğu görülmektedir.

Bu proje çalışması kapsamında Farmakognozik açıdan incelenen *S. huberi* ve *S. rosifolia* bitkilerinin GSK-3 β 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. Bu çalışmayla izole edilen iki fenetil glikoziti bileşik, *Salvia* türlerinden ilk defa izole edilmiştir ve bu iki bileşik *Salvia* kemotaksonomisi açısından önem arz etmektedir.

Bütün deney sonuçları incelendiğinde SHNBU Fr4 'ün hem *in vitro* ortamda tama yakın güçlü bir şekilde GSK-3beta inhibisyonu yaptığı, hem hücre kültürü ortamında western blot deneyleri sonucunda %50 civarında GSK-3beta protein ekspresyonunu azalttığı, mitokondriyal membran potansiyelini artırdığı ve bütün bu mekanizmalar sonucunda da hücre canlılığı deneylerinde amiloid beta toksisitesinde gerçek zamanlı hücre analizi yapıldığında en güçlü protektif etkinin yine SHNBU Fr4'e ait olduğu sonucuna varılmıştır.

Fraksiyonların ise rozmarinik asit açısından zengin olduğu ancak rozmarinik asitin tek başına değil Fraksiyon içerisindeki diğer maddelerle birlikte olması durumunda daha etkili koruyucu etkiye sahip olduğu kanaatine varılmıştır.

HPLC ve LC-MS/MS ile tespit edilen kimyasal içeriğe bakılırsa fenolik yapıda bileşiklerin büyük bir kısmının aynı fraksiyonda toplanmış olması, *S. huberi*, *S. rosifolia* ekstre ve fraksiyonlarının uygun formülasyonları halinde Alzheimer tedavisinde yardımcı rol oynayabileceğini düşündürmüştür.

Doğu Anadolu bölgesi'nde geniş yayılım gösteren bu iki endemik bitkinin zengin fenolik içeriği sebebiyle ilaç adayı moleküllerin elde edilmesinde potansiyel bir kaynak olarak düşünülebilir.

Referanslar

Abramov, A. Y., L. Canevari ve M. R. Duchen (2004). " β -amyloid peptides induce mitochondrial dysfunction and oxidative stress in astrocytes and death of neurons through activation of NADPH oxidase", *The Journal of neuroscience* 24(2), 565-575.

Akhondzadeh, S., M. Noroozian, M. Mohammadi, S. Ohadinia, A. H. Jamshidi ve M. Khani (2003). "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), 863-866.

Akhondzadeh, S., M. Noroozian, M. Mohammadi, S. Ohadinia, A. H. Jamshidi ve M. Khani (2003). "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.

Baki, A., A. Bielik, L. Molnár, G. Szendrei ve G. M. Keserü (2007). "A high throughput luminescent assay for glycogen synthase kinase-3 β inhibitors", *Assay and drug development technologies* 5(1), 75-84.

Baytop, T. (1999). *Türkiye' de Bitkiler ile Tedavi (Geçmişte ve Bugün)*. İstanbul, Nobel Tıp Kitabevleri.

Brühlmann Corinne, M. A., Hostettmann Kurt, Carrupt Pierre-Alain, Testa Bernard (2004). "Screening of Non-Alkaloidal Natural Compounds as Acetylcholinesterase Inhibitors", *Chemistry & Biodiversity* 1, 819-829.

Canevari, L., J. B. Clark ve T. E. Bates (1999). " β -Amyloid fragment 25–35 selectively decreases complex IV activity in isolated mitochondria", *FEBS letters* 457(1), 131-134.

Durairajan, S. S. K., Q. Yuan, L. Xie, W.-S. Chan, W.-F. Kum, I. Koo, C. Liu, Y. Song, J.-D. Huang, W. L. Klein ve M. Li (2008). "Salvianolic acid B inhibits A β fibril formation and disaggregates preformed fibrils and protects against A β -induced cytotoxicity", *Neurochemistry International* 52(4–5), 741-750.

Eckert, G. P. (2010). "Traditional used Plants against Cognitive Decline and Alzheimer Disease", *Frontiers in Pharmacology* 1.

