

T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

***PRUNELLA VULGARIS L.* ve ETKİLİ BİLEŞİKLERİNİN
ALZHEİMER HASTALIĞINDA NÖROPROTEKTİF
ETKİLERİNİN *IN VITRO* YÖNTEMLERLE ARAŞTIRILMASI**

Biyomüh. Halime Eda YALÇIN

**Farmakognozi Programı
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**ANKARA
2024**

T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

PRUNELLA VULGARIS L. ve ETKİLİ BİLEŞİKLERİNİN
ALZHEİMER HASTALIĞINDA NÖROPROTEKTİF
ETKİLERİNİN *IN VITRO* YÖNTEMLERLE ARAŞTIRILMASI

Biyomüh. Halime Eda YALÇIN

Farmakognozi Programı
YÜKSEK LİSANS TEZİ

TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. İclal SARAÇOĞLU

ANKARA
2024

**PRUNELLA VULGARIS L. ve ETKİLİ BİLEŞİKLERİNİN ALZHEİMER
HASTALIĞINDA NÖROPROTEKTİF ETKİLERİNİN IN VITRO
YÖNTEMLERLE ARAŞTIRILMASI**

Öğrenci: Biyomüh. Halime Eda YALÇIN

Danışman: Prof. Dr. İclal SARAÇOĞLU

Bu tez çalışması 18 Nisan 2024 tarihinde jürimiz tarafından “Farmakognozi Programı” nda yüksek lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı: *Prof. Dr. A. Ahmet BAŞARAN*

(Başkent Üniversitesi)

Tez Danışmanı: *Prof. Dr. İclal SARAÇOĞLU*

(Hacettepe Üniversitesi)

Üye: *Prof. Dr. Ayşe UZ*

(Hacettepe Üniversitesi)

Bu tez Hacettepe Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri tarafından uygun bulunmuştur.

Prof. Dr. Müge YEMİŞCİ ÖZKAN

Enstitü Müdürü

YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI

Enstitü tarafından onaylanan lisansüstü tezimin/raporumun tamamını veya herhangi bir kısmını, basılı (kağıt) ve elektronik formatta arşivleme ve aşağıda verilen koşullarla kullanıma açma iznini Hacettepe Üniversitesine verdiğimi bildiririm. Bu izinle Üniversiteye verilen kullanım hakları dışındaki tüm fikri mülkiyet haklarım bende kalacak, tezimin tamamının ya da bir bölümünün gelecekteki çalışmalarda (makale, kitap, lisans ve patent vb.) kullanım hakları bana ait olacaktır.

Tezin kendi orijinal çalışmam olduğunu, başkalarının haklarını ihlal etmediğimi ve tezimin tek yetkili sahibi olduğumu beyan ve taahhüt ederim. Tezimde yer alan telif hakkı bulunan ve sahiplerinden yazılı izin alınarak kullanılması zorunlu metinlerin yazılı izin alınarak kullandığımı ve istenildiğinde suretlerini Üniversiteye teslim etmeyi taahhüt ederim.

Yükseköğretim Kurulu tarafından yayınlanan **“Lisansüstü Tezlerin Elektronik Ortamda Toplanması, Düzenlenmesi ve Erişime Açılmasına İlişkin Yönerge”** kapsamında tezim aşağıda belirtilen koşullar haricince YÖK Ulusal Tez Merkezi / H.Ü. Kütüphaneleri Açık Erişim Sisteminde erişime açılır.

- Enstitü / Fakülte yönetim kurulu kararı ile tezimin erişime açılması mezuniyet tarihimden itibaren 2 yıl ertelenmiştir. ⁽¹⁾
- Enstitü / Fakülte yönetim kurulunun gerekçeli kararı ile tezimin erişime açılması mezuniyet tarihimden itibaren 6 ay ertelenmiştir. ⁽²⁾
- Tezimle ilgili gizlilik kararı verilmiştir. ⁽³⁾

18/04/24

Biyomüh. Halime Eda YALÇIN

¹“Lisansüstü Tezlerin Elektronik Ortamda Toplanması, Düzenlenmesi ve Erişime Açılmasına İlişkin Yönerge”

- (1) Madde 6. 1. Lisansüstü teze ilgili patent başvurusu yapılması veya patent alma sürecinin devam etmesi durumunda, tez danışmanının önerisi ve enstitü anabilim dalının uygun görüşü üzerine enstitü veya fakülte yönetim kurulu iki yıl süre ile tezin erişime açılmasının ertelenmesine karar verebilir.
- (2) Madde 6. 2. Yeni teknik, materyal ve metotların kullanıldığı, henüz makaleye dönüşmemiş veya patent gibi yöntemlerle korunmamış ve internetten paylaşılması durumunda 3. şahıslara veya kurumlara haksız kazanç imkanı oluşturabilecek bilgi ve bulguları içeren tezler hakkında tez danışmanının önerisi ve enstitü anabilim dalının uygun görüşü üzerine enstitü veya fakülte yönetim kurulunun gerekçeli kararı ile altı ayı aşmamak üzere tezin erişime açılması engellenebilir.
- (3) Madde 7. 1. Ulusal çıkarları veya güvenliği ilgilendiren, emniyet, istihbarat, savunma ve güvenlik, sağlık vb. konulara ilişkin lisansüstü tezlerle ilgili gizlilik kararı, tezin yapıldığı kurum tarafından verilir *. Kurum ve kuruluşlarla yapılan işbirliği protokolü çerçevesinde hazırlanan lisansüstü tezlere ilişkin gizlilik kararı ise, ilgili kurum ve kuruluşun önerisi ile enstitü veya fakültenin uygun görüşü üzerine üniversite yönetim kurulu tarafından verilir. Gizlilik kararı verilen tezler Yükseköğretim Kuruluna bildirilir.
Madde 7.2. Gizlilik kararı verilen tezler gizlilik süresince enstitü veya fakülte tarafından gizlilik kuralları çerçevesinde muhafaza edilir, gizlilik kararının kaldırılması halinde Tez Otomasyon Sistemine yüklenir

* Tez danışmanının önerisi ve enstitü anabilim dalının uygun görüşü üzerine enstitü veya fakülte yönetim kurulu tarafından karar verilir.

ETİK BEYAN

Bu çalışmada bütün bilgi ve belgeleri akademik kurullar çerçevesinde elde ettiğimi, görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu, kullandığım verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı, yararlandığım kaynaklara bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu, tezimin kaynak gösterilen durumlar dışında özgün olduğunu, Prof. Dr. İclal SARAÇOĞLU danışmanlığında tarafımdan üretildiğini ve Hacettepe Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Yönergesine göre yazıldığını beyan ederim.

Biyomüh. Halime Eda YALÇIN

TEŞEKKÜR

Tez çalışmalarım süresince bilgi ve tecrübesiyle bana yol gösteren, tüm aşamalardaki olağanüstü desteği ve anlayışı ile hep yanımda olan, beraber çalışma şansı ve onuruna eriştiğim çok kıymetli hocam Prof. Dr. İclal SARAÇOĞLU' na,

Tez çalışmalarım sırasında uygun ortam ve şartların oluşmasını sağlayan, desteklerini esirgemeyen önceki Anabilim Dalı Başkanımız Prof. Dr. Funda Nuray YALÇIN'a ve şu anda görevine devam eden Prof. Dr. Ayşe UZ'a,

Çalışmalarım boyunca bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım, bitkinin toplaması ve tayinini gerçekleştiren, tezimin deney aşamalarından yazım aşamalarına kadar her türlü desteğini, sevgisini ve eşsiz sabrını benden esirgemeyen çok değerli hocalarım Dr. Öğr. Üyesi Vahap Murat KUTLUAY ve Dr. Öğr. Üyesi Zeynep DOĞAN'a,

İzole ettiğim bileşiklerin, NMR analizleri ve kütle analizlerinin yapılmasını sağlayan Prof. Dr. Toshiaki MAKINO'ya, Assoc.Prof. Kan'ichiro ISHIUCHI (Nagoya City University-Japonya)'ya;

Çalışmalarım sırasında, 1001- Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Projelerini Destekleme Programı tarafından Yüksek Lisans Bursiyeri olarak desteklediğim 121S491 no'lu 'Alzheimer Hastalığında Kullanılabilecek Yeni Bir Doğal Kaynak: *Prunella vulgaris* L. ve Etkin Bileşikleri' konulu projede tezime olan katkılarından dolayı TÜBİTAK'a,

Bu süreçte manevi desteklerini her an hissettiren ve motivasyonumun artmasında büyük katkıları olan canım arkadaşlarıma, her koşulda varlıklarına şükrettiğim sevgili aileme ve tez yazım sürecimde bütün stresimi benden uzaklaştıran ve geceler boyunca yanımda nöbet tutan kedim Üzüm'e teşekkür ederim.

Halime Eda YALÇIN

ÖZET

Yalçın HE., *Prunella vulgaris* L. ve Etkili Bileşiklerinin Alzheimer Hastalığında Nöroprotektif Etkilerinin *in vitro* Yöntemlerle Araştırılması, Hacettepe Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Farmakognozi Programı Yüksek Lisans Tezi, Ankara, 2024. Alzheimer hastalığı (AH), çözünebilir amiloid türlerinin çözünmeyen amiloid plaklar halinde toplanmasının oksidatif stresi artırarak sinir hücrelerinde nöroenflamasyon ve kolinerjik sinapslarda fonksiyon bozukluklarına yol açması sonucu gelişen ve ilerleyici bilişsel bozukluk ile kendini gösteren bir hastalıktır. Günümüzde hastalığın tedavisinin sınırlı sayıda ilaç ile yalnızca semptomatik tedavi uygulanabiliyor olması, yeni ilaç moleküllerinin bulunmasını önemli kılmaktadır. AH için kullanılan en etkili ilaçların bitkisel kökenli olmaları da dikkate alındığında, bitkilerin yeni ilaç molekülü arama çalışmalarında önemli bir kaynak oldukları düşünülmektedir. Buradan yola çıkarak, ülkemizde son derece yaygın olup halk arasında özellikle iltihap giderici olarak dahili kullanılışı bulunan ve ayrıca; rozmarinik asit başta olmak üzere, antioksidan ve antiinflamatuvar özellikleri nedeniyle AH üzerine de etkili olabileceği düşüncesiyle bazı çalışmalara konu olmuş çok sayıda fenolik asit içeren, *Prunella vulgaris* L. bitkisinin AH tedavisindeki rolü, *in vitro* yöntemler ile araştırılmıştır. Bitkinin sulu etanollü ekstresinin ve izole edilen saf bileşiklerin AH üzerindeki olası nöroprotektif etkilerinin tayini için SH-SY5Y (insan nöroblastoma) hücrelerinde H₂O₂ ile oluşturulmuş nörotoksisite modeli kullanılmıştır. Bu amaçla, öncelikle *P. vulgaris*'in toprak üstü kısımlarının %80 etanollü ekstresinden çeşitli kromatografik yöntemlerle toplam 5 bileşik izole edilmiş ve 1D-,2D-NMR ve kütle spektroskopisi yöntemlerinden yararlanarak rozmarinik asit (**P-1**), ursolik asit (**P-2**), kemferol-3-*O*-rutinozit (**P-3**), kersetin 3-*O*-glukozit (**P-4**) ve rutin (**P-5**) olarak aydınlatılmıştır. H₂O₂ (500 µM) uygulanan hücrelerin yaşam oranının %40'a düştüğü belirlenmiş; rozmarinik asit, ursolik asit ve rutinin 10 µM konsantrasyonda, H₂O₂'nin neden olduğu bu hücre hasarını azaltarak hücre yaşam oranını sırasıyla % 54, % 63 ve % 73'e çıkardığı tespit edilmiştir. Ekstre kullanıldığında ise 50 µg/ml konsantrasyonda hücre canlılığının % 92'ye ulaştığı görülmüştür. Bunlara ilave olarak; ekstre ve saf bileşiklerin asetilkolinesteraz ve bütirilkolinesteraz enzimlerine karşı inhibitör etkileri de araştırılmış, bütirilkolinesteraz enzim inhibisyonları incelendiğinde; rozmarinik asit ve ursolik asit'in enzim %50'sini inhibe eden konsantrasyonları (IC₅₀) sırasıyla 15,65 ve 42,68 µM olarak bulunmuştur. Tez çalışmamız, *Prunella* türlerinin geleneksel kullanımını destekleyen ve nöroprotektif etkilerini kanıtlayan sonuçları ile literatüre katkıda bulunması açısından önem arz etmektedir.

Anahtar Kelimeler: Alzheimer hastalığı, Nöroprotektif, Nöroenflamasyon, *Prunella vulgaris* L., Lamiaceae, İzolasyon, Fenolik asitler, *in vitro* yöntemler.

Destekleyen Kuruluşlar : TÜBİTAK (1001 Programı, Proje No: 121S491)

ABSTRACT

Yalçın HE., Investigation on the Potential Neuroprotective Effects of *Prunella vulgaris* L. and Its Active Compounds Against Alzheimer's disease using *in vitro* methods. Hacettepe University Graduate School of Health Sciences Pharmacognosy Program Master Thesis, Ankara, 2024. Alzheimer's disease (AD) manifests as a progressive cognitive disorder, precipitated by the accumulation of soluble amyloid species into insoluble amyloid plaques. This aggregation increases oxidative stress, leading to neuroinflammation in neuronal cells and functional disturbances at cholinergic synapses. Current therapeutic measures for AD are confined to a limited number of drugs offering only symptomatic relief, thus highlighting the importance of discovering new drug molecules. Given that the most effective drugs for AD are of plant origin, plants are considered significant resources in the search for new drug molecules. Considering that the most effective drugs used for AH are of plant origin, plants are thought to be an important source in the search for new drug molecules. Based on this, the role of *Prunella vulgaris* L., a plant containing numerous phenolic acids that has been widely used in our country, especially internally as an anti-inflammatory agent as a folk medicine, and additionally, has been the subject of some studies due to its antioxidant and anti-inflammatory properties, in the treatment of AH has been investigated using *in vitro* methods. H₂O₂-induced neurotoxicity model in SH-SY5Y (human neuroblastoma) cells were used to determine the potential neuroprotective effects of the aqueous ethanolic extract and isolated pure compounds on AD. For this purpose, a total of 5 compounds were isolated from the aerial parts of *P. vulgaris* using various chromatographic methods from an 80% ethanolic extract. These compounds were elucidated as rosmarinic acid (**P-1**), ursolic acid (**P-2**), kaempferol-3-O-rutinoside (**P-3**), quercetin 3-O-glucoside (**P-4**), and rutin (**P-5**) by means of NMR and mass spectrometry techniques. It was determined that the viability of cells treated with H₂O₂ (500 µM) decreased to 40%. Rosmarinic acid, ursolic acid, and rutin at a concentration of 10 µM each were found to alleviate this cell damage induced by H₂O₂, increasing cell viability to 54%, 63%, and 73%, respectively. When the extract was used, it was observed that cell viability reached 92% at a concentration of 50 µg/ml. In addition, the inhibitory effects of the extract and pure compounds on acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase enzymes were investigated. When the inhibition of butyrylcholinesterase enzyme was examined, the concentrations (IC₅₀) of rosmarinic acid and ursolic acid inhibiting 50% of the enzyme were found to be 15.65 and 42.68 µM, respectively. The results obtained are important in terms of contributing to the literature with evidence supporting the traditional use of *Prunella* species and their neuroprotective effects.

Keywords: Alzheimer's Disease, Neuroprotective, Neuroinflammation, *Prunella vulgaris* L., Lamiaceae, Isolation, Phenolic Acids, *in vitro*.

Supporter Foundations: TÜBİTAK (1001 Program, Project No: 121S491)

İÇİNDEKİLER

ONAY SAYFASI	Error! Bookmark not defined.
YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI	iv
ETİK BEYAN	v
TEŞEKKÜR	vi
ÖZET	vii
ABSTRACT	viii
İÇİNDEKİLER	ix
SİMGELER VE KISALTMALAR	xi
ŞEKİLLER	xiv
TABLolar	xvi
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Botanik Bilgiler	4
2.1.1. Lamiaceae (Labiatae) Familyası	4
2.1.2. <i>Prunella</i> L. cinsi	4
2.1.3. <i>Prunella vulgaris</i> L.	5
2.1.4. Yayılış ve Habitat	6
2.2. <i>Prunella</i> Türleri Üzerinde Yapılan Çalışmalar	7
2.2.1. <i>Prunella</i> Türleri Üzerindeki Fitokimyasal Çalışmalar	7
2.2.2. <i>Prunella</i> L. Türlerinin Kullanılışları ve Biyolojik Etkileri	22
3. GEREÇ VE YÖNTEM	35
3.1. Fitokimyasal Çalışmalar	35
3.1.1. Bitkisel Materyal	35
3.1.2. Kromatografik Yöntemler	35
3.1.3. Ekstraksiyon ve İzolasyon Çalışmaları	39
3.2. Biyolojik Etki Çalışmaları	44
3.2.1. Asetilkolinesteraz (AChE) ve Bütilkolinesteraz (BChE) İnhibisyonu	44
3.2.2. SH-SY5Y Hücrelerinde Nöroprotektif Etkinin Belirlenmesi	45
3.3. İstatiksel Analiz Yöntemi	45
3.4. Fitokimyasal ve Biyolojik Etki Çalışmalarında Kullanılan Aletler	46
4. BULGULAR	47

4.1. Fitokimyasal Çalışmalara Ait Bulgular	47
4.2. Biyolojik Etki Çalışmalarına Ait Bulgular	87
4.2.1. Asetilkolinesteraz (AChE) ve Bütilkolinesteraz (BChE) İnhibisyon Çalışmasına Ait Bulgular	88
4.2.2. SH-SY5Y Hücrelerinde Nöroprotektif Etkinin Belirlenmesine Ait Bulgular	90
5. TARTIŞMA	93
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	104
7. KAYNAKLAR	106
8. EKLER	115
EK-1: Tez Orjinallik Raporu	
EK-2: Tez Çalışması Dijital Makbuzu	
9. ÖZGEÇMİŞ	117

SİMGELER VE KISALTMALAR

µg	Mikrogram
¹³C NMR	¹³ C Nükleer Manyetik Rezonans
¹H NMR	¹ H Nükleer Manyetik Rezonans
ABTS	2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolin-6-sülfonik asit)
ACE2	Anjiyotensin dönüştürücü enzim 2
Ach	Acetylcholine (Asetilkolin)
AChE	Asetilkolinesteraz
AH	Alzheimer Hastalığı
Aβ	Amiloid-β
Bax	Bcl-2-associated X protein
BchE	Bütirikolinesteraz
Bcl-2	B-cell lymphoma 2
CD₃OD	Dötero metanol
CH₃OH	Metanol
CHCl₃	Kloroform
COSY	Correlated Spectroscopy
COX-2	Siklooksijenaz-2
d	Dublet
dd	Dublet Dublet
DEPT	Distortionless Enhancement by Polarization Transfer
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimetilsülfoksit
DPPH	2,2-Difenil-1-pikrilhidrazil
dsDNA	Çift Zincirli DNA
ELISA	Enzim Bağlı İmmünosorbent Analizi (Enzyme- Linked Immuno Sorbent Assay)
EtOAc	Etil asetat
EtOH	Etanol
FBS	Fetal Sığır Serumu
Fr.	Fraksiyon
g	Gram

Glu	Glukoz
H₂O₂	Hidrojen peroksit
Hela37	İnsan Servikal Epidermoid Karsinoma
HIV	İnsan Bağışıklık Yetmezlik Virüsü
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Correlation
HMQC	Heteronuclear Multiple Quantum Correlation
HPLC	Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi
HSQC	Heteronuclear Single Quantum Correlation
HSV	Herpes Simpleks Virüsü
IC₅₀	Half Maximal Inhibitory Concentration
iNOS	İndüklenebilir Nitrik Oksit Sentaz
İTK	İnce Tabaka Kromatografisi
LPS	Lipopolisakkarit
m	Multiplet
MeOH	Metanol
mg	Miligram
mL	Mililitre
mRNA	Mesajcı Ribonükleik Asit
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolyum bromür
NF-κB	Nükleer Factor Kappa-B
NMR	Nükleer Manyetik Rezonans
NO	Nitrik oksit
PBS	Phosphate Buffered Saline
PGE₂	Prostaglandin E ₂
Prep. İTK	Preparatif İnce Tabaka Kromatografisi
qPCR	Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RA	Rozmarinik asit
Ram	Ramnoz
RP	Ters Faz
ScoV-2	SARS-koronavirüs-2
SH-SY5Y	İnsan Nöroblastoma Hücre Hattı
SOD	Süperoksit Dismutaz

t	Triplet
TNF-α	Tümör Nekroz Faktörü Alfa
UA	Ursolik Asit
UV	Ultraviyole
VSK	Vakum Sıvı Kromatografisi
Western Blot	Protein İmmünoblot
WST-1	(2-(4-iyodofenil)-3-(4- nitrofenil)-5-(2,4-disülfobenzil)-2H-tetrazolium, monosodyum tuzu)
μM	Mikromolar

ŞEKİLLER

Şekil	Sayfa
2.1. <i>P. vulgaris</i> L.	6
3.1. Sulu ekstreye ait İTK plağı (A) ve İTK plağının UV-366 (B) ‘daki görüntüsü.	40
3.2. Toprak Üstü Kısımları Üzerinde Yapılan Fraksiyonlandırma Çalışması.	42
3.3. <i>P.vulgaris</i> ’in toprak üstü kısımları üzerinde yapılan izolasyon çalışmaları	43
4.1. Rozmarinik asit (P-1)’in ¹ H NMR spektrumu (CD ₃ OD, 500 MHz)	51
4.2. Rozmarinik asit (P-1) ‘in ¹³ C NMR spektrumu (CD ₃ OD, 125 Hz).	52
4.3. Rozmarinik asit (P-1)’in 2D ¹ H, ¹ H-homonükleer korelasyonlu spektrumu (COSY).	53
4.4. Rozmarinik asit (P-1) ‘in 2D ¹ H, ¹³ C-heteronükleer korelasyonlu (yakın mesafe) spektrumu (HSQC).	54
4.5. Rozmarinik asit (P-1)’ in 2D ¹ H, ¹³ C-heteronükleer korelasyonlu (uzak mesafe) NMR spektrumu (HMBC).	55
4.6. Ursolik asit (P-2)’in ¹ H NMR spektrumu (CD ₃ OD, 400 MHz).	59
4.7. Ursolik asit (P-2)’in ¹³ C NMR spektrumu (CD ₃ OD, 100 MHz).	60
4.8. Ursolik asit (P-2)’in 2D ¹ H, ¹ H-homonükleer korelasyonlu spektrumu (COSY)	61
4.9. Ursolik asit (P-2)’in 2D ¹ H, ¹³ C-heteronükleer korelasyonlu (yakın mesafe) NMR spektrumu (HMQC).	62
4.10. Ursolik asit (P-2)’in 2D ¹ H, ¹³ C-heteronükleer korelasyonlu (uzak mesafe) spektrumu (HMBC).	63
4.11. Kemferol 3- <i>O</i> -rutinozit (P-3)’in ¹ H NMR spektrumu (DMSO-d ₆ , 400 MHz).	67
4.12. Kemferol 3- <i>O</i> -rutinozit (P-3)’in ¹³ C NMR spektrumu (DMSO-d ₆ , 100 MHz).	68
4.13. Kemferol 3- <i>O</i> -rutinozit (P-3)’in 2D ¹ H, ¹ H-homonükleer korelasyonlu spektrumu (COSY).	69
4.14. Kemferol 3- <i>O</i> -rutinozit (P-3)’in 2D ¹ H, ¹³ C-heteronükleer korelasyonlu (yakın mesafe) NMR spektrumu (HSQC).	70
4.15. Kemferol 3- <i>O</i> -rutinozit (P-3)’in 2D ¹ H, ¹³ C-heteronükleer korelasyonlu (uzak mesafe) NMR spektrumu (HMBC).	71
4.16. Kersetin 3- <i>O</i> -glukozit (P-4)’in ¹ H NMR spektrumu (CD ₃ OD, 500 MHz).	75
4.17. Kersetin 3- <i>O</i> -glukozit (P-4)’ in ¹³ C NMR spektrumu (CD ₃ OD, 125 MHz)	76
4.18. Kersetin 3- <i>O</i> -glukozit (P-4)’in 2D ¹ H, ¹ H-homonükleer korelasyonlu spektrumu (COSY).	77

4.19.	Kersetin 3- <i>O</i> -glukozit (P-4)'in 2D ¹ H, ¹³ C-heteronükleer korelasyonlu (yakın mesafe) NMR spektrumu (HSQC).	78
4.20.	Kersetin 3- <i>O</i> -glukozit (P-4)'in 2D ¹ H, ¹³ C-heteronükleer korelasyon (uzak mesafe) NMR spektrumu (HMBC).	79
4.21.	Rutin (P-5)'in ¹ H NMR spektrumu (DMSO-d ₆ , 400 MHz).	83
4.22.	Rutin (P-5)'in ¹³ C NMR spektrumu (DMSO-d ₆ , 100 MHz).	84
4.23.	Rutin (P-5)'in 2D ¹ H, ¹ H-homonükleer korelasyonlu spektrumu (COSY).	85
4.24.	Rutin (P-5)'in 2D ¹ H, ¹³ C-heteronükleer korelasyonlu (yakın mesafe) NMR spektrumu (HMQC).	86
4.25.	Rutin (P-5)'in 2D ¹ H, ¹³ C-heteronükleer korelasyonlu (uzak mesafe)NMR spektrumu (HMBC).	87
4.26.	Rozmarinik asit, ursolik asit, rutin ve <i>P. vulgaris</i> ekstresinin asetilkolinesteraz enzim inhibisyon değerleri.	89
4.27.	Rozmarinik asit, ursolik asit, rutin ve <i>P. vulgaris</i> ekstresinin bütirikolinesteraz enzim inhibisyon değerleri.	90
4.28.	Ekstre, rozmarinik asit, ursolik asit ve rutinin H ₂ O ₂ ile indüklenmiş SH-SY5Y hücrelerindeki hücre canlılığı üzerine etkileri. Sonuçlar ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir..	92
5.1.	Ekstre, rozmarinik asit, ursolik asit ve rutinin H ₂ O ₂ ile indüklenmiş SH-SY5Y hücrelerindeki hücre canlılığı üzerine etkileri. Sonuçlar ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir..	101

TABLOLAR

Tablo	Sayfa
2.1. <i>Prunella</i> türlerinde tespit edilen triterpenler-I.	8
2.2. <i>Prunella</i> türlerinde tespit edilen triterpenler-II.	9
2.3. <i>Prunella</i> türlerinde tespit edilen triterpenler-III.	10
2.4. <i>Prunella</i> türlerinde tespit edilen triterpenler-IV.	11
2.5. <i>Prunella</i> türlerinde tespit edilen triterpenler-V.	11
2.6. <i>Prunella</i> türlerinde tespit edilen triterpen glikozitleri-I.	12
2.7. <i>Prunella</i> türlerinde tespit edilen triterpen glikozitleri-II.	12
2.8. <i>Prunella</i> türlerinde tespit edilen steroid ve steroid glikoziti I .	15
2.9. <i>Prunella</i> türlerinde tespit edilen steroid ve steroid glikoziti II .	15
2.10. <i>Prunella</i> türlerinde tespit edilen steroid ve steroid glikoziti III .	16
2.11. <i>Prunella</i> türlerinde tespit edilen steroid ve steroid glikoziti IV .	16
2.12. <i>Prunella</i> türlerinde tespit edilen flavonol ve flavonol glikozitleri I .	18
2.13. <i>Prunella</i> türlerinde tespit edilen flavon ve flavon glikozitleri I .	19
2.14. <i>Prunella</i> türlerinde tespit edilen fenolik asitler I .	20
2.15. <i>Prunella</i> türlerinde tespit edilen fenolik asitler II .	20
2.16. <i>Prunella</i> türlerinde tespit edilen fenolik asitler III .	21
2.17. <i>Prunella</i> türlerinde tespit edilen kumarinler I .	22
2.18. <i>P. vulgaris</i> 'ten elde edilen bazı ekstraların ve bileşiklerin çeşitli kanser türlerindeki antitümör özellikleri.	31
4.1. Rozmarinik asit (P-1) 'nin ¹³ C ve ¹ H NMR spektroskopik değerleri (CD ₃ OD; ¹³ C: 125 MHz; ¹ H: 500 MHz); önemli HMBC korelasyonları.	50
4.2. Ursolik asit (P-2)'in ¹³ C ve ¹ H NMR spektroskopik değerleri (CD ₃ OD; ¹ H: 400 MHz, ¹³ C:100 MHz) önemli HMBC korelasyonları.	58
4.3. Kemferol 3- <i>O</i> -rutinozit (P-3)'in ¹³ C NMR ve ¹ H NMR spektroskopik değerleri (DMSO-d ₆ ; ¹ H: 400 MHz, ¹³ C:100 MHz); önemli HMBC korelasyonları.	66
4.4. Kersetin 3- <i>O</i> -glukozit (P-4)'in ¹³ C NMR ve ¹ H NMR spektroskopik değerleri (CD ₃ OD; ¹ H: 500 MHz, ¹³ C:125 MHz) önemli HMBC korelasyonları.	74
4.5. Rutin (P-5)'in ¹³ C NMR ve ¹ H NMR spektroskopik değerleri (DMSO-d ₆ ; ¹³ C: 100 MHz; ¹ H: 400 MHz); önemli HMBC korelasyonları.	82

4.6.	Ekstre ve saf bileşiklerin AChE enzim inhibisyonu.	89
4.7.	Ekstre ve saf bileşiklerin BChE enzim inhibisyonu.	90
5.1.	<i>P. vulgaris</i> ' ten izole edilen bileşikler.	94
5.2.	Ekstre ve saf bileşiklerin AChE enzim inhibisyonu.	98
5.3.	Ekstre ve saf bileşiklerin BChE enzim inhibisyonu.	99

1. GİRİŞ

Prunella cinsi, Lamiaceae familyasına ait çok yıllık otsu bitkileri içeren bir cinstir. Dünya genelinde yaklaşık olarak 15 *Prunella* türü bulunmaktadır ve bunlar geniş bir coğrafi alanda yayılış göstermektedir (1). Bu türler, Avrupa ve Asya'nın ılıman bölgeleri, Kuzey Amerika, kuzeybatı Afrika ve tropikal dağlık bölgelerde dağılmışlardır. Türkiye florasında ise *P. vulgaris* L., *P. orientalis* Bornm., *P. laciniata* (L.) L. ve *P. grandiflora* (L.) Scholler olmak üzere 4 türü yetişmektedir (2, 3).

Prunella türleri üzerinde yapılan çalışmalar sonucunda bu bitkilerin fitokimyasal içeriğinde; başta triterpenik saponinler ve fenolik asitler olmak üzere steroller ve sterol glikozitleri, flavonoidler, yağ asitleri, kumarinler, uçucu yağlar ve karbonhidratların bulunduğu saptanmıştır (1, 4, 5). *Prunella* türleri üzerinde yapılan biyolojik aktivite çalışmalarının sonuçlarına göre, bu türlerin antiviral (6), antibakteriyel (7), antiinflamatuvar, immünmodülatör, antioksidan, antitümör, nöroprotektif (8), antihipertansif ve hipoglisemik (9) özelliklere sahip olduğu bildirilmiştir. *Prunella* türleri arasında içerdiği zengin fenolik bileşikler bakımından ön plana çıkan *P. vulgaris* L. ülkemizde ve dünyada yaygın bir dağılım göstermektedir.

P. vulgaris, ülkemizde 'gelincikleme otu' ve 'yara otu' gibi isimlerle bilinmektedir (10). Geleneksel kullanımında özellikle antiinflamatuvar etkileri nedeniyle yararlanılmaktadır. Bu amaçla uygulanan *P. vulgaris*'in toprak üstü kısımlarının infüzyonunun; antiromatizmal etkili olduğu, soğuk algınlığı ve kardiyak bozukluklara karşı da dahili olarak kullanıldığı belirtilmiştir (11). Buna ek olarak, ateş düşürücü, ödem ve şişkinlik giderici gibi etkileri olduğu da saptanmıştır (1). Ayrıca, *P. vulgaris* bitkisinin, tiroid bezinin işlev bozukluğu (12), meme hiperplazisi (13) ve ülseratif kolit tedavisi için kullanıldığı da bazı çalışmalarda bildirilmiştir (14). Avrupa geleneksel tıbbında, *P. vulgaris*, "self-healing" (kendi kendini iyileştiren) olarak adlandırılmış ve boğaz ağrısını hafifletici, ateş düşürücü ve yara iyileşmesini hızlandırmak amacıyla uygulanmıştır (15).

P. vulgaris, Çin bitkisel ilaçlarında ve geleneksel Çin tıbbı prensiplerine dayalı olarak üretilen ilaçlarda baş ağrısı, baş dönmesi, akciğer tüberkülozu, boyun şişliği ve mastit gibi durumların tedavisinde de kullanılmaktadır (16).

Alzheimer hastalığı (AH), demans türleri arasında en yaygın olan; merkezi sinir sisteminin belirli bölgelerinde nöron ve sinaps kayıplarına bağlı olarak ortaya

çıkan; yaşa bağlı olarak artış gösteren ve zamanla ilerleyen bir nörodejeneratif hastalıktır. Bilişsel ve kognitif işlevlerdeki azalma, çeşitli davranışsal ve nöropsikiyatrik sorunlar ile karakterize olması hastalığın sadece bilişsel yönlerini değil, aynı zamanda genel yaşam kalitesini de etkileyen karmaşık bir tabloyu ortaya koymaktadır (17). AH, beyinde kolinerjik sistemdeki eksikliklerle ve amiloid-beta (A β) proteinlerinin birikmesiyle oluşan nörofibriler ağlar ve amiloid plakların oluşmasıyla tanımlanan bir hastalıktır (18). AH'de yaygın olarak bulunan nörotransmitter asetilkolin (ACh) transferaz enziminin miktarı ve işlevinin azalması, kolin geri alımının azalması, kolinerjik nöron ve aksonlarda meydana gelen hasar ve kayıplar belirgin olarak ACh seviyelerinde gözlenen düşüş miktarı ile doğru orantılıdır. AH'ye özgü tanımlanan bir diğer özelliği ise hastalığın en erken belirtilerinden biri olarak kabul edilen reaktif oksijen türleri (ROS) ürünlerinin neden olduğu oksidatif strestir. Aşırı ROS birikimi, nörotoksositeye sebep olarak pro-apoptotik aktiviteye sahip proteinlerin artışına neden olmaktadır (10).

AH'ye yönelik mevcut tedavi stratejileri üzerine yapılan incelemeler sonucunda, hastaların; zihinsel fonksiyonların sürdürülmesi, davranışsal semptomların kontrolü ve hastalık belirtilerinin yavaşlatılması durumlarında etkili olduğunu ortaya koymaktadır (19). Ancak hastalığın altında yatan temel neden kompleks bir yapıya sahip olduğu için bu hastalığı etkili bir şekilde tedavi edebilecek ilaç veya tedavi yöntemi henüz bulunmamıştır. AH tedavisinde kullanılan mevcut ilaçlar, beyindeki nörotransmitter sistemi etkileyerek ve semptomların kontrolüne yardım ederek hastanın yaşam kalitesini iyileştirmeyi hedeflemektedir (19, 20).

Alzheimer hastalığına yönelik bitkisel çözümler arama çabaları uzun bir geçmişe dayanmakta olup, günümüzde de hala önemli bir araştırma alanını oluşturmaktadır. *P. vulgaris* bitkisinin, AH'nin tedavisi için antioksidan ve antiinflamatuvar özelliklere sahip terapötik potansiyeline sahip birçok bileşik içermesine rağmen, bu bitkinin AH tedavisindeki etkilerine dair yeterli sayıda araştırma bulunmadığı bilinmektedir. Bununla birlikte; *P. vulgaris*'in içerdiği rozmarinik asit (RA) ve klorojenik asit başta olmak üzere fenolik asitler, flavonoidler ve tanshinon I gibi bileşiklerin AH üzerine olumlu etkileri olabileceğini gösteren bazı çalışmalar da mevcuttur (21-23). Özellikle rozmarinik asit üzerine yapılmış birçok çalışma, bu bileşiğin çeşitli biyolojik aktivitelerini açıkça ortaya koymaktadır. RA'nın,

antioksidan, antiinflamatuvar, antimitojenik, antianjiyojenik, antiapoptotik, antifibrotik, kemoprotektif, nöroprotektif gibi çeşitli aktivitelere sahip olduğu bazı çalışmalarda bildirilmiştir (6). RA'nın A β kaynaklı nörotoksisiteyi azalttığına dair bulgular mevcut olup, *in vitro* çalışmalarda A β 'nin neden olduğu reaktif oksijen türlerine karşı koruyucu bir etki sergilediği gözlenmiştir (4). Rozmarinik asitin asetilkolinesteraz inhibitör etkisi *in silico* incelenmiş düşük bağlanma enerjisinden nedeniyle diğer asetilkolinesteraz enzim inhibitörleri galantamin, huperzin A ve fizostigminin (sırasıyla -8.0, -7.7, -7.5 ve -7.0 kcal/mol) daha etkili bulunmuştur (24). 2009 yılında yapılan bir araştırmada, fenolik bileşiklerin A β agregasyonu üzerindeki etkileri *in vivo* olarak incelenmiş, RA'nın A β birikimini azalttığı görülmüş ve bu çalışma sonuçlarıyla birlikte ele alındığında, RA'nın AH'de tedavi edici veya hastalığı önleyici stratejiler için uygun bir aday olabileceği düşünülmüştür (4).

Bu bilgiler ışığında, *P. vulgaris*'in antiinflamatuvar etkisinden hareketle, nöroenflamasyonda da etkili olabileceği ve AH gibi nörodejeneratif hastalıklarda kullanılabileceği düşüncesi ile nöroprotektif etkilerinin *in vitro* yöntemlerle araştırılması ve etkiden sorumlu bileşiklerinin tespit edilmesi amaçlanmıştır. Rozmarinik asit gibi potansiyel biyoaktif bileşikler içeren bu bitkinin AH tedavisine yönelik doğal bir kaynak olarak değerlendirilmesi, hastalığın kontrolü için yeni ve etkili stratejiler geliştirmek açısından önemli bir adım olabileceği düşünülmüştür. Bu tez çalışmasında, *P. vulgaris*'in çiçekli toprak üstü kısımlarının % 80 etanol ekstresinin petrol eteri ile partisyonu sonunda kalan sulu fraksiyondan (sulu ekstre) çeşitli kromatografik yöntemler kullanılarak elde edilen saf bileşiklerin yapılarının 1D ve 2D-NMR yöntemleri ile tayini gerçekleştirilmiştir. Ekstrenin ve elde edilen bileşiklerin *in vitro* asetilkolinesteraz ve bütirikolinesteraz enzim inhibitör etkileri tayin edilmiştir. Ayrıca, H₂O₂ ile toksik etki (nörotoksisite) oluşturulan SH-SY5Y (insan nöroblastoma) hücrelerinde ekstre ve saf bileşiklerin hücre canlılığı üzerine olan nöroprotektif etkileri MTT yöntemi ile (24) araştırılmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Botanik Bilgiler

2.1.1. Lamiaceae (Labiatae) Familyası

Otsu bitkiler veya çalılar, genellikle salgı tüyleri taşıyan aromatik bitkiler. Lamiaceae familyasında gövde genellikle dört köşeli veya değildir. Yapraklar stipulasız, basit, nadiren parçalı, daima karşılıklı. Çiçek durumu vertisillastrum, braktelerin veya üst yaprakların koltuğundan çıkan genellikle yalancı vertisillatlar oluşturan spika, rasem veya simoz durumunda. Çiçekler hermafrodit veya ginodioik bitkilerde erkek çiçek verimsiz ve dişi fonksiyonlu. Brakteler yapraklardan farklı veya onlara benzediği zaman floral yapraklar halinde, brakteoller var veya yok. Kaliks genellikle üst-3 ve alt-2 olmak üzere 5-loblu, nadiren loblar veya dişler 1 ve 1 veya 1 ve 4 veya kaliks aktinomorf, 5-20 damarlı. Korolla gamopetal, zigomorf ve bilabiat, üst dudak belirsiz 2 loblu, falkat, dik veya az çok konkav; alt dudak 3 loblu; nadiren üst dudak küçülmüş ve alt dudak 5 loblu veya 1 üst ve 4 alt loblu veya korolla aktinomorf. Stamenler korollaya bağlı ve birlikte gelişmiş, 4, didinam, genellikle üst çift alt çiftten daha kısa veya nadiren 2 ve körelmiş; anter tekaları 2 veya bazen 1 tanesi steril ya da eksik, tekalar paralel veya birbirinden ayrı; nadiren (*Salvia*'daki gibi) uzamış konnektifler ile ayrılan. Ovaryum üst durumlu, 2 karpelli ve 4 ovüllü, 4 loblu. Stilus ginobazik veya nadiren değildir, uçta kısa bifit. Meyve 4 (nadiren daha az) kuru (çok nadir etli) nuks. Islatıldığında müsilaj var veya yok.

2.1.2. *Prunella L.* cinsi

Çok yıllık otsu bitkilerdir. Yapraklar tam, dişli, pinnatilobat ile pinnatisekt arasında. Çiçek durumu sık ovat veya spikalar uçlarda oblong, vertisilaster, genellikle 6 çiçekli. Brakteler yuvarlak, yaprak gibi değil; brakteoller yok. Kaliks tubü kampanulat, 2 dudaklı, 10 damarlı veya ağsı damarlı, meyvede kapalı veya değil; üst dudak 3 dişli, alt dudak ortadan ikiye bölünmüş 2 lanseolat loblu. Korolla 2 dudaklı, kaliksten dışarıya doğru, boğazı tüy halkası ile kaplı; üst dudak dik, tam; alt dudak ise 3 loblu, ortadaki lob çukur, dişli. Stamenler 4 adet, dışarı uzamış, alt çift daha uzun;

filamentler uç kısmında bölünmüş, bir dal üzerinde 2 farklı anter tekası, diğer dal ise kısa yay şeklinde kıvrılmış subulat eklentili veya değil. Stilus dalları eşit. Nukulalar yumurtamsıdan eliptiğe, tabanda akut beyaz karunkula, uçta obtus (2).

Prunella türlerine ait tayin anahtarı

1.Korolla sarımsı beyaz veya krem renğinde (nadiren leylak); bitki ± yoğun sert tüylü.

3.laciniata

1.Korolla koyu mor-mavi veya leylak renğinde (nadiren saf beyaz); bitki tüysüz, nadiren tüylü veya sert tüylü

1. Bitki tüysüz veya nadiren tüylü; yapraklar tam.

1. vulgaris

2. Bitki yoğun sert tüylü; yapraklar loblu veya dişli, nadiren hemen hemen bütün.

2. orientalis

2.1.3. *Prunella vulgaris* L.

Gövde dik veya yükselici, 6-40 cm. Yapraklar (en üstteki çift hariç) saplı, ovattan oblonga, obtus, tam veya hafif oymalı, bazen pinnatisekt, tüysüz veya tüylü (sert tüylü değil). Çiçek durumu kapitat veya kısa spika. Brakteler kırmızımsıdan siyahımsı-mora kadar, kenarlar kirpiksi. Kaliks 2 loblu alt dudaklı, üst dudak kesik 3 mukronat dişli; yan ve orta dişler arasındaki boşluk daire şeklinde. Korolla koyu mor veya lavanta mavisi (nadiren saf beyaz), 9-15 mm çapında. Fındıkçıklar 1,8 x 1,1 mm, karunkula hariç (2).

Çiçeklenme zamanı: Mayıs-Eylül

Habitat: Tarlalar, ormanlar, yol kenarları, nemli kıyılar vb., genellikle akarsuların kenarları.