Eldar-Finkelman, H. ve A. Martinez (2011). "GSK-3 inhibitors: preclinical and clinical focus on CNS", *Frontiers in Molecular Neuroscience* 4.

Eser, P. (2007). *Salvia trichoclada* Benth. Üzerinde Farmakognozik Araştırmalar. Master M.Sc., Hacettepe University.

Hamann, M., D. Alonso, E. Martín-Aparicio, A. Fuertes, M. J. Pérez-Puerto, A. Castro, S. Morales, M. L. Navarro, M. del Monte-Millán, M. Medina, H. Pennaka, A. Balaiah, J. Peng, J. Cook, S. Wahyuono ve A. Martínez (2007). "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), 1397-1405.

Houghton, P. J. ve M. J. Howes (2005). "Natural Products and Derivatives Affecting Neurotransmission Relevant to Alzheimer's and Parkinson's Disease", *Neurosignals* 14(1-2), 6-22.

Howes, M.-J. R. ve P. J. Houghton (2003). "Plants used in Chinese and Indian traditional medicine for improvement of memory and cognitive function", *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 75(3), 513-527.

Howes, M.-J. R., N. S. L. Perry ve P. J. Houghton (2003). "Plants with traditional uses and activities, relevant to the management of Alzheimer's disease and other cognitive disorders", *Phytotherapy Research* 17(1), 1-18.

Huang, S.-H., C.-M. Lin ve B.-H. Chiang (2008). "Protective effects of *Angelica sinensis* extract on amyloid β -peptide-induced neurotoxicity", *Phytomedicine* 15(9), 710-721.

Iuvone, T., D. De Filippis, G. Esposito, A. D'Amico ve A. A. Izzo (2006). "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), 1143-1149.

Kahraman Ahmet , B. S., Karabacak Ersin , Doğan Musa ,Doğan Hakan Mete ,Uysal İsmet , Celep Ferhat (2012). "Reassessment of conservation status of the genus *Salvia* (Lamiaceae) in Turkey II", *Turkish journal of Botany* 36(1-22).

Kelley, C. J., R. C. Harruff ve M. Carmack (1976). "Polyphenolic acids of *Lithospermum ruderae*. II. Carbon-13 nuclear magnetic resonance of lithospermic and rosmarinic acids", *The Journal of Organic Chemistry* 41(3), 449-455.

Kennedy, D. O., F. L. Dodd, B. C. Robertson, E. J. Okello, J. L. Reay, A. B. Scholey ve C. F. Haskell (2011). "Monoterpenoid extract of sage (*Salvia lavandulaefolia*) with cholinesterase

inhibiting properties improves cognitive performance and mood in healthy adults", *Journal of Psychopharmacology* 25(8), 1088-1100.

Kimura, T., H. Hayashida, M. Murata ve J. Takamatsu (2011). "Effect of ferulic acid and *Angelica archangelica* extract on behavioral and psychological symptoms of dementia in frontotemporal lobar degeneration and dementia with Lewy bodies", *Geriatrics & gerontology international* 11(3), 309-314.

Kiyoshi, K. (2010). "Effects of ferulic acid and *Angelica archangelica* extract (Feruguard) in patients with Alzheimer's disease", *Alzheimer's and Dementia* 6(4, Supplement), S548.

Koh, S.-H., M. Y. Noh ve S. H. Kim (2008). "Amyloid-beta-induced neurotoxicity is reduced by inhibition of glycogen synthase kinase-3", *Brain Research* 1188(0), 254-262.

Koistinaho, J., T. Malm ve G. Goldsteins (2011). "Glycogen Synthase Kinase-3 β : A Mediator of Inflammation in Alzheimer's Disease?", *International Journal of Alzheimer's Disease* 2011.

Koistinaho, J., T. Malm ve G. Goldsteins (2011). "Glycogen synthase kinase-3 β : a mediator of inflammation in Alzheimer's disease?", *International Journal of Alzheimer's Disease* 2011.