Yükseklik: deniz seviyesinden - 2900 m

2.1.4. Yayılış ve Habitat

A1(E) Çanakkale: Gelibolu, Angadere, Ingoldby 469. **A2(E)** İstanbul: Bahçeköy, 14 Haziran 1896, Nemetz **A2(A)** Bursa: Uludağ, 870 m, 6 Ağustos 1972. **A3** Bolu: Bolu'nun 50 km doğusunda, 1300 m yükseklikte, Uotila 20010 **A4** Çankırı: Ilgaz Dağı, Jenkins 2187 **A5** Sinop: Ince Burun, deniz seviyesi, Tobey 1091 **A7** Giresun: Espiye'nin 10 km doğusunda, 10 m, Uotila 19826 **A8** Rize: Rize'nin 8 km batısında, Buttler 16211 **A9** Çoruh: Hopa, s.l., D.29821 **B1** Balıkesir: Kaz Dağları, Kareikos, Sint. 1883:478 **B3** Eskişehir: Kara kütük, 1350 m, Ekim 654 **B4** Ankara: Ankara, Bornm. 1892:3103 **B5** Kayseri: Erciyes Dağı, Tekir Y., 2200 m, Haziran 1902, Zederbauer **B6** Malatya: Arapkirten Kemaliye 5.km, 960 m, Hub.-Mor. 10581 **B7** Tunceli: Ovacık, 1400 m, D. 31491 **B8** Muş: Çaylar, 1600 m, D. 46367 **B9** Bitlis: Reşadiye'den Kotum'a, 1900 m, D. 22426 **C1** Aydın: Güzelçamli, 220 m, Uslu 4286 **C2** Denizli: Taş ocağı, D. 13262 **C3** Antalya: Elmalı'dan Finike'ye, Khan ve ark. 213 **C4** Konya: Karaman, Andrasovzsky 927. **C5** İçel: Mersin ile Kadıncık barajı arası, Uslu 1060 **C6** Adana: Osmaniye, Olukbeli, 800 m, Akman 7673 **C8** Mardin: Binibil, Sint. 1888:1178 **C10** Hakkari: Sat Dağı, 2600 m, Duncan & Tait 136 Is: Samos, W. of Leka, 200-400 m, Runem. & Snog. 18953 Rodhos, Fiori 427.



Şekil 2.1. *P. vulgaris* L. (Fotoğraf: Dr. Öğr. Üyesi Vahap Murat Kutluay)

2.2. *Prunella* Türleri Üzerinde Yapılan Çalışmalar

2.2.1. *Prunella* Türleri Üzerindeki Fitokimyasal Çalışmalar

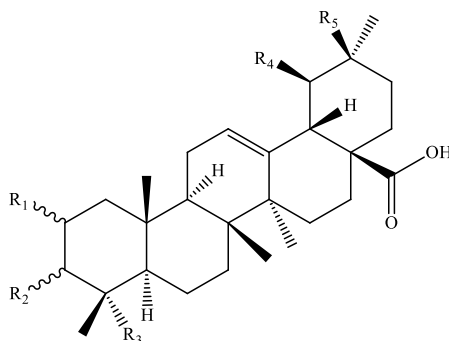
Bu bölümde, *Prunella* türleri üzerinde yapılmış olan fitokimyasal çalışmalara ait bulgular, çalışılan bileşiklerin gruplarına göre; uçucu yağlar, triterpenler, steroller, flavonoidler, fenolik asitler ve basit fenoller olarak 5 ana başlık altında sunulmuş ve çoğunlukla tablolar halinde sunulmaya çalışılmıştır.

Tablolar oluşturulurken aynı temel yapıya sahip bileşikler için ortak bir iskelet kullanılmış, tablolardaki ana iskeletlere uymayan bileşikler ise ayrıca verilmiştir. Bileşiklerin isimlendirilmesinde literatürdeki isimlendirilmeleri esas alınmış ve Türkçe isimler kullanılmaya çalışılmıştır.

Uçucu Yağlar

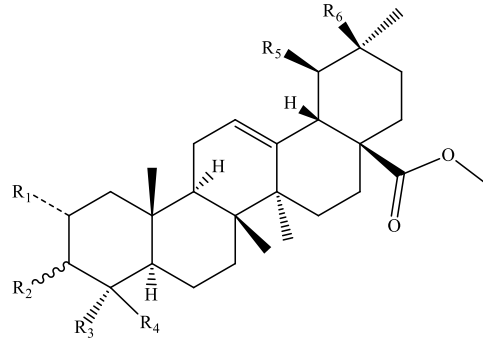
P. vulgaris ile yapılan uçucu yağ analizinde bitkinin ana bileşenlerinin 1,8-sineol (%44,8), β -pinen (%15,7) ve linalil asetat (%4,1) olduğu tespit edilmiştir (25). Ayrıca, *P. vulgaris*' in toprak üstü kısımlarının uçucu yağ analizinde ana bileşenler 1,8-ökaliptol , β -pinen, mirsen, linalil asetat, α -felandren ve linalol olarak belirlenmiştir (26). *P. vulgaris* spikalarının uçucu yağ analizinde; α -bourbonen (%11,5) , geranil asetat (%5,2) , α -bergapten (% 2,8) içerdiği gözlenmiştir (27). *P. vulgaris* 'in çiçeklerinin uçucu yağ analizinde selin-11-en-4- α -ol (%14,9), cis-eudesma-6,11-dien (%9,4) ve spathulenol (%5,8) ve germakren D (%5,1) olarak belirlenmiştir (25). *P. grandiflora*'nın uçucu yağ analizinde ana bileşenleri linalol (%7) terpinen-4-ol (%3,2) ve mentol (%3) olarak tespit edilmiştir (28). Bu kısım, tez çalışmamız kapsamında olmadığı için ayrıntılı bilgi verilmemiştir.

Triterpenler



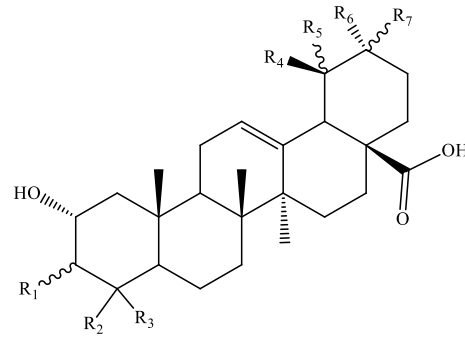
Tablo 2.1. *Prunella* türlerinde tespit edilen triterpenler-I.

Bileşik	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	Bitki	Kaynak
Oleanolik asit	H	β-OH	CH ₃	H	CH ₃	<i>P. vulgaris</i> <i>P. vulgaris</i> var. <i>lilacina</i>	(1, 29-31) (1, 32)
Ursolik asit	H	β-OH	CH ₃	CH ₃	H	<i>P. vulgaris</i> <i>P. vulgaris</i> var. <i>lilacina</i>	(1, 30, 33) (32)
2α-hidroksioik asit	α-OH	β-OH	CH ₃	H	CH ₃	<i>P. vulgaris</i>	(30)
2α,3α-dihidroksiolik-12-en-28-oik asit	α-OH	α-OH	CH ₃	H	CH ₃	<i>P. vulgaris</i>	(30)
2α-Hidroksi ursolik asit	α-OH	β-OH	CH ₃	CH ₃	H	<i>P. vulgaris</i>	(30)
2α,3α-dihidroksiurs-12-en-28-oik asit	α-OH	α-OH	CH ₃	CH ₃	H	<i>P. vulgaris</i> <i>P. vulgaris</i> var. <i>lilacina</i>	(29, 30) (32)
2α,3β-dihidroksiurs-12-en-28-oik asit	α-OH	β-OH	CH ₃	CH ₃	H	<i>P. vulgaris</i> var. <i>lilacina</i>	(32)
2α,3α,23-trihidroksiurs-12-en-28-oik asit	α-OH	β-OH	CH ₂ O H	CH ₃	H	<i>P. vulgaris</i> <i>P. vulgaris</i> var. <i>lilacina</i>	(30) (32)



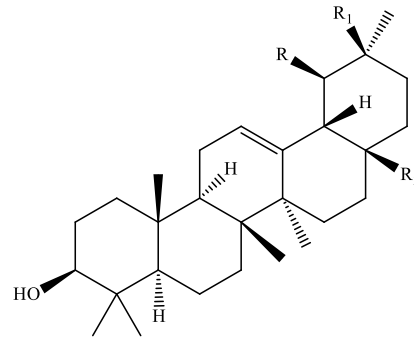
Tablo 2.2. *Prunella* türlerinde tespit edilen triterpenler-II.

Bileşik	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	R ₆	Bitki	Kaynak
Metil ursolat	H	β-OH	CH ₃	CH ₃	CH ₃	H	<i>P. vulgaris</i> <i>P. vulgaris</i> var. <i>lilacina</i>	(34) (35)
Metil oleanolat	H	β-OH	CH ₃	CH ₃	H	CH ₃	<i>P. vulgaris</i> <i>P. vulgaris</i> var. <i>lilacina</i>	(34) (35)
Metil 2α,3α-dihidroksiurs-12-en-28-oat	OH	α-OH	CH ₃	CH ₃	CH ₃	H	<i>P. vulgaris</i> <i>P. vulgaris</i> var. <i>lilacina</i>	(34) (35)
Metil 3-epimazlinat	OH	α-OH	CH ₃	CH ₃	H	CH ₃	<i>P. vulgaris</i> var. <i>lilacina</i>	(35)
Metil 2α-hidroksiursolat	OH	β-OH	CH ₃	CH ₃	CH ₃	H	<i>P. vulgaris</i> <i>P. vulgaris</i> var. <i>lilacina</i>	(34) (35)
Metil mazlinat	OH	β-OH	CH ₃	CH ₃	H	CH ₃	<i>P. vulgaris</i> <i>P. vulgaris</i> var. <i>lilacina</i>	(34) (35)
Metil 2α,3α,23-trihidroksiolean-12-en-28-oat	OH	α-OH	CH ₃	CH ₂ OH	H	CH ₃	<i>P. vulgaris</i> var. <i>lilacina</i>	(35)
Metil 2α,3α,24-trihidroksiolean-12-en-28-oat	OH	α-OH	CH ₂ OH	CH ₃	H	CH ₃	<i>P. vulgaris</i> <i>P. vulgaris</i> var. <i>lilacina</i>	(34) (35)



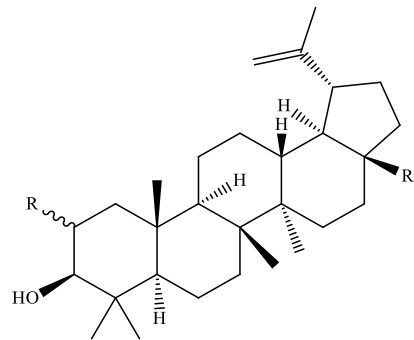
Tablo 2.3. *Prunella* türlerinde tespit edilen triterpenler-III.

Bileşik	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	R ₆	R ₇	Bitki	Kaynak
2 α ,3 α ,19 α -trihidroksiurs-12-en-28-oik asit	α -OH	CH ₃	CH ₃	CH ₃	α -OH	CH ₃	H	<i>P. vulgaris</i> var. <i>lilacina</i>	(32)
Maslinik asit	β -OH	CH ₃	CH ₃	H	H	CH ₃	CH ₃	<i>P. vulgaris</i> var. <i>lilacina</i>	(32)
2 α ,3 α ,19 α ,23-tetrahidroksiurs-12en-28oik asit	α -OH	CH ₂ OH	CH ₃	CH ₃	α -OH	CH ₃	H	<i>P. vulgaris</i> var. <i>lilacina</i>	(32)
2 α ,3 β ,24-trihidroksiilea-12en-28oik asit	β -OH	CH ₃	CH ₂ OH	H	H	CH ₃	CH ₃	<i>P. vulgaris</i> var. <i>lilacina</i>	(32)
2 α ,3 α ,24-trihidroksiurs-12,20(30)-dien-28-oik asit	α -OH	CH ₃	CH ₂ OH	CH ₃	H	CH ₂		<i>P. vulgaris</i> var. <i>lilacina</i>	(32)
2 α ,3 α ,24-trihidroksiilea-12en-28oik asit	α -OH	CH ₃	CH ₂ OH	H	H	CH ₃	CH ₃	<i>P. vulgaris</i> var. <i>lilacina</i>	(32)



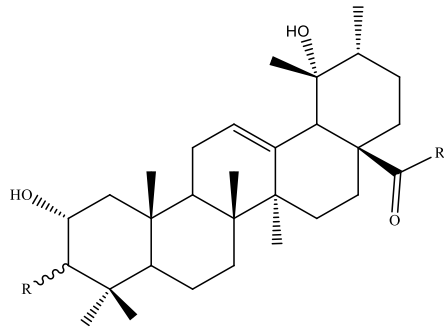
Tablo 2.4. *Prunella* türlerinde tespit edilen triterpenler-IV.

Bileşik	R	R ₁	R ₂	Bitki	Kaynak
Uvaol	CH ₃	H	CH ₂ OH	<i>P. vulgaris</i>	(3)
β-amirin	H	CH ₃	CH ₃	<i>P. vulgaris</i>	(1,6)



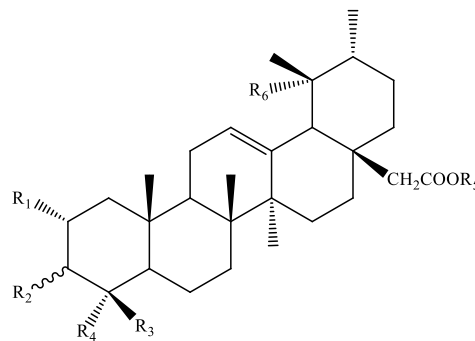
Tablo 2.5. *Prunella* türlerinde tespit edilen triterpenler-V.

Bileşik	R	R ₁	Bitki	Kaynak
Betulik asit	H	COOH	<i>P. vulgaris</i>	(26)
Lupeol	H	CH ₃	<i>P. vulgaris</i>	(30)
2α,3β-Dihidroksi-lup-20(29)-en	α-OH	CH ₃	<i>P. vulgaris</i>	(30)



Tablo 2.6. *Prunella* türlerinde tespit edilen triterpen glikozitleri-I.

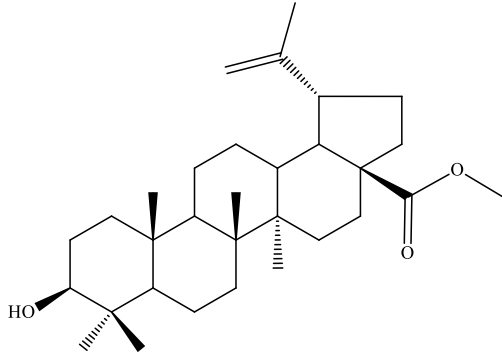
Bileşik	R	R ₁	Bitki	Kaynak
2 α ,3 β ,19 α ,24-tetrahidroksiurs-12en-28oik asit 28-O-D-glukopiranozit	β -OH	Glu	<i>P. vulgaris</i> var. <i>lilacina</i>	(32, 35)
2 α ,3 α ,19 α ,24-tetrahidroksiurs-12en-28oik asit 28-O-D-glukopiranozit	α -OH	Glu	<i>P. vulgaris</i> var. <i>lilacina</i>	(32, 35)
Prunulozit A	α -OH	Glu (1-6) Glu	<i>P. vulgaris</i> var. <i>lilacina</i>	(32, 35)



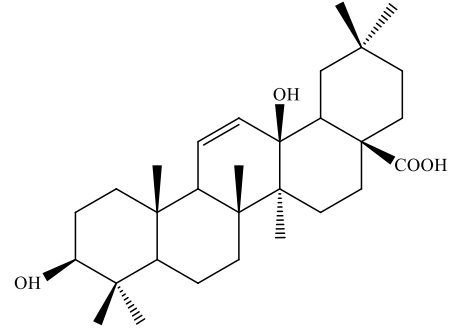
Tablo 2.7. *Prunella* türlerinde tespit edilen triterpen glikozitleri-II.

Bileşik	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	R ₆	Bitki	Kaynak
Urson	H	β -OH	CH ₃	CH ₃	H	H	<i>P. vulgaris</i>	(29)
2 α ,3 α ,24-trihidroksiurs-12-en-28-oik asit-28- β -D-glukopiranozit	OH	α -OH	CH ₃	CH ₂ OH	Glu	H	<i>P. vulgaris</i>	(29)
2 α ,3 β ,19 α ,24-tetrahidroksiurs-12-en-28-oik asit-28- β -D-glukopiranozit	OH	β -OH	CH ₃	CH ₂ OH	Glu	OH	<i>P. vulgaris</i>	(29)
2 α ,3 α ,19 α -trihidroksiurs-12-en-28-oik asit-28- β -D-glukopiranozit	OH	α -OH	CH ₃	CH ₃	Glu	OH	<i>P. vulgaris</i>	(29)
2 α ,3 α ,19 α -trihidroksiurs-12-en-28-oik asit-28- β -D-glukopiranozil-(1 \rightarrow 2)- β -D-glukopiranozit	OH	α -OH	CH ₃	CH ₃	Glu (1-2) Glu	OH	<i>P. vulgaris</i>	(29)
Rotundik asit 28-O- α -D-glukopiranozil (1 \rightarrow 6)- β -D-glukopiranozit	H	β -OH	OH	CH ₃	Glu (1-2) Glu	OH	<i>P. vulgaris</i>	(29)

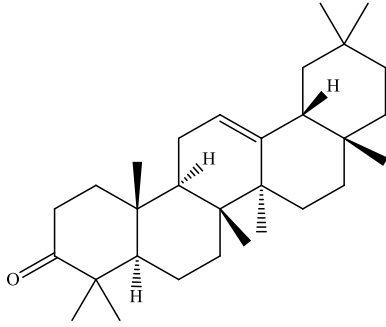
-Diğer Triterpenler



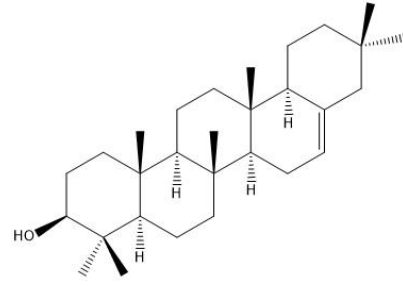
Bileşik Metil betulinat
Bitki *P. vulgaris* var. *lilacina*
Kaynak (34)



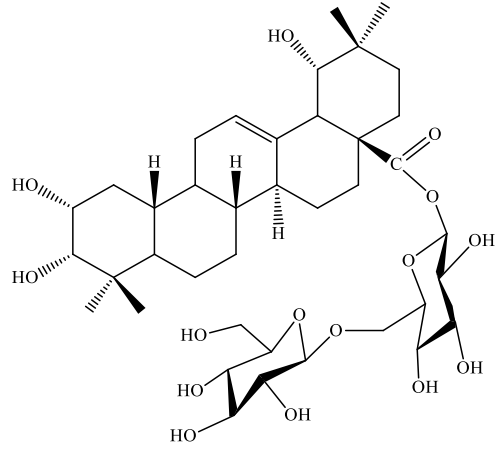
Bileşik 3β,13β-dihidroksiolük-11-en-28-oik asit
Bitki *P. vulgaris*
Kaynak (30)



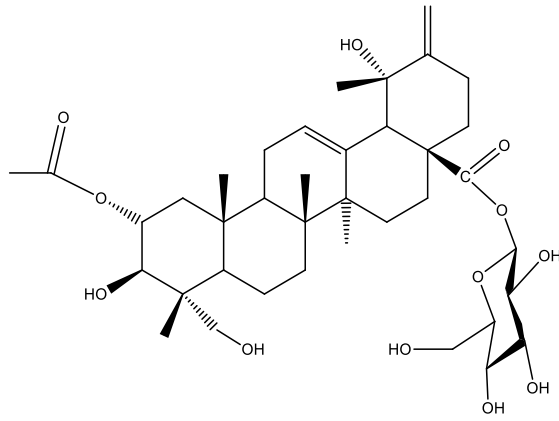
Bileşik Lupeon
Bitki *P. vulgaris*
Kaynak (26)



Bileşik Kiratenol
Bitki *P. vulgaris*
Kaynak (30)

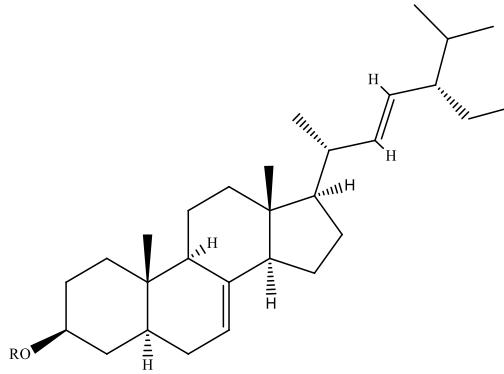


Bileşik	Bitki	Kaynak
Vulgazit I	<i>P.vulgaris</i>	(29)



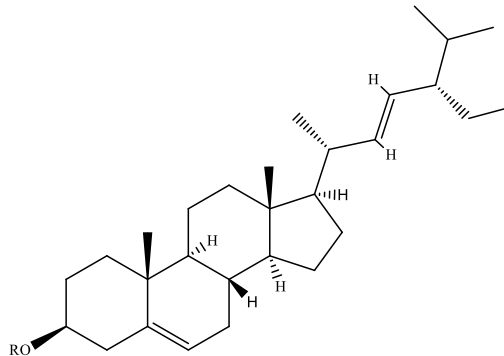
Bileşik	Bitki	Kaynak
Vulgazit II	<i>P.vulgaris</i>	(29)

Steroller



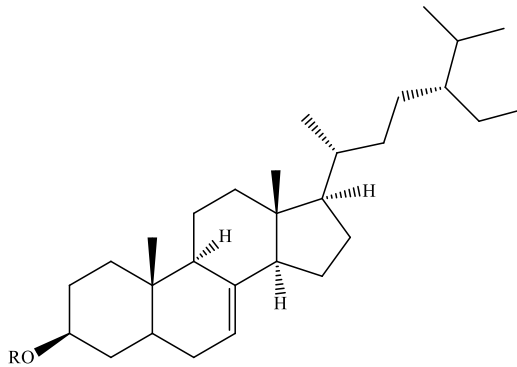
Tablo 2.8. *Prunella* türlerinde tespit edilen steroit ve steroit glikoziti I .