Kolak Ufuk, H. I., Öztürk Mehmet, Özgökçe Fevzi, Topçu Gülaçtı, Ulubelen Ayhan (2009). "Antioxidant and anticholinesterase constituents of *Salvia pocalata*", *Turkish journal of Chemistry* 33, 813-823.

Lei, P., S. Ayton, A. I. Bush ve P. A. Adlard (2011). "GSK-3 in Neurodegenerative Diseases", *International Journal of Alzheimer's Disease* 2011.

Lin, H. Q., M. T. Ho, L. S. Lau, K. K. Wong, P. C. Shaw ve D. C. C. Wan (2008). "Anti-acetylcholinesterase activities of traditional Chinese medicine for treating Alzheimer's disease", *Chemico-Biological Interactions* 175(1–3), 352-354.

Liu, P., Y. Hu, D.-H. Guo, B.-R. Lu, K. Rahman, L.-H. Mu ve D.-X. Wang (2010). "Antioxidant activity of oligosaccharide ester extracted from *Polygala tenuifolia* roots in senescence-accelerated mice", *Pharmaceutical Biology* 48(7), 828-833.

Liu, T., H. Jin, Q.-R. Sun, J.-H. Xu ve H.-T. Hu (2010). "The neuroprotective effects of tanshinone IIA on β -amyloid-induced toxicity in rat cortical neurons", *Neuropharmacology* 59(7–8), 595-604.

Liu, X., K. Xu, M. Yan, Y. Wang ve X. Zheng (2010). "Protective effects of galantamine against A β -induced PC12 cell apoptosis by preventing mitochondrial dysfunction and endoplasmic reticulum stress", *Neurochemistry International* 57(5), 588-599.

Martinez, A. ve D. I. Perez (2008). "GSK-3 Inhibitors: A Ray of Hope for the Treatment of Alzheimer's Disease?", *Journal of Alzheimer's Disease* 15(2), 181-191.

Mehrabani, M., N. Ghassemi, E. S. A. Ghannadi ve M. Shams-Ardakani (2005). "Main phenolic compound of petals of *Echium amoenum* Fisch. and CA Mey., a famous medicinal plant of Iran", *DARU Journal of Pharmaceutical Sciences* 13(2), 65-69.

Ming-Ke Tang, J.-T. Z. (2001). "Salvianolic acid B inhibits fibril formation and neurotoxicity of amyloid beta-protein in vitro", *Acta Pharmacologica Sinica* 22(4), 380-384.

Ono, K., K. Hasegawa, H. Naiki ve M. Yamada (2004). "Curcumin has potent anti-amyloidogenic effects for Alzheimer's β -amyloid fibrils in vitro", *Journal of Neuroscience Research* 75(6), 742-750.

Ono, K., M. Hirohata ve M. Yamada (2005). "Ferulic acid destabilizes preformed β -amyloid fibrils in vitro", *Biochemical and Biophysical Research Communications* 336(2), 444-449.

Orhan, I., M. Kartal, Q. Naz, A. Ejaz, G. Yilmaz, Y. Kan, B. Konuklugil, B. Şener ve M. Iqbal Choudhary (2007). "Antioxidant and anticholinesterase evaluation of selected Turkish *Salvia* species", *Food Chemistry* 103(4), 1247-1254.

Orhan, I. E., F. S. Senol, N. Ozturk, G. Akaydin ve B. Sener (2012). "Profiling of in vitro neurobiological effects and phenolic acids of selected endemic *Salvia* species", *Food Chemistry* 132(3), 1360-1367.

Parks, J. K., T. S. Smith, P. A. Trimmer, J. P. Bennett ve W. D. Parker (2001). "Neurotoxic A β peptides increase oxidative stress in vivo through NMDA-receptor and nitric-oxide-synthase mechanisms, and inhibit complex IV activity and induce a mitochondrial permeability transition in vitro", *Journal of neurochemistry* 76(4), 1050-1056.