Bileşik	R	Bitki	Kaynak
α -Spinasterol	H	<i>P. vulgaris</i> <i>P. vulgaris</i> var. <i>lilacina</i>	(36) (1)
α -Spinasterol-3- <i>O</i> - β -D-glukozit	Glu	<i>P. vulgaris</i> var. <i>lilacina</i>	(25)



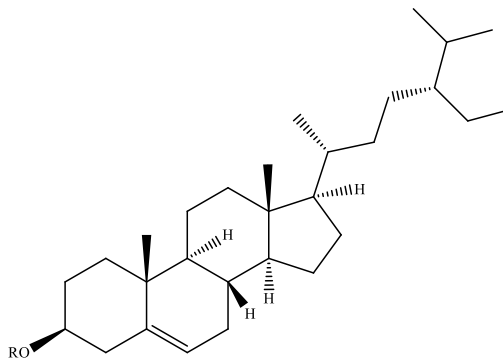
Tablo 2.9. *Prunella* türlerinde tespit edilen steroit ve steroit glikoziti II .

Bileşik	R	Bitki	Kaynak
Stigmasterol	H	<i>P. vulgaris</i> <i>P. vulgaris</i> var. <i>lilacina</i>	(26) (1)
Stigmasterol-3- <i>O</i> - β -D-glukozit	Glu	<i>P. vulgaris</i>	(1)



Tablo 2.10. *Prunella* türlerinde tespit edilen steroit ve steroit glikoziti III.

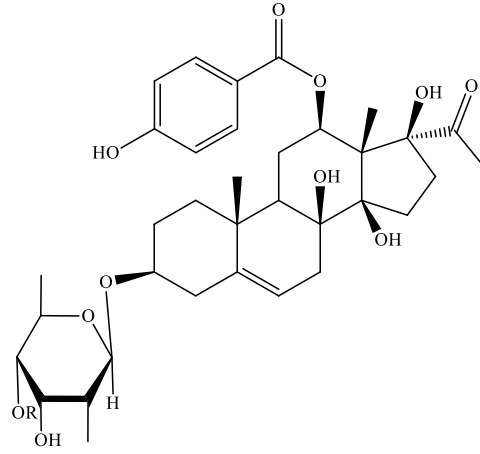
Bileşik	R	Bitki	Kaynak
Stigmast-7-en-3β-ol	H	<i>P. vulgaris</i>	(25)
Stigmast-7-en-3β-ol-3-O-β-D-glukozit	Glu	<i>P. vulgaris</i>	(25)



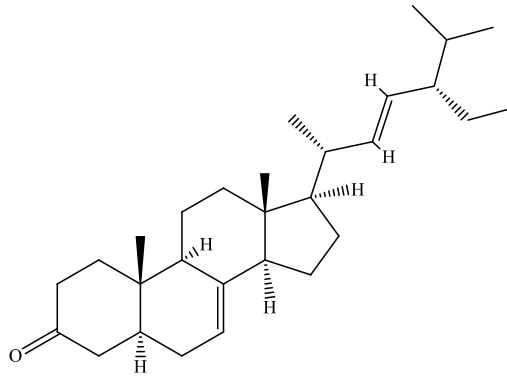
Tablo 2.11. *Prunella* türlerinde tespit edilen steroit ve steroit glikoziti IV.

Bileşik	R	Bitki	Kaynak
β-Sitosterol	H	<i>P. vulgaris</i>	(25)
		<i>P. vulgaris</i> var. <i>lilacina</i>	(1)
Dakosterol	Glu	<i>P. vulgaris</i>	(25)
		<i>P. vulgaris</i> var. <i>lilacina</i>	(1)

Diğer Steroller

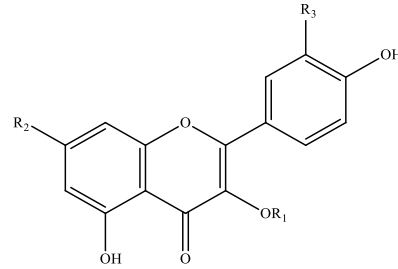


Bileşik	R	Bitki	Kaynak
Qinyangshengenin-3-O- β -D-dijitoksopiranozit	H	<i>P. vulgaris</i>	(37)
Qinyangshengenin-3-O- β -D-oleandropiranozil-(1 \rightarrow 4)- β -D-simaropiranozil-(1 \rightarrow 4)- β -D-dijitoksopiranozit	Oleandroz (1-4) simaroz	<i>P. vulgaris</i>	(37)



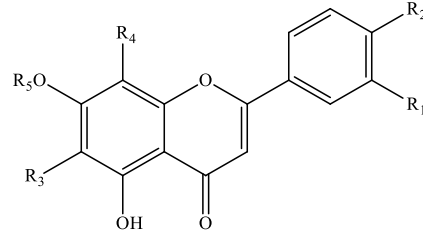
Bileşik	Bitki	Kaynak
α -Spinasteron	<i>P. vulgaris</i>	(25)

Flavonoitler



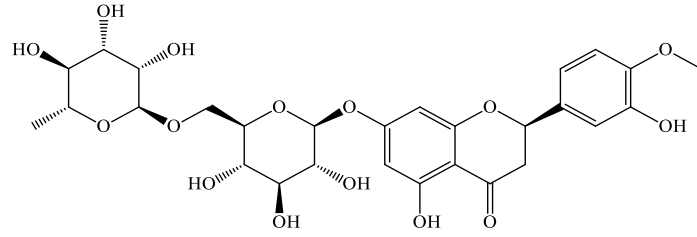
Tablo 2.12. *Prunella* türlerinde tespit edilen flavonol ve flavonol glikozitleri | .

Bileşik	R ₁	R ₂	R ₃	Bitki	Kaynak
Kersetin	H	OH	OH	<i>P. vulgaris</i>	(38)
				<i>P. grandiflora</i>	(39)
				<i>P. lacianata</i>	(39)
Kemferol	H	OH	H	<i>P. vulgaris</i>	(40)
				<i>P. grandiflora</i>	(39)
				<i>P. lacianata</i>	(39)
Kersitrin	Ram	OH	OH	<i>P. vulgaris</i>	(25)
				<i>P. vulgaris</i>	(25, 41)
Rutin	α -ramnozil-(1 \rightarrow 6)- β -glukoz	OH	OH	<i>P. vulgaris</i> var.	(32)
				<i>lilacina</i>	
				<i>P. grandiflora</i>	(10, 39)
				<i>P. hyssopifolia</i>	(10)
				<i>P. lacianata</i>	(39)
				<i>P. vulgaris</i> subsp. <i>asiatica</i>	(39)
Kersetin-3- <i>O</i> - β -D-glukozit	Glu	OH	OH	<i>P. vulgaris</i>	(1)
				<i>P. grandiflora</i>	(10)
				<i>P. laciniata</i>	(10)
				<i>P. hyssopifolia</i>	(10)
				<i>P. vulgaris</i> var. <i>lilacina</i>	(32)
Kersetin-3- <i>O</i> - β -D-galaktozit	Gal	OH	OH	<i>P. vulgaris</i>	(10)
				<i>P. grandiflora</i>	(10)
				<i>P. hyssopifolia</i>	(10)
Kersetin 3- <i>O</i> - β -D-ksilopiranozit	Ksiloz	OH	OH	<i>P. vulgaris</i>	(39)
Kemferol-3- <i>O</i> - β -D-glukozit	Glu	OH	H	<i>P. vulgaris</i>	(40, 42)
				<i>P. vulgaris</i> var. <i>lilacina</i>	(1, 32)
				<i>P. grandiflora</i>	(39)
				<i>P. lacianata</i>	(39)
				<i>P. vulgaris</i>	(39)
				<i>P. vulgaris</i> subsp. <i>asiatica</i>	
Kemferol-3- <i>O</i> -rutinozit	α -ramnozil-(1 \rightarrow 6)- β -glukoz	OH	H	<i>P. vulgaris</i> var. <i>lilacina</i>	(32)



Tablo 2.13. Prunella türlerinde tespit edilen flavon ve flavon glikozitleri | .

Bileşik	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	Bitki	Kaynak
Luteolin	OH	OH	H	H	H	<i>P. vulgaris</i>	(1)
Homoorientin	OH	OH	Glu	H	H	<i>P. vulgaris</i>	(1)
Sinarozit	OH	OH	H	H	Glu	<i>P. vulgaris</i>	(1)
Akasetin-7-O-β-D-glukopiranozit	H	OCH ₃	H	H	Glu	<i>P. vulgaris</i>	(25)
Wogonin	H	H	H	OCH ₃	H	<i>P. vulgaris</i>	(25)

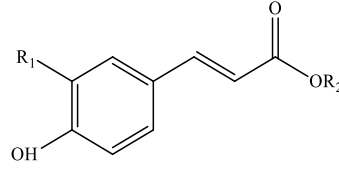


Bileşik
Hesperidin

Bitki
P. vulgaris

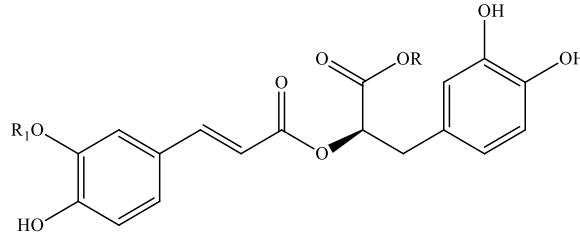
Kaynak
(1)

Fenolik Asitler ve Basit Fenoller



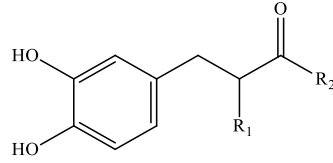
Tablo 2.14. Prunella türlerinde tespit edilen fenolik asitler I .

Bileşik	R ₁	R ₂	Bitki	Kaynak
Kafeik asit	OH	H	<i>P. vulgaris</i>	(1, 43)
			<i>P. vulgaris</i> var. <i>lilacina</i>	(32)
			<i>P. grandiflora</i>	(39)
			<i>P. vulgaris</i> subsp. <i>asiatica</i>	(39)
p-Hidroksinnamik asit	H	H	<i>P. vulgaris</i>	(41)
			<i>P. vulgaris</i> var. <i>lilacina</i>	(32)
Kafeik asit-3-O-glukozit	OGlu	H	<i>P. vulgaris</i>	(25)



Tablo 2.15. Prunella türlerinde tespit edilen fenolik asitler II .

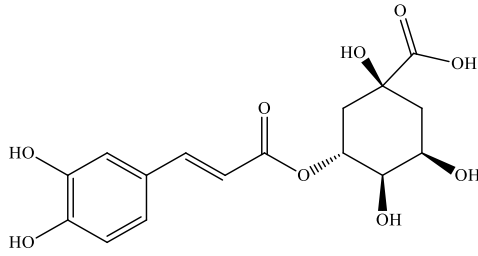
Bileşik	R	R ₁	Bitki	Kaynak
Rozmarinik asit	H	H	<i>P. vulgaris</i>	(1, 41, 43-46)
			<i>P. vulgaris</i> var. <i>lilacina</i>	(32)
			<i>P. orientalis</i>	(44)
			<i>P. grandiflora</i>	(39)
			<i>P. lacianata</i>	(39)
Etil rozmarinat	C ₂ H ₅	H		
Metil rozmarinat	CH ₃	H	<i>P. vulgaris</i>	(25)
Bütül rozmarinat	C ₄ H ₉	H		
Salviaflazit	H	Glu	<i>P. vulgaris</i>	(1)
Salviaflazit metil ester	OCH ₃	Glu	<i>P. vulgaris</i>	(25)



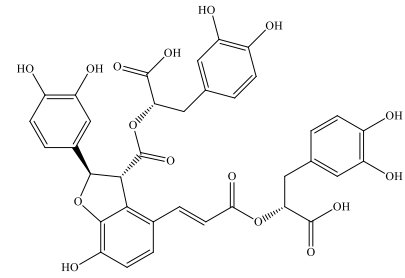
Tablo 2.16. Prunella türlerinde tespit edilen fenolik asitler III.

Bileşik	R ₁	R ₂	Bitki	Kaynak
Etil 3,4-dihidroksifenil laktat	OC ₂ H ₅	O	<i>P. vulgaris</i>	(25)
Metil 3,4-dihidroksifenil laktat	OCH ₃	O	<i>P. vulgaris</i>	(25)
Danshensu	α -OH	OH	<i>P. vulgaris</i> <i>P. vulgaris</i> var. <i>lilacina</i>	(25) (32)

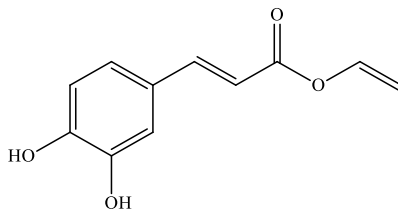
-Diğer Fenolik Asitler



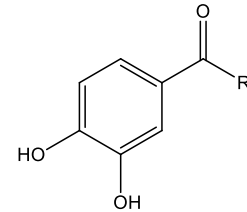
Bileşik Klorojenik asit
Bitki *P. vulgaris*
Kaynak (25)



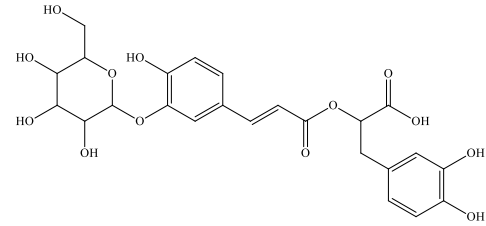
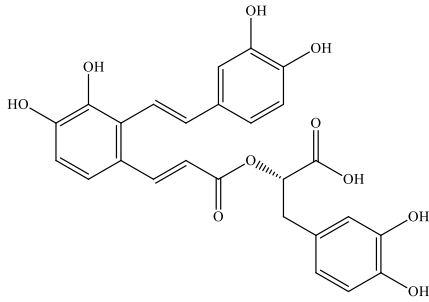
Bileşik Salvianolik asit B
Bitki *P. grandiflora*
Kaynak (39)



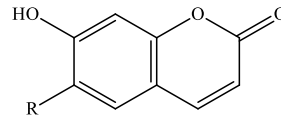
Bileşik Kafeik asit etil ester
Bitki *P. vulgaris*
Kaynak (41)



Bileşik Protokateşuik asit
Protokateşuikaldhit
R OH H
Bitki *P. vulgaris* *P. vulgaris*
Kaynak (41) (41)



Bileşik	Bitki	Kaynak	Bileşik	Bitki	Kaynak
Salvianolik asit A	<i>P. grandiflora</i> <i>P. vulgaris</i> <i>subsp. asiatica</i>	(39) (39)	Rozmarinik asit 3-O-glukozit	<i>P. grandiflora</i> <i>P. vulgaris</i> <i>subsp. asiatica</i>	(39) (39)



Tablo 2.17. *Prunella* türlerinde tespit edilen kumarinler | .

Bileşik	R	Bitki	Kaynak
Umbeliferon	H	<i>P. vulgaris</i>	(47, 48)
Eskuletin	OH	<i>P. vulgaris</i>	(47, 48)
Skopoletin	OCH ₃	<i>P. vulgaris</i>	(47)

2.2.2. *Prunella* L. Türlerinin Kullanılışları ve Biyolojik Etkileri

Dünya genelinde 15 türü bulunan *Prunella* cinsi, ülkemizde 4 tür ile temsil edilmektedir. *Prunella* cinsinin geleneksel kullanım alanları incelendiğinde; bitkinin toprak üstü kısımlarının romatizma, soğuk algınlığı ve kardiyak bozukluklara karşı dahili olarak kullanıldığı bilinmektedir (11). Ayrıca; ateş düşürücü, hipertansiyon, göz ağrısı, ödem ve şişkinlik giderici gibi amaçlarla da geleneksel olarak kullanımı mevcuttur (1, 49). *Prunella* cinsi üzerinde yapılan biyolojik etki çalışmalarında; antiviral, antibakteriyel, antioksidan, antienflamatuvar, immünmodülatör,

nöroprotektif, antitümör, antihipertansif, hipoglisemik ve diğer etkiler üzerinde yoğunlaşmıştır (1, 8, 49).

Antiviral Etki

P. vulgaris'in HIV (İnsan İmmün Yetmezlik Virüsü) ve HSV (herpes simplex virüsü)' ye karşı antiviral etkilerini gösteren bazı çalışmalar mevcuttur. *P. vulgaris*'in toprak üstü kısımlarının su ve etanol ekstralarının anti-HIV-1 etkileri, insan serviks kanser HeLa37 hücre hattında incelenmiştir. Ekstrelerin, hücrelere uygulandıktan sonra HIV antijenlerinin ekspresyonu için immün boyama yapılmış ve antijen pozitif hücreler sayılarak viral enfeksiyon seviyesi belirlenmiştir. Çalışma sonucunda, sulu ekstrenin 1 µg/mL konsantrasyonda HIV-1 replikasyonunu % 66 oranında inhibe ettiği gözlenmiştir. Ekstrenin, enfeksiyon başladıktan sonraki ilk 5 saat içinde eklenmesi durumunda daha etkili olduğu tespit edilmiştir. Bu bulgular, etkili bileşenlerin HIV-1 enfeksiyonunu, virüsün hücreye bağlanmasından sonra gerçekleşen erken aşamalarında engellediğini göstermiştir. Sonuç olarak, *P. vulgaris* sulu ekstresinin, HIV-1 enfeksiyonuna karşı potansiyel bir tedavi veya koruyucu ajan olarak kullanılabilceği belirtilmiştir (50).

P. vulgaris'in anti-lentiviral aktivitelerini daha iyi anlamak amacıyla yapılan başka bir çalışmada, bitkinin toprak üstü kısımlarından oluşan su ve etanol ekstralarının, atlarda bulunan bulaşıcı anemi virüsü (EIAV) replikasyonunu inhibe edici etkisi embriyonik kök hücrelerden türetilen atların deri tabakasında bulunan ED hücre hattında incelenmiştir. Enfekte olan hücreye 0, 1, 2, 3, 4, 6 ve 8 saat aralıklarla 66 µg/mL ekstre eklenmiş, hücreler sabitlendikten sonra immün boyama yapılmış ve EIAV antijenine pozitif olan hücreler sayılmıştır. Ekstrenin ilk 4 saat içinde EIAV enfektivitesini belirgin derecede azalttığı gözlenmiştir ($p < 0,05$) (51).

P. vulgaris' in kurutulmuş yapraklarının %75 etanol ekstresinin, anti-HIV-1 aktivitesi *in vitro* olarak incelenmiştir. Ekstrenin, sağlıklı CD4⁺ T hücrelerinde, HIV koreseptörleri C-X-C kemokin reseptörü tip 4 (CXCR4) ve kemokin reseptörü tip 5 (CCR5) karşı düzenleyici etkisi incelenmiştir. Anti-HIV-1 mekanizmasını tanımlamak için yapay HIV-lusiferaz virüsleri kullanılmış ve ekstrenin 50 µg/mL konsantrasyonda CXCR4 ve CCR5 reseptör düzeylerini sırasıyla %82 ve %44 oranında azalttığı saptanmış ve enzim bağlı immünosorbent analizi ELISA yöntemi ile incelendiğinde

HIV-1'in replikasyonunu %65,4 inhibe ettiği sonucuna ulaşılmıştır (52). Yapılan başka bir çalışmada, *P. vulgaris* çiçeklerinin 50 µg/mL konantrasyonda sulu ve metanollü ekstresinin, HIV-1 virüsünün enfeksiyon sürecinde önemli bir rol oynayan ve virüsün hücre DNA'sına entegrasyonunu katalize eden integras enzimi üzerindeki inhibitör etkisi değerlendirilmiştir. Ekstre içeriğindeki polifenollerin etkide önemli rol oynadıkları belirlenmiş ve polifenollerini uzaklaştırılmış *P. vulgaris* sulu ekstresinin HIV-1 integras aktivitesi incelendiğinde orta düzeyde inhibisyon oluşturduğu gözlenmiştir (EC₅₀=45 µg/mL) (53).

P. vulgaris'in bütün bitkiye ait su ve metanol ekstralarının, HIV-1 virüsünün canlılığını sürdürebilmesi ve bölünmesi için önemli bir enzim olan proteaz enzimi üzerindeki *in vitro* inhibitör etkileri florojenik test ile incelenmiştir. *P. vulgaris*'in sulu ekstresinin, 200 µg/mL konantrasyonda %93,5 en yüksek inhibisyon değeriine sahip olduğu gözlenmiştir (54).

P. vulgaris spikalarının sulu ekstresinden izole edilen polisakkaritlerin, 100 µg/mL konantrasyonda, HSV-1 ve HSV-2 üzerindeki antiviral etkilerini değerlendirmek amacıyla plak indirgeme testi uygulanmış ve polisakkaritlerin %50 plak azaltma konantrasyonu 10 µg/ml olarak belirlenmiştir (55). Yapılan başka bir çalışmada *P. vulgaris* yapraklarının % 80 etanol ekstresi, HSV-1 ve HSV-2'ye karşı maymun böbrek Vero hücre hattında antiviral etki gösterdiği gözlenmiştir. Vero hücrelerinde asiklovir dirençli HSV-1 antijen ekspresyonunda % 50 inhibisyon sağlayan etkili konantrasyonu (EC₅₀) ekstre için 20.6 µg/ml olarak bulunmuştur (56). Ayrıca, *P. vulgaris*'den elde edilen ve belirli bir saflaştırma işleminden geçirilmiş olan aktif bileşiklerle formüle edilen kremin etkisi kobaylarda HSV-1 deri lezyon modelinde ve BALB/c farelerinde HSV-2 genital enfeksiyon modelinde test edilmiştir. Ekstre sırasıyla 20.6 ve 20.1 µg/mL dozda uygulandığında kobayların, deri lezyonlarında anlamlı bir azalma gözlenmiştir (p < 0,05) (57).

P. vulgaris yapraklarının sulu ekstresinin, SARS-koronavirüs 2 (ScoV-2)'ye karşı antiviral etki gösterdiği sonucuna varılan bir çalışmada, ekstrenin ScoV-2'nin reseptörünün, HIV-1 tabanlı bir vektör sistemi kullanılarak, anjiyotensin dönüştürücü enzim 2 (ACE2)'ye bağlanmasını doğrudan engellediği ve virüsün giriş aşamasını bloke ettiği gösterilmiştir. Sonuç olarak *P. vulgaris*'in ScoV-2'ye karşı yeni bir antiviral etkili ajan olarak geliştirilebileceği öne sürülmüştür (25).

P. vulgaris'in, enfeksiyöz hematopoetik nekroz virüsü (IHNV) üzerindeki anti-IHNV etkileri, endotelial progenitör hücreleri (EPH) kullanılarak incelenmiştir. *P. vulgaris* metanol ekstresi, 100 µg/L konsantrasyonda, %99,3'lük inhibitör yüzdesiyle IHNV replikasyonu üzerinde güçlü bir inhibisyon göstermiştir. *P. vulgaris*'in fitokimyasal içeriğinde yer alan ursolik asitin 72 saat inkübasyon sonunda IHNV replikasyonunun %50'sini inhibe eden konsantrasyonu (IC₅₀) 8,0 µM olarak bulunmuş ve bileşiğin etkili bir anti-IHNV aktivitesi gösterdiği belirtilmiştir (58).

Antibakteriyel Etki

P. vulgaris'yapraklarının metanol ve petrol eteri ekstraktları *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* ve *Salmonella typhi* üzerindeki antibakteriyel aktiviteleri *in vitro* olarak incelenmiştir. Sonuç olarak, metanol ekstresinin, 100 µg/mL konsantrasyonda *S. aureus* ve *E. coli*'nin büyümesini engellediği saptanmış, *B. subtilis* için ise ekstrenin 50 µg/ml konsantrasyonda etki gözlenmiştir (59).

P. vulgaris'in toprak üstü kısımlarının sulu ve etanollü ekstraktlarının idrar yolu enfeksiyonu hastalarından alınan *E. coli*'ye karşı antimikrobiyal aktivitesi araştırılmış, minimum inhibisyon konsantrasyonu değerlendirilmiştir. Referans olarak kullanılan siprofloksasin minimum inhibisyon konsantrasyonu değeri 0,5 µg/mL iken *P. vulgaris*'in sulu ekstresi 2 µg/ml, etanol ekstresi 1,3 µg/mL olarak belirlenmiştir. Bu bağlamda, idrar yolu enfeksiyonlarını tedavi etmek için kullanılan siprofloksasine kıyasla, *P. vulgaris*'in tedavi edici potansiyeli bulunduğu gözlenmiştir (60).

Antioksidan Etki

P. vulgaris'in yapraklarının sulu ve etanollü ekstraktları ile yapılan süperoksit dismutaz (SOD) düzeylerinin ölçüldüğü bir antioksidan enzim aktivitesi incelenmiştir. Bitkinin %70 etanol ekstresinin %80,4 SOD düzeylerinin ölçüldüğü bir antioksidan aktivitesi sergilediği gözlenmiştir (61). Yapılan başka bir çalışmada, *P. vulgaris*'in spikasının farklı büyüme evrelerinden elde edilen etanollü ekstraktlarının, antioksidan etkilerini belirlemek amacıyla DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) aktivitesi araştırılmıştır. Bitkinin tomurcuk aşamasında em yüksek antioksidan etkiyi sergilediği ve DPPH radikalini %90,3 oranında süpürdüğü tespit edilmiştir (62).

P. vulgaris var. *lilacina*'nın % 70 etanollü, hekzan, butanol ve sulu ekstralarının total fenol içeriği belirlenmiş, *in vitro* antioksidan aktivitesi SOD enzim aktivitesi üzerinden incelenmiştir. Sonuç olarak %70 etanol ekstresinde SOD aktivitesi %87,7 olarak belirlenmiş ve ekstrenin toplam fenolik içeriği 303,6 GAE/g olarak hesaplanmıştır. Toplam fenol içeriğinin antioksidan aktivite ile doğru orantılı olduğu gözlenmiştir (63).

P. vulgaris kök, gövde ve çiçek sapının, sulu, etanollü ve metanollü ekstralarının antioksidan aktivitelerinin incelendiği bir çalışmada, *P. vulgaris* çiçek saplarının metanol ekstresi, 100 µg/mL konsantrasyonda %35,4 DPPH inhibisyon aktivitesi ve %61,7 ABTS (2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiyazolin-6-sülfonik asit) inhibisyon aktivitesi gösterdiği saptanmıştır (64).

Antienflamatuvar Etki ve İmmünoregülatör Etki

P. vulgaris'in %80 metanollü ekstresinden çeşitli kromatografik yöntemler kullanılarak elde edilen ursolik asit, klorojenik asit ve rozmarinik asit bileşiklerinin 100 µg/mL konsantrasyonda hyaluronidaz, kollajenaz ve elastaz enzimleri üzerinde inhibitör etkileri araştırılmıştır. Sonuç olarak ursolik asitin ve rozmarinik asitin kollajenaz inhibisyon değerleri sırasıyla %30,2 ve %28,8 olarak bulunmuştur. Rozmarinik asitin elastaz inhibisyon değeri ise %34,1 olarak saptanmıştır. Bu bileşiklerin antienflamatuvar ve yara iyileştirici etkilere sahip olabilmeye potansiyeli olduğu düşünülmüştür (65).

P. vulgaris var. *lilacina* çiçeğinin %70'lik etanol ekstresinin PI3K/Nrf2 hücre yolağını kullanarak, RAW 264.7 fare makrofaj hücre hattında heme oksijenaz-1 (HO-1) protein ekspresyonunu indüklediği, LPS ile uyarılmış makrofaj hücrelerinde ve hücre çekirdeğinde bulunan proteinlerden biri olan ve enflamasyon ile DNA'nın yapısal düzenlenmesinde rol oynayan HMGB1 proteininin salınımının azaltarak sepsis tedavisi için faydalı olabileceği sonucuna varılmıştır (66). Yapılan başka bir çalışmada, *P. vulgaris* toprak üstü kısımlarının %30 etanol ekstresinin (5, 10, 25 µg/mL) ve ekstrenin ana bileşiklerinden biri olan rozmarinik asitin (1 µg/mL) antienflamatuvar etkileri LPS tarafından uyarılan insan diş eti fibroblastlarında incelenmiştir. LPS ile uyarılan hücrelerde ekstre ve rozmarinik asit ilavesiyle ROS üretiminin belirgin derecede azaldığı gözlenmiştir ($p < 0,05$). Ayrıca ekstre ve

rozmarinik asit, LPS ilavesi ile artan interlökin 1beta (IL-1beta), interlökin 6 (IL-6), tümör nekroz faktör-alfa (TNF- α) ve indüklenabilir nitrik oksit sentaz (iNOS) ekspresyonunu belirgin derecede baskılamıştır ($p<0,05$) (9).

P. vulgaris ve *P. laciniata*'nın toprak üstü kısımlarının sulu ekstraları, murin dalak hücrelerinin mitojenik yanıtı ve LPS ile uyarılmış makrofajlarının *in vitro* NO (nitrik oksit) üretimi üzerindeki immünomodülatör ve antiinflamatuvar etkileri araştırılmıştır. Her iki ekstre de 400 $\mu\text{g/mL}$ konsantrasyonda sitotoksosite oluşturmadan 10 $\mu\text{g/mL}$ LPS ile uyarılmış makrofajlarda nitrik değeri 22,4 olarak tespit edilirken sadece ekstre eklenen hücrelerde nitrik değeri sırasıyla 0,3 ve 1,5 $\mu\text{g/mL}$ olarak bulunmuştur. LPS ile uyarılmış hücrelere ekstre eklendiğinde ise bu değerler sırasıyla 4 $\mu\text{g/mL}$ ve 10,4 $\mu\text{g/mL}$ olarak bulunmuştur. Her iki ekstrenin de herhangi bir mitojen olmaksızın konsantrasyona bağlı olarak lenfosit proliferasyonunu önemli ölçüde uyardığı görülmüştür. *P. vulgaris* ekstresi T lenfositlerin oranını eşit oranda etkilerken, *P. laciniata* ekstresinin T lenfositlerin oranını kontrol grubuyla karşılaştırıldığında %61,49 oranında arttırdığı gözlenmiştir (67).

P. vulgaris etanol ekstresinin, çoklu ilaca dirençli *Mycobacterium tuberculosis* ile enfekte olmuş sıçanların üzerindeki etkilerini incelemek amacı ile yapılan bir çalışmada, farelerin hücresel bağışıklık fonksiyonunu iyileştirme potansiyeli gözlenmiştir. İnterferon gama (IFN- γ), interlökin 4 (IL-4), interlökin 10 (IL-10) ve interlökin 12 (IL-12) değişimleri ELISA yöntemi ile incelenmiştir. Model grubu ile karşılaştırıldığında, *P. vulgaris*'in serum IFN- γ , IL-12 ve IL-10'da anlamlı farklılıklar ortaya koyduğu gözlenmiştir ($p<0,05$). Sonuç olarak ekstrenin farelerdeki hücresel bağışıklık tepki seviyesini belirgin bir şekilde değiştirdiği gösterilmiştir (68).

P. vulgaris 'in Hashimoto tiroiditi üzerindeki terapötik etkilerinin incelendiği bir çalışmada, *P. vulgaris* sulu ekstresi 500 $\mu\text{g/mL}$ konsantrasyonda, FRTL-5 rat tiroid hücreleri, çift sarmallı dsDNA ve dsRNA transfeksiyonu tarafından başlatılan doğal bağışıklık aktivasyonu sonucunda indüklenen interferon beta (IFN- β) ve nükleer faktör kappa-B (NF-kB) enflamatuvar sitokinlerin mRNA seviyelerini anlamlı şekilde azalttığı gözlenmiştir ($p < 0,001$) (69).

Yapılan başka bir çalışmada *P. vulgaris* sulu ekstresinin, fare makrofaj RAW 264.7 hücrelerindeki immünstimulan ve antitümör aktivitesi WST-1 testi ile incelenmiştir. Ekstrenin 10 ve 50 $\mu\text{g/mL}$ konsantrasyonlarda uyarılmış makrofajların

tümör sitostatik etkisi sarkom 180 tümör hücreleri üzerinde test edilmiş ve güçlü sitostatik aktivite gösterdiği belirlenmiştir ($p < 0,01$). Bu bulgular, *P. vulgaris*'in kanser hücrelerine karşı makrofajlar aracılığıyla potansiyel bir tedavi etkisi olduğunu düşündürmüştür. Buna ek olarak aynı konsantrasyonlarda makrofaj ile ilişkili sitokinlerin TNF- α , IL-1 β ve IL-6 gen ekspresyonunu belirgin derecede indüklediği sonucu elde edilmiştir ($p < 0,01$) (70).

Nöroprotektif Etki

P. vulgaris, *Clematis chinensis* Osbeck, *Trichosanthes kirilowii* Maximowicz bitkilerinden oluşan bir karışımın %70 etanol ekstresinin, dizosilpin (MK-801) kaynaklı şizofreni benzeri fenotip davranışları (farelerde ön uyarı inhibisyonunun bozulması ve dikkat eksiklikleri) üzerindeki etkisini incelemek amacı ile *in vivo* çalışma yapılmış, MK-801 tarafından indüklenen şizofreni benzeri hayvan modelindeki erkek ICR farelerine ekstre 30, 100 ve 300 mg/kg dozlarda oral yolla uygulanmıştır. Her iki dozda da uygulanan ekstrenin MK-801'in neden olduğu ön uyarı inhibisyonu eksikliklerini ve su bulma testinde MK-801'in neden olduğu dikkat eksikliklerini belirgin derecede hafiflettiği gözlenmiştir ($p < 0,05$). Elde edilen sonuçlara bakıldığında, *P. vulgaris*'in ön uyarı inhibisyonunun bozulmasını engelleyici, dikkat eksikliklerini hafifletme potansiyelinde olduğu bulunmuş ve şizofreni tedavisinde faydalı olabileceği düşünülmüştür (8).

P. vulgaris var. *lilacina* çiçeklerinin %70 etanollü ekstresinin, erkek ICR farelerinde antikolinergik etkisi olan skopolamin ile indüklenmiş öğrenme ve bellek bozuklukları üzerindeki etkileri incelenmiş, bilişsel bozuklukları anlamlı bir şekilde düzelttiği saptanmıştır ($p < 0,05$). Sonuç olarak, *P. vulgaris* var. *lilacina*'nın kolinerjik disfonksiyon tarafından indüklenen bilişsel bozuklukların tedavisinde kullanışlı olabileceğini ve etkilerini sinir hücrelerinin uyarılmasında önemli bir rol oynayan NMDA reseptörlerinin aktivasyonu ile gerçekleştirdiği düşünülmektedir (71). Ayrıca, *P. vulgaris* üzerinde yapılan bir araştırmada asetilkolinesteraz enzimini %89 oranında inhibe ettiği saptanmıştır (72). *P. vulgaris*'in %80 etanol ekstresinin, 6-hidroksidopamin (6-OHDA) tarafından uyarılmış SH-SY5Y hücrelerinde NO üretimine karşı etkisi incelenmiş ve 100 $\mu\text{g}/\text{mg}$ konsantrasyonunda uygulanan ekstrenin inhibisyon değeri %44,3 olarak bulunmuştur. Bu bilgilere ek olarak,

ekstrenin SH-SY5Y hücre canlılığı üzerindeki etkisi WST-1 proliferasyon testi ile incelenmiş ve ekstre 100 µg/mg konsantrasyonda uygulandığında hücre canlılığını anlamlı bir şekilde koruduğu gözlenmiştir ($p < 0,05$)(73).

Başka bir çalışmada, *P. vulgaris*'ten sulu ekstresinden elde edilen etil asetat fraksiyonu *in vitro* koşullarda asetilkolinesteraz (AChE) inhibisyon etkisi gözlenmiş ve AChE inhibisyonu için IC₅₀ değeri 101,8 µg/mL olarak belirlenmiştir. Bu sonuçtan yola çıkarak yapılan *in vivo* çalışmada, ekstrenin yaşlanmayı uyarıcı madde olan skopolamin üzerindeki etkileri incelenmiştir. Erkek sıçanlar dört gruba ayrılmış ve 3 hafta boyunca günde bir kez ekstre (100 mg/kg) oral olarak verilmiş, skopolamin (1 mg/kg, intraperitoneal) ise ekstreten 'den 30 dk önce üç gün boyunca sıçanlara uygulanmıştır. Skopolamin ile uyarılmış sıçanlardaki oksitativ parametrelere kıyasla, ekstre uygulanan sıçanlarda belirgin derecede azalma saptanmış, malondialdehit (MDA) düzeyi 109,9 nM/mg, SOD aktivitesi 0.72 U/mg protein ve glutatyon peroksidaz (GPx) değeri 19,2 mU/mg protein olarak bulunmuştur. Ekstre, skopolamin tarafından indüklenen beyin yaşlanmasını azaltarak davranışsal performansı iyileştirmiş ve beyin hücre hasarını azaltıcı etkisi ispatlanmıştır (74).

Antitümör Etki

P. vulgaris'den izole edilen oleanolik asit, akciğer adenokarsinoma hücrelerinde, B- hücreli lenfoma (Bcl-2) protein ekspresyonunu azaltmış , Bcl-2 ile ilişkili X proteini (Bax) ile Bcl-2 ile ilişkili apoptozu tetikleyen promoter (Bad) protein ekspresyonunu artırmış ve sonuç olarak apoptozu indüklediği gözlenmiştir (75).

P. vulgaris'in % 60 etanol ekstresinin antioksidan aktivitesi, DPPH ve demir indirgeyici antioksidan güç (FRAP) testleriyle değerlendirilmiştir. DPPH ve FRAP değerleri sırasıyla 19,6 µmol V_C/g ve 0,1 µmol Fe(II)/g olarak belirlenmiştir. Ayrıca, ekstrenin C57BL/6 farelerinde tümör büyümesini engelleyici etkisi *in vivo* ortamda araştırılmış, ve ekstre 5 g/kg dozda uygulandığında farelerde tümör büyümesini anlamlı ölçüde inhibe ettiği sonucuna varılmıştır ($p < 0,05$). (76)

Yapılan bir *in vitro* çalışmada, *P. vulgaris* ekstresinin, Jurkat insan T lenfoma hücrelerinde büyümeyi engelleyici ve apoptozu uyarıcı etkiler gösterdiği bulunmuştur. Hücrelerin proliferasyon ve inhibisyon değerini belirlemek için MTT testi ve hücrelerin apoptoz oranlarını belirlemek için akış sitometrisi kullanılmıştır. Western

blot analizi Bcl-2 ve Bax protein ekspresyonundaki değişiklikleri gözlemek için uygulanmıştır. Sonuç olarak *P. vulgaris* ekstresi 5, 20 ve 25 µg/mL konsantrasyonlarında hücelere uygulanmış ve Jurkat hücrelerinin proliferasyonunu belirgin derecede engellediği gözlenmiş ve IC₅₀ değeri 20,2 µg/mL olarak belirlenmiştir. Ekstrenin 15 µg/mL konsantrasyonda Jurkat hücreleri üzerindeki hücre yaşam oranı %90,8 olarak belirlenmiştir. Ayrıca, *P. vulgaris* 15 ve 20 µg/mL konsantrasyonda Jurkat hücrelerinde apoptozu tetikleyerek Bcl-2 protein ekspresyonunu azaltırken, Bax protein ekspresyonunu anlamlı ölçüde arttırdığı gözlenmiştir (p < 0,05) (77). Bir başka çalışmada ise *P.vulgaris* var. *lilacina* yapraklarının metanol ekstresinden izole edilen 2α, 3α-dihidroksiurs-12-en-28-oik asitin, insan akut lenfoblastik lösemi T-hücre soyu Jurkat hücre üzerindeki etkileri MTT testi ile incelenmiş ve hücre canlılık oranları belirlenmiştir. 20 ve 25 µg/mL konsantrasyonlarında, Jurkat T hücrelerine uygulanan 2α, 3α-dihidroksiursa12-en-28-oik asitin hücre canlılıklarını sırasıyla %74,5 ve %23,8 oranında inhibe ettiği gözlemlenmiş ve IC₅₀ değeri 22 µg/ml olarak bulunmuştur (78).

P. vulgaris'den elde edilen bazı ekstrelerin ve bileşiklerin çeşitli kanser türlerindeki antitümör özellikleri Tablo 2.17' de özetlenmiştir.

Zhao ve arkadaşları tarafından yürütölen plasebo kontrollü bir çalışmada, meme kanseri hastalarının tedavisinde referans olarak kullanılan taksan ile birlikte *P. vulgaris*' nin etkinliği araştırılmıştır. Çalışmaya toplam 424 meme kanseri hastası dahil edilmiş; kontrol ve deney grupları olmak üzere iki gruba ayrılmıştır. Her iki gruba da taksan tedavisi uygulanmış ve deney grubuna ek olarak günde 2 kez 10 mL *P. vulgaris* oral solüsyonu verilmiştir. Hastalar 41 ay boyunca gözlem altında tutulmuştur. Sonuç olarak, deney grubu hastalarında, kemoterapinin etkilerinde anlamlı bir azalma, yaşam sürelerinde belirgin derece artış gözlenmiştir (p < 0,05). *P. vulgaris*' in major bileşikleri HPLC yöntemi kullanılarak belirlenmiş, anti-tümör etki gösteren bileşiklerin kafeik asit ve rozmarinik asit olduğu belirlenmiştir (79).

Ekstre/Etkili Bileşik	Hücre Hattı	Antitümör Etkileri	Kaynak
-----------------------	-------------	--------------------	--------

Sulu Ekstresi	Tavuk korioalantoik membran HUVEC hücreleri	Anjiyogenezin engellenmesi	(80)
	Huh-7, HA22T	MMP-9, VEGF AP-1, Nf-kB'nin inhibisyonu TPA'nın inhibisyonu	(49)
	MDA-MB-231 SKOV-3	EMT'nin inhibisyonu Nf-KB'nin inhibisyonu	
	HepG2, Huh-7	Hücre istilas ve göçünü engellenmesi	
Ursolik asit	BGC-803 hücreleri	Proliferasyonu engelleme ve apoptozu tetikleme	(81)
	HuH7 hücreleri	Apoptozu tetikleme	(82)
Polisakkaritler	Kanser hücre hattı: A549, SK-OV-3, SK-MEL-2, HCT15	<i>in vitro</i> sitotoksitesi	(83)

Tablo 2.18. *P. vulgaris*'ten elde edilen bazı ekstrelerin ve bileşiklerin çeşitli kanser türlerindeki antitümör özellikleri.

Antihipertansif Etki

P. vulgaris etanol ekstresinin antihipertansif etki sağlayabileceğini gösteren çalışmalar bulunmaktadır. Bu ekstrenin çalışma mekanizmasında, NO-guanilat siklaz yoluyla üretilen vazodilatör etkisinin rol oynayabileceği düşünülmektedir (1).

Hipoglisemik Etki

P. vulgaris'in çiçeklenme sürecindeki toprak üstü kısımlarının %75 metanol ekstresinden elde edilen triterpenlerce zengin fraksiyonunun, diyabetik sıçanlar üzerinde antihiperglisemik, antioksidan ve pankreas koruyucu etkilerinin araştırıldığı *in vivo* bir çalışmada, fraksiyonun, 6 hafta boyunca günde bir kez 200 mg/kg doz kullanılarak intragastrik yolla sıçanlara uygulanmış, ve fraksiyonun %16,3 oranında kan glukoz konsantrasyon değerini düşürdüğü gözlenmiştir. Ayrıca, diyabetik sıçanlarda pankreas β hücrelerinde SOD mRNA ekspresyonunda %16,9 değerinde artış gözlenmiştir. Sonuç olarak *P. vulgaris* 'den elde edilen fraksiyon, kan glukoz konsantrasyonunu ve antioksidanları kontrol ederek anti-diyabetik etkiye sahip olduğu gözlemlenmiş ve pankreas üzerinde koruyucu bir etkiye sahip olduğu bildirilmiştir (84).

P. vulgaris sulu ekstresinin, α -amilaz ve α -glukozidaz enzim aktivitelerini doğrudan inhibe ettiği bulunmuştur. Ekstrenin, SGLT-1, GLUT-2 ve Na⁺-K⁺-ATPaz mRNA ekspresyonunu Caco-2 hücrelerinde inhibe edebildiği gözlemlenmiş ve bunun sonucunda karbonhidrat hidrolizini geciktirerek glikoz alımı üzerinden normal ICR farelerinde maltoz toleransını inhibe ettiği ve postprandiyal hiperglisemiyi azalttığı gösterilmiştir (25).