Perez, D. I., V. Palomo, C. n. Pérez, C. Gil, P. D. Dans, F. J. Luque, S. Conde ve A. Martínez (2011). "Switching Reversibility to Irreversibility in Glycogen Synthase Kinase 3 Inhibitors: Clues for Specific Design of New Compounds", *Journal of Medicinal Chemistry* 54(12), 4042-4056.

Perry, N. S. L., C. Bollen, E. K. Perry ve C. Ballard (2003). "Salvia for dementia therapy: review of pharmacological activity and pilot tolerability clinical trial", *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 75(3), 651-659.

Rao, K. V., M. S. Donia, J. Peng, E. Garcia-Palomero, D. Alonso, A. Martinez, M. Medina, S. G. Franzblau, B. L. Tekwani, S. I. Khan, S. Wahyuono, K. L. Willett ve M. T. Hamann (2006). "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), 1034-1040.

Rhein, V., M. Giese, G. Baysang, F. Meier, S. Rao, K. L. Schulz, M. Hamburger ve A. Eckert (2010). "Ginkgo Biloba Extract Ameliorates Oxidative Phosphorylation Performance and Rescues A β -Induced Failure", *PLoS ONE* 5(8), e12359.

Robinson, S. R. ve G. M. Bishop (2002). "A β as a bioflocculant: implications for the amyloid hypothesis of Alzheimer's disease", *Neurobiology of Aging* 23(6), 1051-1072.

Selkoe, D. J. (2003). "Aging, amyloid, and Alzheimer's disease: a perspective in honor of Carl Cotman", *Neurochemical research* 28(11), 1705-1713.

Senol, F. S., K. Skalicka Woźniak, M. T. H. Khan, I. Erdogan Orhan, B. Sener ve K. Głowniak (2011). "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), 462-467.

Senol, F. S., K. S. Woźniak, M. T. H. Khan, I. E. Orhan, B. Sener ve K. Głowniak (2011). "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), 462-467.

Serenó, L., M. Coma, M. Rodríguez, P. Sánchez-Ferrer, M. B. Sánchez, I. Gich, J. M. Agulló, M. Pérez, J. Avila, C. Guardia-Laguarta, J. Clarimón, A. Lleó ve T. Gómez-Isla (2009). "A novel GSK-3 β inhibitor reduces Alzheimer's pathology and rescues neuronal loss in vivo", *Neurobiology of Disease* 35(3), 359-367.

Shi, C., X. Zhu, J. Wang ve D. Long (2014). "Intromitochondrial I κ B/NF- κ B signaling pathway is involved in amyloid β peptide-induced mitochondrial dysfunction", *Journal of bioenergetics and biomembranes* 46(5), 371-376.

Şenol, F. S., I. Orhan, F. Celep, A. Kahraman, M. Doğan, G. Yilmaz ve B. Şener (2010). "Survey of 55 Turkish *Salvia* taxa for their acetylcholinesterase inhibitory and antioxidant activities", *Food Chemistry* 120(1), 34-43.

Takashima, A., K. Noguchi, G. Michel, M. Mercken, M. Hoshi, K. Ishiguro ve K. Imahori (1996). "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.

Tildesley, N. T. J., D. O. Kennedy, E. K. Perry, C. G. Ballard, S. Savelev, K. A. Wesnes ve A. B. Scholey (2003). "*Salvia lavandulaefolia* (Spanish Sage) enhances memory in healthy young volunteers", *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 75(3), 669-674.

Verdile, G., S. Fuller, C. S. Atwood, S. M. Laws, S. E. Gandy ve R. N. Martins (2004). "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.

Zeng, K.-W., H. Ko, H. O. Yang ve X.-M. Wang (2010). "Icariin attenuates β -amyloid-induced neurotoxicity by inhibition of tau protein hyperphosphorylation in PC12 cells", *Neuropharmacology* 59(6), 542-550.

Zhang, Z., R. Zhao, J. Qi, S. Wen, Y. Tang ve D. Wang (2011). "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), 437-447.

Zhang, Z., R. Zhao, J. Qi, S. Wen, Y. Tang ve D. Wang (2011). "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), 437-447.

Zhou, Y., W. Li, L. Xu ve L. Chen (2011). "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), 443-452.