P. vulgaris sulu ekstresinden çeşitli kromatografik yöntemlerle 6 bileşik izole edilmiş ve aldoz redüktaz enzim inhibisyon etkisini değerlendirilmiştir. Bu bileşikler içerisinde yer alan kafeik asit etilen esterinin IC₅₀ değeri 3,2 μ M olarak belirlenmiştir. Bu bileşiğin 5 μ g/mL doz kullanımında, yüksek galaktoz konsantrasyonunda inkübe edilmiş bir sıçan lensinde galaktitol oluşumunu inhibe etmiş ve rat eritrosit galaktikol inhibisyon değeri 15,8 μ M olarak bulunmuştur. Sonuç olarak, bu bileşik diyabetik komplikasyonlar için yeni bir doğal ürün ilacı olarak daha fazla çalışma için önde gelen bir bileşik olarak sunulabileceği düşünülmüştür. (41)

P. vulgaris sulu ekstresi tip 2 diyabetli db/db farelerinde diyabetik arterosklerozu üzerindeki etkisini belirlemeyi farelere yüksek yağlı/yüksek kolesterol

diyete ve ekstre (günde 100 ve 200 mg/kg) ile sekiz hafta boyunca oral yolla tedavi edilmiştir. Ekstre, her iki konsantrasyonda da kan glukozunu ve sistolik kan basıncını önemli ölçüde düşürmüştür, total plazma kolesterolü, trigliserit ve LDL-kolesterolü belirgin şekilde azaltmıştır ($p < 0,01$). Sonuç olarak, *P. vulgaris*'in, farelerde hiperglisemi ve diyabetik vasküler disfonksiyonu baskıladığı gözlemlenmiş, bitkinin diyabetik arteroskleroz gelişimini önleyebileceği düşünülmüştür (85).

Diğer Etkiler

Cilt sağlığını, UV radyasyonunun zararlı etkilerine karşı korumaya yönelik bir çalışmada, doğal bileşiklerin fotokoruyucu etkisi araştırılmıştır. *P. vulgaris* toprak üstü kısımlarının % 30 etanol ekstresi ve bu bitkinin major bileşiklerinden biri olan fenolik asit türevi rozmarinik asitin, insan keratinosit hücre hattında (HaCaT) UVA tarafından tetiklenen ROS üretimine karşı koruyucu etkileri değerlendirilmiş, ekstrenin en yüksek etkisi 25 mg/L konsantrasyonunda %52 koruma sağladığı gözlemlenmiş, R.A'nın 4,5 mg/L konsantrasyonda en yüksek etkiyi gösterdiği saptanmıştır (86)

P. vulgaris' den izole edilen ve ana aktif bileşiklerinden biri olan ursolik asitin astenozoospermi hastalığına karşı koruyucu etkisi incelenmiştir. LPS ile indüklenmiş astenozoospermi hastalığı sıçan modellerine, farklı konsantrasyonlarda ursolik asit uygulanmış, ELISA, qRT-PCR ve western blot kullanılarak sperm motilitesi, apoptoz ve TNF- α düzeyleri tespit edilmiştir. Bu çalışma sonucunda, ursolik asitin sıçanlarda sperm yoğunluğunu ve hareketliliğini artırarak, Bcl-2/Bax apoptoz yolunu düzenleyerek ve enflamatuar apoptoz yanıtını azaltarak etki gösterdiği gözlemlenmiştir (87).

P. vulgaris bitkisinin anti-aging etkisini gösteren bir çalışmada, D-galaktoz subkutan enjeksiyonu ile oluşturulan ICR faresinin yaşlanma modelinde, düşük (100 mg/kg) ve yüksek (300 mg/kg) dozlarda *P. vulgaris*' in %80 etanollü ekstresi uygulanmış ve yaşlanan hücreleri tanımlamak için kullanılan belirli moleküller ve hücresel belirteçler içerisinde yer alan SOD, CDK4'in inhibitörü (p16INK4A), TNF- α değişimleri gözlemlenmiş, qPCR, Western Blot ve ELISA yöntemleri ile sonuçlar tespit edilmiştir. Sonuçlar incelendiğinde, p16INK4A'nın yaklaşık olarak yarı yarıya azaldığı, karaciğerdeki SOD'un 3 kat arttığı, TNF- α 'nın plazmada 1'den 0,6'ya düştüğü

ve T hücrelerinin %0,09'dan %0,19'a yükseldiği saptanmış ve *P. vulgaris*'in anti-aging potansiyel etkisi olabileceği düşünülmüştür (88).

P. vulgaris var. *lilicana* spikalarının %70 etanol ekstresinden çeşitli kromotgrafik yöntemlerle izole edilen betulinik asit ve oleanoik asit, 50 µM konsantrasyonda MCF7 insan meme kanseri hücre hattı üzerinde östrojen reseptörü (α ER) mRNA seviyesini belirgin derecede azaltmış ($p < 0,05$) ve bu bileşiklerin antiöstrojenik etkiler gösterdiği tespit edilmiştir (89).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Fitokimyasal Çalışmalar

3.1.1. Bitkisel Materyal

Prunella vulgaris L. 2021 yılının Haziran ayında, Ankara'nın Mamak ilçesinde bulunan Kıbrıs köyünden toplanmıştır. Bitki serin ve kuru yerde, gölgede kurutulmuştur. Toplanan bitkisel materyale ait herbaryum örneği Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Herbaryumu'nda saklanmaktadır (HUEF21070). Fitokimyasal ve biyolojik etki çalışmalarında, bitkinin toprak üstü kısımları kullanılmıştır.

3.1.2. Kromatografik Yöntemler

Bu tez kapsamında, ekstrenin ön fraksiyonlaması ve bu fraksiyonlarda bulunan bileşiklerin izolasyonu için poliamit, normal faz silika jel, ters faz silika jel ve sefadeks gibi değişik dolgu malzemelerinin kullanıldığı kolon kromatografisi ile normal faz preparatif ince tabaka kromatografisi (İTK) yöntemleri kullanılmıştır. Ön fraksiyonlama işlemlerinde 50-100 ml olarak toplanan fraksiyonlar, saflaştırma kademesindeki işlemlerde 5-20 ml'ye düşürülmüştür. Fraksiyonların izlenmesinde ise, farklı solvan sistemlerinde ince tabaka kromatografisi (İTK)'nden yararlanılmıştır. Aynı Rf değerine sahip olan ve revelasyon sonucunda benzer görünen fraksiyonlar bir araya toplanmıştır.

a) Poliamit Kolon Kromatografisi (Poliamit KK)

Bitki ekstresinde bulunan bileşikleri fenolik yapılarına göre ayırmak amacıyla poliamit kolon kromatografisi fraksiyonlama için tercih edilmiştir.

Adsorban: Poliamit (Polyamide 6, Fluka, 50-160 µm)

Solvan Sistemi : H₂O (%100) → MeOH (%100)

Kolonun Hazırlanması: 200 g poliamit yeterli miktarda distile su ile süspansiyon edilmiş ve manyetik karıştırıcıda 1 saat karıştırılarak şişmesi sağlanmıştır. Süspansiyon halindeki karışım, alt ucuna pamuk yerleştirilmiş uygun boyuttaki cam

kolona aktarılmıştır. Kolondan yeterli miktarda distile su geçirilerek dolgu materyalinin iyice yerleşmesi sağlanmıştır.

Numune Tatbiki: Numune uygun miktarda distile su içinde çözülmüş ve bir pipet yardımıyla adsorban üzerine dolgu materyalinin yüzeyi bozulmadan kolona tatbik edilmiştir. Kolonun musluğu açılarak çözeltinin tamamının adsorbana geçmesi sağlanmış ve adsorban yüzeyine pamuk yerleştirilerek, distile su ile fraksiyonlama başlatılmıştır.

b) Silika Jel Kolon Kromatografisi (Silika Jel KK) Poliamit kolon fraksiyonlanması sonucunda elde edilen fraksiyonların, ileri aşamalarındaki ayırımlarında ve taşıdıkları bileşiklerin saflaştırılmasında silika jel kolon kromatografisi kullanılmıştır.

Dolgu Materyali: Silika jel (Kiesegel 60, 70-230 mesh, 0.063-0.2 mm, Merck 7734)

Solvan Sistemleri :CHCl₃:MeOH:H₂O (90:10:1, 85:25:2.5, 80:20:2, 70:30:3, 60:40:4) EtOAc:*n*-Hekzan (90:10, 85:15, 75:25)

Kolon Hazırlanması: Uygun miktarda silika jel, elüsyona başlanacak solvan sistemi ile süspandeye hale getirilmiş ve bu karışım, alt ucuna pamuk yerleştirilmiş olan cam kolona aktarılmıştır. Kolondaki dolgu materyalinin çalışmaya hazır hale gelmesi için uygun miktarda solvan kolondan geçirilmiş ve adsorban üzerinde 2-3 mm solvan kalmasına yakın numune tatbikine hazır hale getirilmiştir.

Numune Tatbiki: Numune kolona iki farklı yol ile tatbik edilebilir. Bu aşamada numunenin elüsyona başlanacak solvan sistemindeki çözünürlüğü önemlidir.

- **Yaş Tatbiki:** Numune, elüsyona başlanacak solvan sisteminin mümkün olan en az miktarında tamamen çözülerek pastör pipeti yardımı ile kolonun yüzeyini bozmayacak şekilde kolona tatbik edilmiştir. Ardından, kolon musluğu açılarak çözeltinin adsorbana geçmesi sağlanmıştır. Numunenin tatbikinden sonra yüzeyin bozulmasını engellemek amacıyla silika jel üzerine pamuk yerleştirilmiş ve kullanılacak solvan sistemi ilave edilerek elüsyona başlanmıştır.
- **Kuru Tatbiki:** Numune çok iyi çözüldüğü bir solvanın 1-2 ml' si içinde çözüldürülmüş ve kolonda kullanılan adsorban miktarının %10'unu aşmayacak şekilde uygun adsorban ile karıştırılmıştır. Adsorbanın çözeltiyi

iyice adsorbe etmesi sağlanmış ve 40-50°C'yi geçmeyen bir ısıtıcı yardımıyla kurutulmuştur. Karışım kuru ve homojen halde kolona aktarıldıktan sonra kolonun üzerine, adsorban yüzeyinin bozulmaması için bir parça pamuk yerleştirilmiştir. Daha sonra kolona yeterli miktarda solvan sistemi ilave edilerek elüsyona başlanmıştır.

c) Sefadeks Kolon Kromatografisi (Jel Filtrasyon) (Sefadeks KK)

Çalışmamızda, az sayıda bileşik içeren karışımların ayırımı ve saflaştırılmasında ve poliamit kolondan elde edilen ana fraksiyonlardan izolasyon çalışmalarında molekül büyüklüklerinin farklarına göre ayırım sağlayan sefadeks kolon kromatografisi (jel filtrasyon) kullanılmıştır

Dolgu Materyali: Sephadex LH-20 (Pharmacia)

Solvan Sistemleri: MeOH (%100)

Kolonun Hazırlanması: Uygun miktardaki Sephadex LH-20, metanol ile karıştırılarak kısa bir süre şişmeye bırakılmıştır. Cam kolonun alt ucuna pamuk yerleştirilmiş ve dolgu materyalinin kolona aktarılması sağlanmıştır.

Numune Tatbiki: Numune az miktarda metanol ile çözülerek kolon yüzeyini bozmayacak şekilde pastör pipeti yardımı ile kolona tatbik edilmiş, metanol ile elüsyona başlanmıştır.

d) Vakum Sıvı Kromatografisi (VSK)

VSK, alt ucu filtreli bir cam kolon, bir nuçe erleni ve vakumdan oluşan bir sistemdir. Çalışmalarımızda adsorban olarak ters faz silika jel (LiChroprep RP-18) materyali kullanılmıştır.

Dolgu Materyali: LiChroprep C₁₈ (40-63 µm, Merck)

Solvan Sistemleri: MeOH:H₂O (% 0-100 MeOH)

Kolonun Hazırlanması: Yeterli miktardaki adsorban metanol ile süspande hale getirilmiş ve alt ucu pamuk yardımı ile kapatılmış cam kolona aktarılmıştır. Kolon başlangıç solvanı dikkate alınarak uygun oranlarda MeOH- H₂O karışımı ile kademe kademe yeterli miktarda solvan ile şartlama işlemi tamamlanmıştır.

Numune Tatbiki: Numune, az miktarda elüsyona başlanacak solvanda çözülerek bir pastör pipeti yardımıyla kolona tatbik edilmiştir. Kolon musluğu mantar

bir tıpa yardımı ile nuçe erlenine bağlanarak düzenek hazırlanmıştır. Erlen içerisine tüp yerleştirilerek elüsyon işlemine başlanmıştır.

e) İnce Tabaka Kromatografisi (İTK)

Fitokimya çalışmalarının planlanmasında, ayırım ve izolasyon aşamalarında elde edilen örneklerin izlenebilmesi, standartlarla ve birbirleri ile karşılaştırılması amacıyla kullanılmaktadır. Alüminyum tabanlı plaka üzerine kaplanmış normal ve ters fazlı silika jel plaklar üzerinde uygulanmıştır.

Adsorban : Silika jel (Alüminyum tabanlı hazır plak, Kieselgel 60 F254, 0.20 mm, Merck, Art. 5554), (Alüminyum tabanlı hazır plak, RP18 F254, Merck)

Solvan Sistemleri : CHCl₃:MeOH:H₂O (90:10:1, 80:20:2, 70:30:3, 61:32:7, 50:50:5), EtOAc:MeOH:H₂O (100:16.5:13.5), EtOAc:MeOH:H₂O (100:16.5:13.5)

Numune Tatbiki: Numuneler, pastör pipeti yardımı ile plağın alt ucundan 1 cm yukarı ve 1 cm aralıklarla olacak şekilde tatbik edilmiştir. Kromatografi tankına konulan plaklar 7-10 cm mesafe boyunca sürüklenmiştir.

Lekelerin Belirlenmesi: UV 254 ve 366 nm (Camag UV lambası ile)

Vanilin / Sülfürik asit (%1), 110°C'de 5 dakika ısıtarak lekeler belirlenmiştir.

f) Preparatif İnce Tabaka Kromatografisi (Prep. İTK)

İzolasyon çalışmalarında, farklı polariteye sahip ve az sayıda bileşik içeren karışımların saflaştırılmasında tercih edilebilecek yöntemlerden biridir.

Adsorban: Silika jel (Alüminyum tabanlı hazır plak, Kieselgel 60 F₂₅₄, 0.20 mm, Merck, Art. 5554)

Solvan Sistemleri: CHCl₃:MeOH:H₂O (70:30:3, 61:32:7)

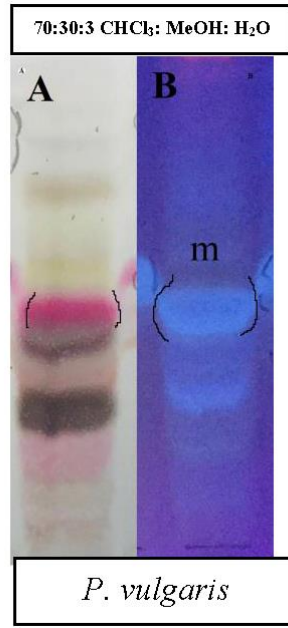
Numune Tatbiki: Numune mümkün olan en az miktarda çözünebildiği bir solvanda çözülmüş ve 10x20 cm ya da 20x20 cm ebatlarındaki plakanın tabanından 1 cm yukarıya düz bir çizgi halinde tatbik edilmiştir. Plaklar tankta sürüklenmiş daha sonra uv lamba altında bileşiklerin yerleri tespit edilerek ayırımı istenilen maddeler plaktan kazınarak alınmıştır. Silika jele tutunmuş halde alınmış olan bileşiklerin ayırımı kazınan tozun uygun solvanda bekletilmesi ve daha sonra süzülerek solvanın uzaklaştırılması ile gerçekleşmiştir.

3.1.3. Ekstraksiyon ve İzolasyon Çalışmaları

P. vulgaris bitkisinin kurutulmuş çiçekli toprak üstü kısımları öğütücüde toz haline getirilmiştir. Bu işlemden sonra %80'lik EtOH ile bir gece maserasyona bırakılmış ve ertesi gün 40°C'de ekstre edilmiştir. Ekstraksiyon işlemi 5 kez tekrarlandıktan sonra ekstre süzülerek elde edilen süzüntüler birleştirilmiş ve rotavaporda alçak basınç altında 40 °C'de yoğunlaştırılmıştır. Yoğunlaştırılan ekstraleler uygun miktarda suda çözülmüş ve 1:1 oranında petrol eteri ilavesi ile 5 defa sıvı-sıvı partision yapılarak ekstredeki lipofilik bileşikler uzaklaştırılmıştır. Petrol eterli fraksiyon, darası alınmış bir balona aktarıldıktan sonra çeker ocakta yoğunlaşması için bırakılmıştır. Sulu ekstre ise rotavaporda alçak basınç altında 40 °C'de yoğunlaştırılmıştır. Kuruluğa kadar uçurulmuş sulu ekstre liyofilize edilmiştir. Sonuç olarak 25,79 g sulu ekstre elde edilmiştir. Verimler aşağıda tablo şeklinde verilmiştir.

Bitki	Tartılan Toz DrogMiktarı (g)	%80'lik Etanollü Ekstre (g)	Verim (%)	Sulu Ekstre (g)
<i>P. vulgaris</i>	226.67	38.19	16.84	25.79

Liyofilize ekstrenin bir kısmı biyolojik etki çalışmaları için ayrıldıktan sonra, kalan kısım üzerinde fitokimyasal çalışmalara başlanmıştır. Bitkinin sulu ekstresinin fitokimyasal içeriği hakkında ön bilgi sahibi olmak amacıyla, ekstre kloroform: metanol: su (70:30:3) solvan sistemi kullanılarak İTK'ya tatbik edilmiştir (Şekil 3.1). Plak incelendiğinde, UV-366 nm'da mavi floresans veren (Şekil 3.1) ve 'm' olarak işaretlenmiş maddenin elde edilmek istenen fenolik ana maddelerden biri olduğu gözlenmiştir.



Şekil 3.1. Sulu ekstreye ait İTK plağı (A) ve İTK plağının UV-366 (B) ‘daki görüntüsü.

Ön Fraksiyonlama

P. vulgaris bitkisinin liyofilize sulu ekstresi bir miktar distile suda çözülerek, fenolik ve fenolik olmayan bileşiklerin birbirinden ayrılması amacıyla, poliamit ile hazırlanmış kolon kromatografisine tatbik edilmiştir. Elüsyona %100 su (%0 metanol) ile başlanmış ve sırasıyla % 25, % 50, % 75 ve % 100 metanole çıkartılmıştır. Bu işlem sonucunda ekstreler farklı metanol oranlarında gelen ve benzer bileşikleri içeren fraksiyonlardan oluşmuş 5 ana fraksiyona ayrılmıştır (Şekil 3.1).

Fraksiyon A - % 100 H₂O (% 0 MeOH)

- Fraksiyon B - % 25 MeOH
- Fraksiyon C - % 50 MeOH
- Fraksiyon D - % 75 MeOH
- Fraksiyon E - % 100 MeOH

Elde edilen bu fraksiyonlardan, Silika jel KK, Sefadeks KK, VSK ile 5 bileşik izole edilmiştir (**P 1-5**). Elde edilen saf bileşiklerin izolasyon aşamalarına ait ayrıntılı bilgi Şekil 3.2 'de verilmiştir.

P-1 Bileşiğinin İzolasyonu;

P-1 bileşiği iki farklı ana fraksiyondan elde edilmiştir.

Poliamid KK' dan alınan Fr. B₂ Sephadex KK'ya uygulanmış metanolle **P-1 (6.2 mg)** izole edilmiştir.

Poliamid KK' dan alınan Fr. C₂ CHCl₃:MeOH:H₂O (95:5:0,5, 90:10:1, 85:15:1,5, 80:20:2, 75:25:2,5, 70:30:3) solvan sistemi kullanılarak silika jel KK'ya uygulanmış ve elde edilen Fr. 232-251 saflaştırma amacı ile VSK'ya uygulanmış %8 metanolle **P-1 (6.1 mg)** izole edilmiştir.

P-2 Bileşiğinin İzolasyonu;

Poliamid KK'dan alınan Fr. E₁, MeOH:H₂O solvan sisteminde artan metanol konsantrasyonu (% 2-100 MeOH) kullanılarak VSK sistemine uygulanmış ve elde edilen Fr. 284- 336'nın CHCl₃:CH₃OH (100:0, 98:2, 96:4, 94:6) solvan sistemi ile silika jel kolona uygulanmasıyla Fr. 36-43 elde edilmiştir. Bu fraksiyon silika jel kolona saflaştırma amacı ile uygulanmış ve kolon EtOAc: *n*-Hekzan (75:25) sistemi ile elüe edilerek **P-2 (1.7 mg)** bileşiği izole edilmiştir.

P-3 Bileşiğinin İzolasyonu;

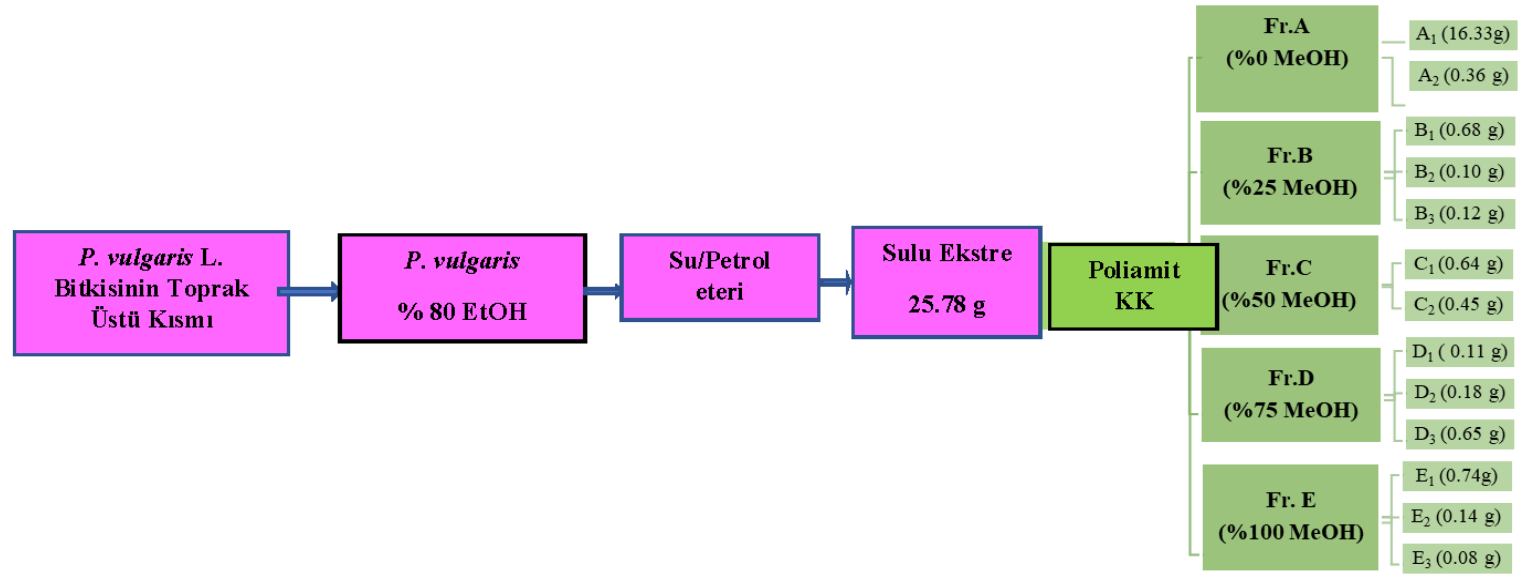
Poliamid KK'dan alınan Fr. D₁ silika jel KK'ya uygulanmıştır. Kolon CHCl₃:MeOH:H₂O (90:10:1, 85:15:1,5, 80:20:2, 75:25:2,5, 70:30:3) solvan sistemi ile elüe edilmiş ve 85:15:1.5 ile **P-3 (6.1 mg)** izole edilmiştir.

P-4 Bileşiğinin İzolasyonu;

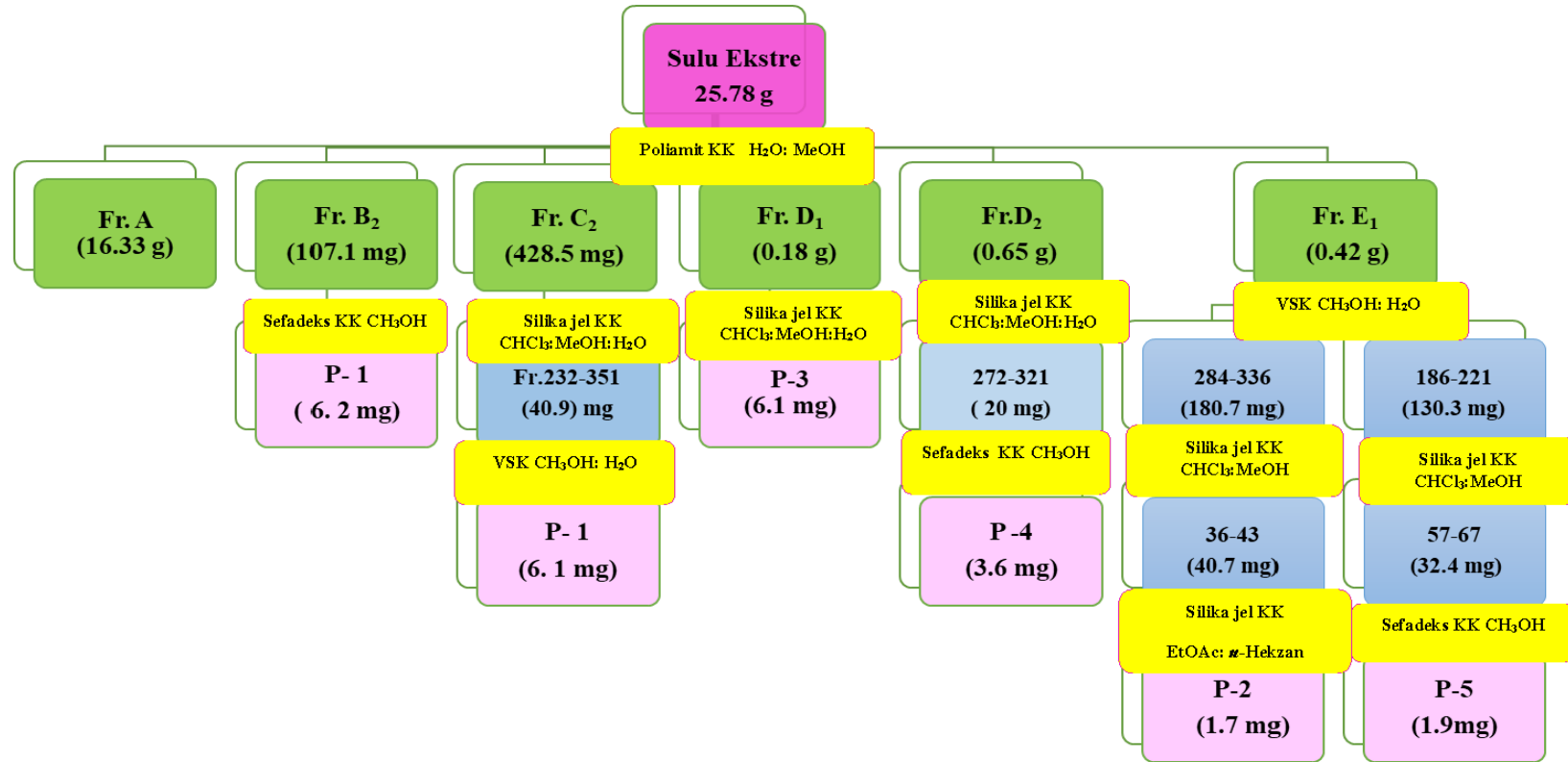
Poliamid KK' dan alınan Fr. D₂ fraksiyonu silikajel KK'ya uygulanmış elde edilen Fr. 272-321 saflaştırma amacı ile sefadeks KK'ya uygulanmış ve metanolle **P-4 (3.6 mg)** bileşiği izole edilmiştir.

P-5 Bileşiğinin İzolasyonu;

Poliamid KK' dan alınan E₁ fraksiyonun tamamı VSK sistemine uygulanmasıyla elde edilen Fr. 186-221'in CHCl₃:CH₃OH (100:0, 98:2, 96:4, 94:6) solvan sistemi kullanılarak silika jel kolona uygulanmasıyla Fr. 57-67 elde edilmiştir. Elde edilen Fr. 57-67 sefadeks kolona saflaştırma amacı ile uygulanmış metanolle **P-5 (1.9 mg)** izole edilmiştir.



Şekil 3.2. Toprak Üstü Kısımları Üzerinde Yapılan Fraksiyonlandırma Çalışması.



Şekil 3.3. P.vulgaris'in toprak üstü kısımları üzerinde yapılan izolasyon çalışmaları

3.2. Biyolojik Etki Çalışmaları

Tez çalışmamızda, ekstre ve izole edilmiş saf bileşiklerden rozmarinik asit (**P-1**), ursolik asit (**P-2**) ve rutin (**P-5**) üzerinde *in vitro* çalışmalar gerçekleştirilmiştir. Asetilkolinesteraz ve bütirilkolinesteraz enzim inhibitör etkileri belirlenmiş ve SH-SY5Y hücresinde MTT yöntemi ile numunelerin hücre canlılığı üzerine olan etkileri ve H₂O₂ ile muamele edilmiş SH-SY5Y hücrelerinde koruyucu etkileri tayin edilmiştir.

3.2.1. Asetilkolinesteraz (AChE) ve Bütirilkolinesteraz (BChE)

İnhibisyonu

Ellman ve arkadaşları tarafından geliştirilen kolorimetrik AChE ve BChE inhibitör aktivite tayini yöntemi modifiye edilerek kullanılmıştır (91). AChE ve BChE enzim olarak; asetilkolin iyodür (ATChI) ve butirilkolin iyodür (BuTChI) reaksiyonda substrat olarak; renklendirici madde olarak ise 5,5'-Ditiyo-bis (2-nitrobenzoik)asit (DTNB) kullanılmıştır. Ekstrenin DMSO'da çözülmüş 400 mg/ml stok çözeltisinden; 50, 200, 400 ve 1000 final konsantrasyonda olacak şekilde; saf maddelerin ise DMSO'de çözülmüş 100 mM stok çözeltisinden; 5 µM, 20 µM, 50 µM ve 100 µM final konsantrasyonlarında dilüsyonları hazırlanmıştır. Pozitif kontrol olarak 0,5 µM, 1 µM, 2,5 µM, 5 µM ve 12,5 µM konsantrasyonlarda takrin kullanılmıştır.

96 kuyucuklu mikrolaktaki bütün kuyucuklara ilk önce 40 µl fosfat tamponu (pH = 8.0) mikropipet yardımı ile konulmuştur. Mikroplağın ilk 6 ve son 6 kuyucuğu kontrol olarak ayrılmıştır. Hazırlanmış olan test örneklerinden 20'şer µl, her örnek 3 paralel olacak şekilde geriye kalan kuyucuklara eklenmiştir. 20 µl enzim çözeltisi (0.26 U/ml) eklendikten sonra 100 µl 3 mM 5,5'-ditiyo bis-(2-nitrobenzoik asit) ilave edilmiş ve 30 dakika 37°C'de inkübe edilmiştir. Süre sonunda mikrolaktaki tüm kuyucuklara 20 µl 15 mM substrat (ATChI veya BuTChI) ilave edilerek reaksiyon başlatılmıştır. Absorbans, 4 dakika sonunda mikrolaka okuyucu kullanılarak 405 nm'de ölçülmüştür. Her örnek 3 paralel çalışılmış ve sonuçlar farklı zamanlarda yapılan 3 deneyden elde edilen %inhibisyonların ortalaması ± standart sapma olarak verilmiştir. Her bir örneğin inhibisyon oranı aşağıdaki gibi hesaplanmıştır.

$$\% \text{ İnhibisyon} = 100 \times \left[\frac{(\text{Abs}_{\text{örnek}} - \text{Abs}_{\text{kör}})}{\text{Abs}_{\text{örnek}}} \right]$$

3.2.2. SH-SY5Y Hücrelerinde Nöroprotektif Etkinin Belirlenmesi

SH-SY5Y hücreleri yüksek glukoz içerikli DMEM (%10 FBS, antibiyotikler ve L-glutamin içeren) ile 37°C'de % 5 CO₂ içeren ortamda inkübe edilmiş ve belirgin bir yoğunluğa ulaştığında pasajlanmıştır. Hücre süspansiyonu 2x10⁵ hücre/ml olarak hazırlanmış 96 kuyucuklu plakalara 100'er µl olarak aktarılmıştır. Hücreler deney için yeterli sayıya ulaşmıncaya kadar 37 °C'de %5 CO₂ içeren inkübatörde bekletilmiş ve sürenin sonunda vasat aspire edilmiştir. Ekstre (1 µg/ml, 10 µg/ml, 50 µg/ml ve 100 µg/ml) ve saf maddeler (0.1 µM, 1 µM, 10 µM ve 100 µM) 50'şer µl kuyucuklara eklenmiş ve üzerine 500 µM H₂O₂ çözeltisinden 50 µl ilave edilmiştir. 24 saat inkübasyon sonrasında, 5 mg/ml konsantrasyonundaki MTT çözeltisi, her bir kuyucuğa 10 µl olacak şekilde eklenmiştir. Formazan kristallerinin çözünmesi için 4-6 saat beklenmiş ve ardından 100 µl DMSO eklenerek homojen bir karışım elde edilmiştir. Son adımda, hücre canlılığı oranları, spektrofotometrede 577/655 nm dalga boylarında ölçülen absorbans değerleri kullanılarak hesaplanmıştır. Her bir örneğin yaşam oranı aşağıdaki gibi hesaplanmıştır (90).

$$\% \text{ Hücre Canlılığı} = \left[\frac{(100 - (\text{Kontrol absorbansı} - \text{örnek absorbansı}))}{\text{kontrol absorbansı}} \right] \times 100$$

3.3. İstatiksel Analiz Yöntemi

Sonuçlar ortalama±standart hata olarak sunulmuştur. Analizler GraphPad 8.0 (Kaliforniya, ABD) programı kullanılarak yapılmıştır. İstatistiksel analiz tek-yönlü ANOVA post hoc Tukey ile yapılmış ve $p < 0,05$ anlamlı kabul edilmiştir.

3.4. Fitokimyasal ve Biyolojik Etki Çalışmalarında Kullanılan Aletler

Derin dondurucu	: (-20°C) Arçelik
Diyafram Pompa	: Herkules 200/10/24 Air Compressor
Etüv	: Elektro-mag
Hassas Terazi	: Sartorius CP224S, Shimadzu AUW220D, Denver Instrument SI-234
Terazi	: AND EK-600H, Denver Instrument TP-3002
İTK plak ısıtıcı	: Camag TLC Plate Heater III
Kromatografi Tankı	: Camag (cam küvet, 22 x 23 x 8 cm)
Liyofilizatör	: Christ Alpha 1-2 LD-Plus
Manyetik Karıştırıcı	: Heidolph
Rotavapor	: Büchi R 200, Büchi R 210
Ultrasonik Banyo	: Transsonic 570
UV Lamba	: Camag
CO₂ İnkübatörü	: Sanyo MCO-18AIC (UV)
Çalkalamalı Su Banyosu	: Major Science
Derin dondurucu	: (-20°C) Arçelik (-80°C) Nüve Direct freeze 290
Etüv	: Elektro-mag
Hassas Terazi	: Sartorius CP224S, Shimadzu AUW220D, Denver Instrument SI-234
İnverted Mikroskop	: Leica DMIL LED
Laminar Air Flow Kabini	: Chemocell LRCx-UV (Teknomar)
Otoklav	: Autoclave HS 9041
Otomatik Pipetler	: 10 µl, 100µl, 200µl, 1000 µl (Transferpette)
Santrifüj	: UniGen 15D, Herolab
Ultrasonik Banyo	: Transsonic 570
Plate ısıtıcı- çalkalayıcı	: Biosan Thermo-shaker PST-100HL

4. BULGULAR

Tez çalışmamızın bulguları; *Prunella vulgaris* L. bitkisinin toprak üstü kısımlarından %80 etanol ile hazırlanmış ekstrenin suda çözünen kısmından (sulu ekstre) değişik kromatografik yöntemlerle izole edilen saf bileşiklerin yapı tayinlerinin açıklandığı “**Fitokimyasal Çalışmalara Ait Bulgular**” ve nöroprotektif etkinin tayininde kullanılan hücre kültürü [SH-SY5Y (insan nöroblastoma)] ile asetilkolinesteraz ve bütirilkolinesteraz enzim inhibitör etkileri gibi *in vitro* biyolojik etki çalışmalarının sonuçlarının verildiği “**Biyolojik Etki Çalışmalarına Ait Bulgular**” olmak üzere 2 ana başlık altında sınıflandırılıp açıklanmıştır.

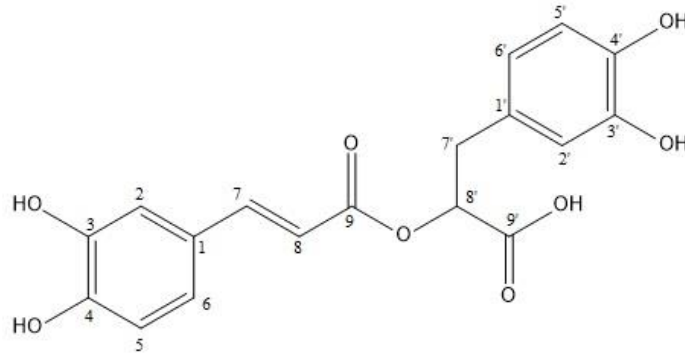
4.1. Fitokimyasal Çalışmalara Ait Bulgular

P. vulgaris bitkisinin toprak üstü kısımlarından elde edilen sulu ekstrenin poliamit kolon fraksiyonları üzerinde, değişik kromatografik yöntemler kullanılarak gerçekleştirdiğimiz izolasyon çalışmaları sırasında 5 bileşik izole edilmiştir. Bu bileşiklere (**P-1**→**P-5**) kodu verilmiş ve isimlendirilmelerinde Türkçe okunuşları esas alınmıştır.

İzole edilen bileşiklerin yapıları 1D-NMR (¹H ve ¹³C NMR), 2D-NMR (COSY, HSQC ve HMBC) spektroskopileri ve kütle spektroskopisi kullanılarak aydınlatılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre; bu bileşiklerin rozmarink asit (**P-1**), ursolik asit (**P-2**), kemferol-3-*O*-rutinozit (**P-3**), kersetin 3-*O*-glukozit (**P-4**) ve rutin (=kersetin-3-*O*-rutinozit (**P-5**)) olduğu anlaşılmıştır.

Rozmarinik Asit (P-1)

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



Molekül Ağırlığı: 360.3 g/mol

LC-QTOF/MS (m/z)	359 [M-H] ⁻
¹ H NMR	Tablo 4.1 Şekil 4.1
¹³ C NMR	Tablo 4.1 Şekil 4.2
COSY	Şekil 4.3
HSQC	Şekil 4.4
HMBC	Şekil 4.5

P-1, krem renkli amorf bir katı olarak izole edilmiştir. İTK analizinde revelatör olarak vanilin/H₂SO₄ püskürtülmüş, plağın 105°C'de 1-2 dak. ısıtılması sonucunda bileşik, kromatogramda zamanla solan koyu pembe renkli bir leke vermiş UV-366'da mavi floresans gözlenmesi bileşiğin fenolik asit olabileceğini düşündürmüştür.

Bileşiğin LC-QTOF/MS analizinde m/z 359'da gözlenen [M-H]⁻ iyon piki, bileşiğin ¹³C NMR spektrumundaki 18 karbon sinyali, ¹H NMR ve 2D NMR spektrumları ile birlikte değerlendirildiğinde, bileşiğin, yapısında kafeik asit taşıyan

disübstitüe bir fenolik asit olduğu belirlenmiş ve kapalı formülü $C_{18}H_{16}O_8$ olarak bulunmuştur.

P-1 'in 1H NMR spektrumunda δ_H 7,02-6,62 ppm arasında gözlenen 2 ABX sistemine ait 6 proton sinyali yorumlandığında, 1,3,4-trisübstitüe benzen halkalarını gösteren sinyaller, δ_H 7,02 ppm (d, $J=2$ Hz, H-2), δ_H 6,76 ppm (d, $J=8$, H-5), δ_H 6,92 ppm (dd, $J = 8.5/2$ Hz, H-6), δ_H 6,67 (d, $J=8$, H-2'), δ_H 6,66 (d, $J = 8$ Hz, H-5'), δ_H 6,62 (dd, $J = 8/2$ Hz, H-6') de görülmüştür (Şekil 4.1, Tablo 4.1). Bu protonları taşıyan karbon sinyalleri ise HSQC spektrumundan yararlanılarak tespit edilmiştir (Şekil 4.5, Tablo 4.1). δ_H 6,26 ppm (d, $J = 16.0$ Hz, H-8), δ_H 7,50 ppm (d, $J = 16.0$ Hz, H-7) de gözlenen AB sistem şeklindeki 2 proton sinyali, yapıda olefinik protonlar bulunduğuna işaret etmiş ve bu protonların yüksek kenetlenme sabitine sahip olması ($J = 16.0$ Hz) *trans* konumunda olduklarını göstermiştir. HSQC spektrumundan olefinik protonların karbon sinyallerinin δ_C 115,1 ve 146,7 ppm'de yer aldığı belirlenmiştir. Bu bulgular δ_C 168,9 ppm'de gözlenen doymamış ester karbonili sinyali ile birlikte değerlendirildiğinde yapıdaki *trans*-kafeik asit doğrulanmıştır (Şekil 4.5, Tablo 4.1). δ_H 5,09 (dd, $J = 3,5/10$, H-8') da görülen sinyal bir metin protonunu δ_H 3,09 (dd, $J = 3.5/10$ Hz, H-7a') ve δ_H 2,93 (dd, $J= 14.5$ Hz, H-7b') de iki proton değerindeki dublet-dublet şeklindeki sinyaller ise C-7' konumundaki metilen protonlarını göstermektedir. HSQC spektrumundan bu protonların karbon sinyalleri sırasıyla δ_C 77,2 (C-8') ve 38,6 (C-7') ppm olarak saptanmıştır. Bu sinyaller, 2.ABX sistemi ile birlikte değerlendirildiğinde ve δ_C 172,9 ppm'de görülen karboksilat anyonu dikkate alındığında yapıda bir de dihidroksifenillaktik asit yapısı bulunduğu anlaşılmıştır (Şekil 4.5, Tablo 4.1).

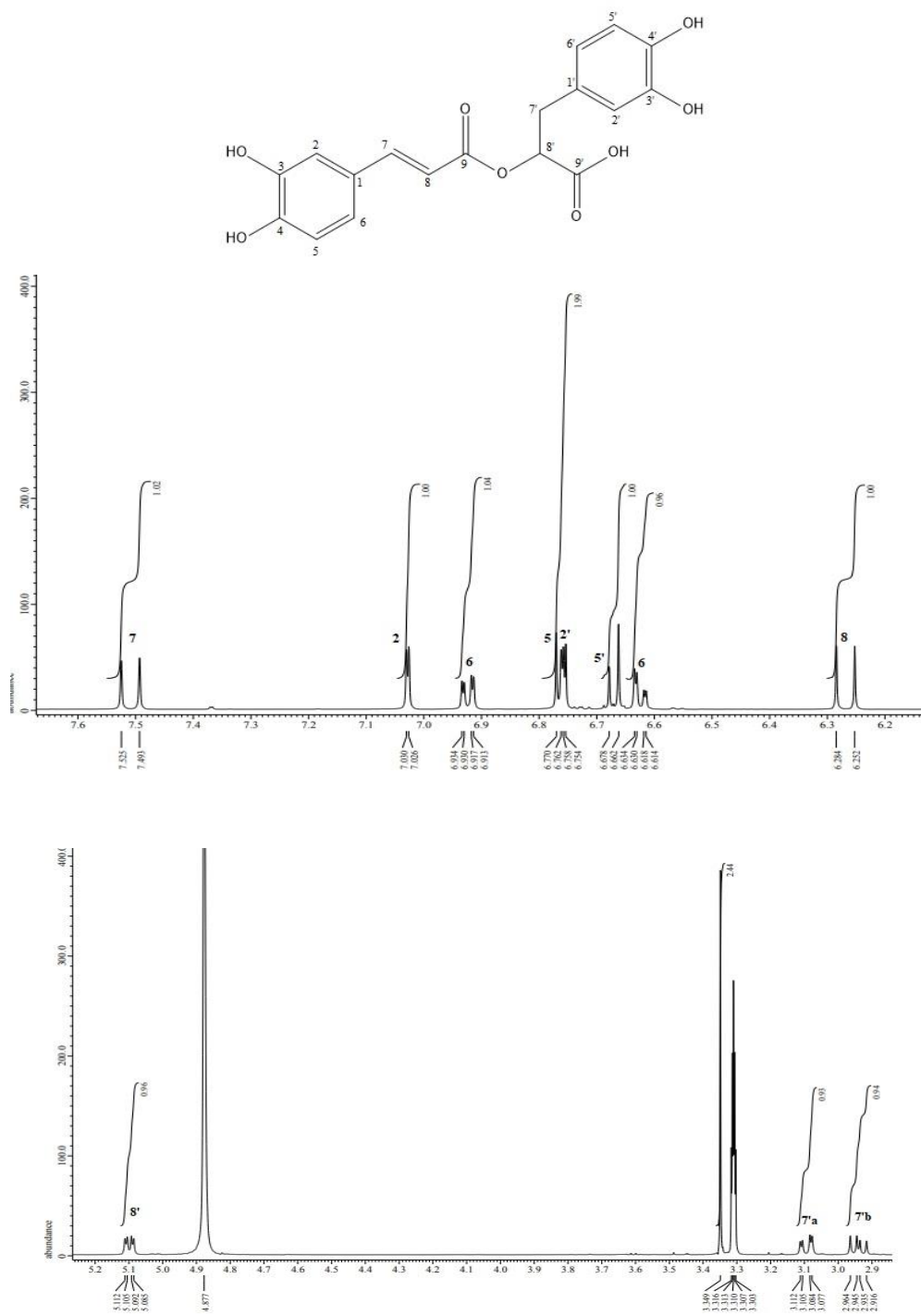
P-1'in COSY spektrumunda δ_H 3,09/ 2,93 (H-7'a/b) arasında; δ_H 5,09 (H-8') ile δ_H 3,09/2,93 (H-7') arasında; δ_H 7,50 (H-7) ile δ_H 6,26 (H-8) arasında görülen korelasyonlar bu protonların aynı spin sistemi içinde yer aldıklarını göstermiş ve yukarıdaki bulguları doğrulamıştır (Şekil 4.3).

Bileşiğin HMBC spektrumunda görülen, C-8' konumunda yer alan protonun (δ_H 5,09, H-8') C-9 konumundaki doymamış ester karbonili (δ_C 168,9) ile uzak mesafeli etkileşimi *trans*-kafeik asidin 3,4-dihidroksifenillaktik asit ile 8' konumundan bağlı olduğunu göstermiştir. Ayrıca, HMBC spektrumunda; olefinik protonlar (δ_H 6,26, H-8 ve δ_H 7,50, H-7) ile C-9 (δ_C 168,9), H-8' (δ_H 5,09), H-2' (δ_H 6,67) ve H-6'

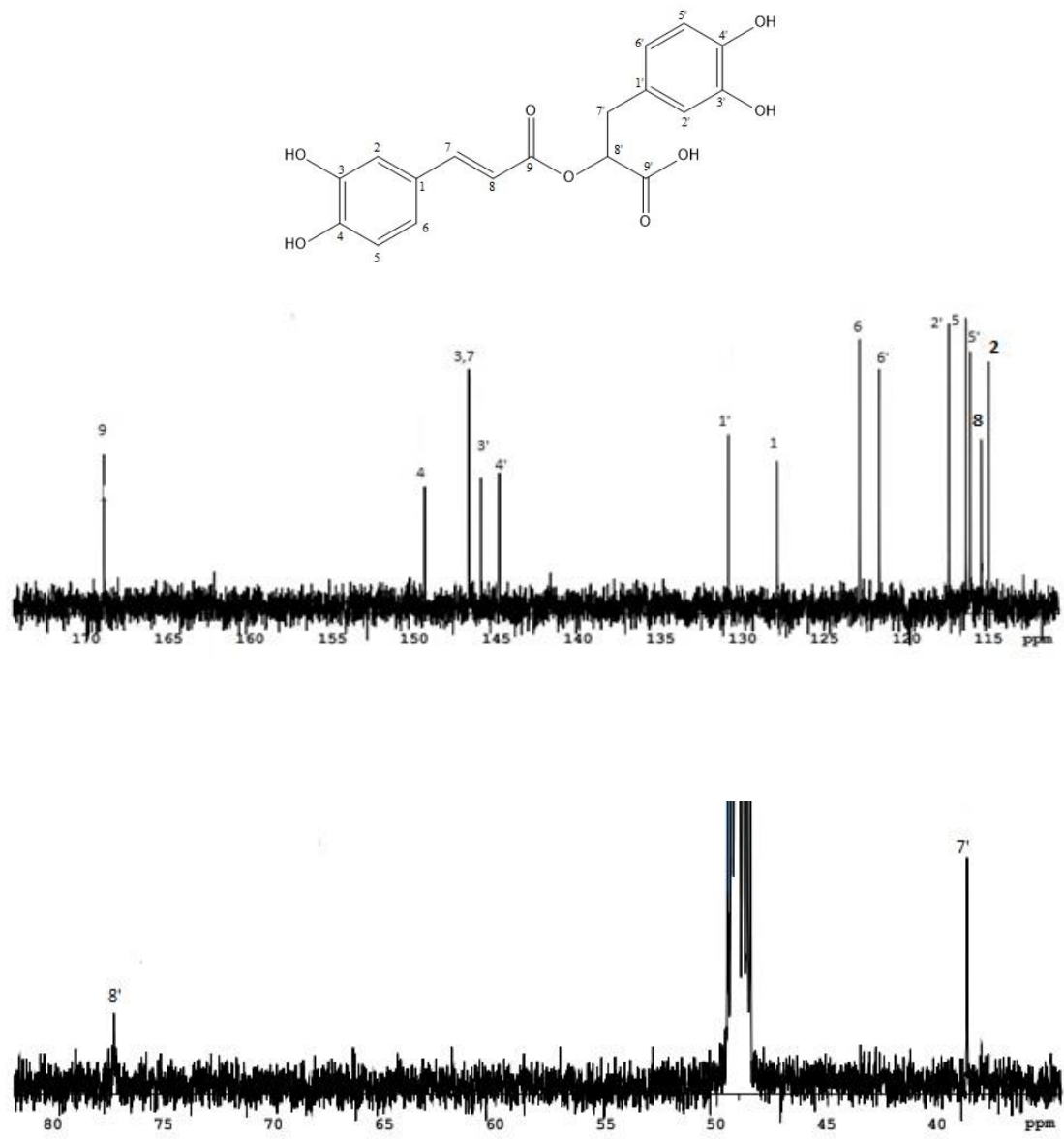
(δ_H 6,62) ile C-7' (δ_C 38,7), H-7' (δ_H 3,09-2,93) ile C-9' karboksilat karbonu (δ_C 172,9) arasında gözlenen uzak mesafeli etkileşimler **P-1** bileşiğinin yapısını kesin olarak doğrulamıştır (Şekil 4.4, Tablo 4.1). **P-1** bileşiğinin yapısı, 1D ve 2D (COSY, HSQC, HMBC) NMR spektrumlarının yorumlanması ve spektral değerlerin literatürde bulunan bilgilerle karşılaştırılması sonucunda **rozmarinik asit** olarak aydınlatılmıştır (91, 92). Bu bileşik daha önce *Prunella vulgaris*, *P. vulgaris* var. *lilacina*, *P. orientalis*, *P. grandiflora* ve *P. vulgaris* subsp. *asiatica* türlerinde tespit edilmiştir (1, 32, 39, 41, 43-45, 93)

Tablo 4.1. Rozmarinik asit (**P-1**) 'nin ^{13}C ve 1H NMR spektroskopik değerleri (CD3OD; ^{13}C : 125 MHz; 1H : 500 MHz); önemli HMBC korelasyonları.

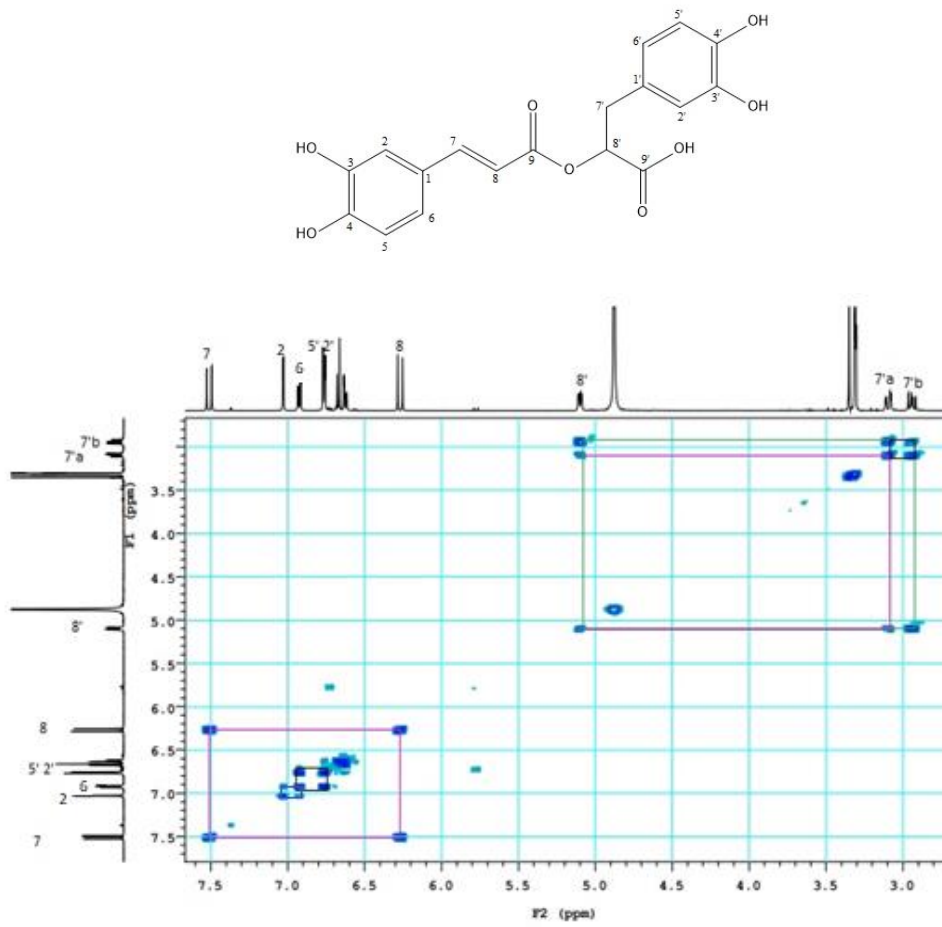
C/H	DEPT	δ_C (ppm)	δ_H (ppm)	J Hz	HMBC (H→C)
1	C	127,9			
2	CH	115,5	7,02 d	2	C-4, C-6, C-7
3	C	146,7			
4	C	149,4			
5	CH	116,4	6,76 d	8	C-1, C-2, C-3
6	CH	122,9	6,92 dd	2/8.5	C-2, C-4, C-7
7	CH	146,7	7,50 d	16	C-2, C-6, C-9
8	CH	115,1	6,26 d	16	C-1, C-9
9	C=O	168,9			
1'	C	130,9			
2'	CH	117,4	6,67 d	2	C-4', C-6', C-7'
3'	C	146,0			
4'	C	144,9			
5'	CH	116,2	6,66 d	8	C-1', C-3'
6'	CH	121,7	6,62 dd	2/8	C-2', C-4', C-7'
7'a	CH ₂	38,7	3,09 dd	3.5/14	
7'b	CH ₂	38,7	2,93 dd	14.5/10	
8'	CH	77,3	5,09 dd	3.5/10	C-9
9'	C=O	172,9			



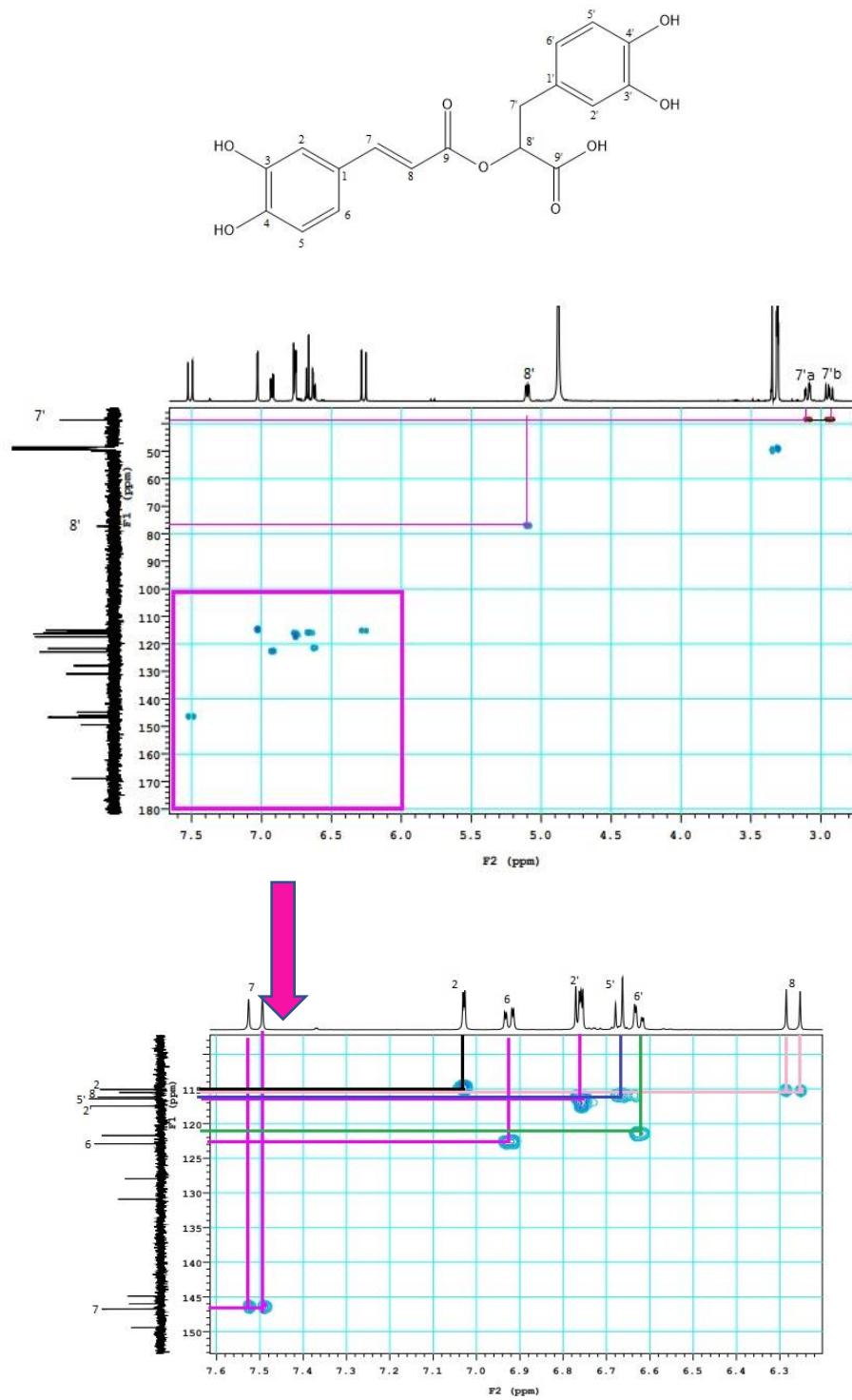
Şekil 4.1. Rozmarinik asit (P-1)'in ^1H NMR spektrumu (CD_3OD , 500 MHz)



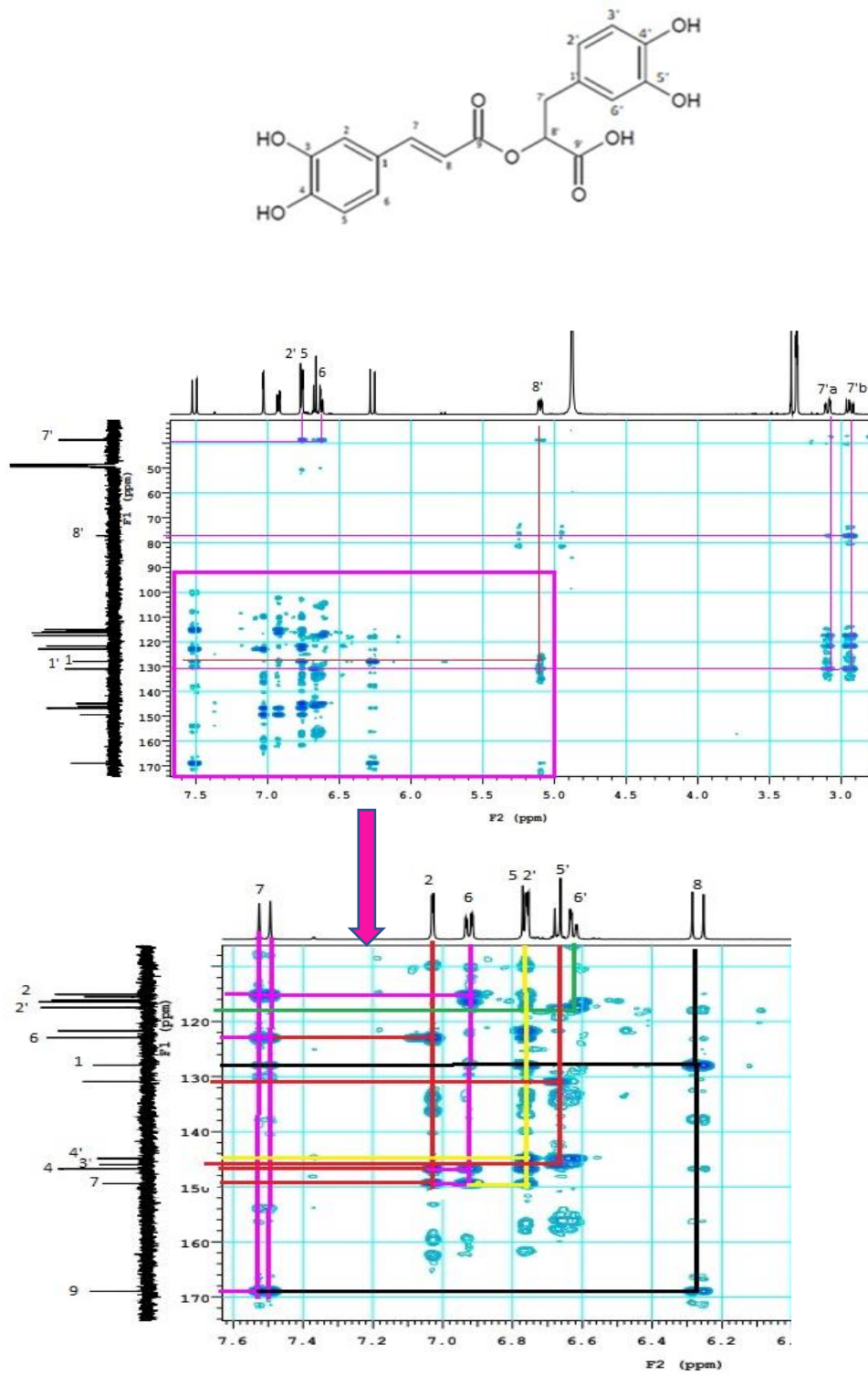
Şekil 4.2. Rozmarinik asit (P-1) 'in ^{13}C NMR spektrumu (CD_3OD , 125 Hz).



Şekil 4.3. Rozmarinik asit (**P-1**)'in 2D ¹H, ¹H-homonükleer korelasyonlu spektrumu (COSY).

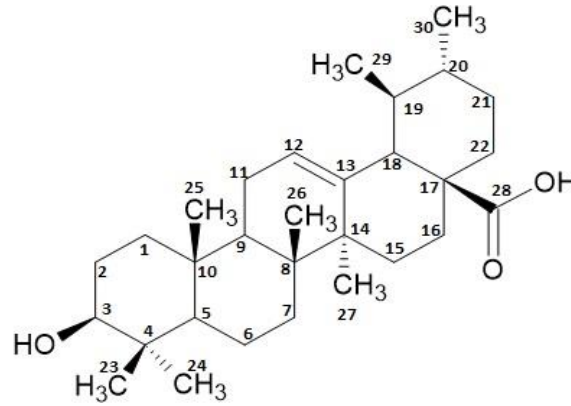


Şekil 4.4. Rozmarinik asit (P-1) 'in 2D ¹H, ¹³C-heteronükleer korelasyonlu (yakın mesafe) spektrumu (HSQC).



Şekil 4.5. Rozmarinik asit (P-1)' in 2D ^1H , ^{13}C -heteronükleer korelasyonlu (uzak mesafe) NMR spektrumu (HMBC).

Ursolik Asit [P-2]



Molekül Ağırlığı: 456.7 g/mol

^1H NMR	Tablo 4.2 Şekil 4.6
^{13}C NMR	Tablo 4.1 Şekil 4.7
COSY	Şekil 4.8
HMQC	Şekil 4.9
HMBC	Şekil 4.10

Beyaz renkli amorf yapılı P-2 bileşiğinin İTK analizinde revelatör olarak vanilin/ H_2SO_4 kullanılmış, plak 105°C 'de 1-2 dak. boyunca ısıtılmış ve kromatogramda, bileşiğin terpen yapısında olabileceğine işaret eden, pembe-mor renkli bir leke gözlenmiştir.

Bileşiğin tüm proton ve karbon NMR spektral değerlerinin ^1H NMR ve 2D NMR spektrumları yardımıyla yorumlanması sonucunda yüksek alanda yoğun olarak görülen sinyaller, 30 C atomuna sahip olması ve COSY spektrumunda gözlenen spin sistemleri bileşiğin triterpen yapısında olabileceğini göstermiştir.

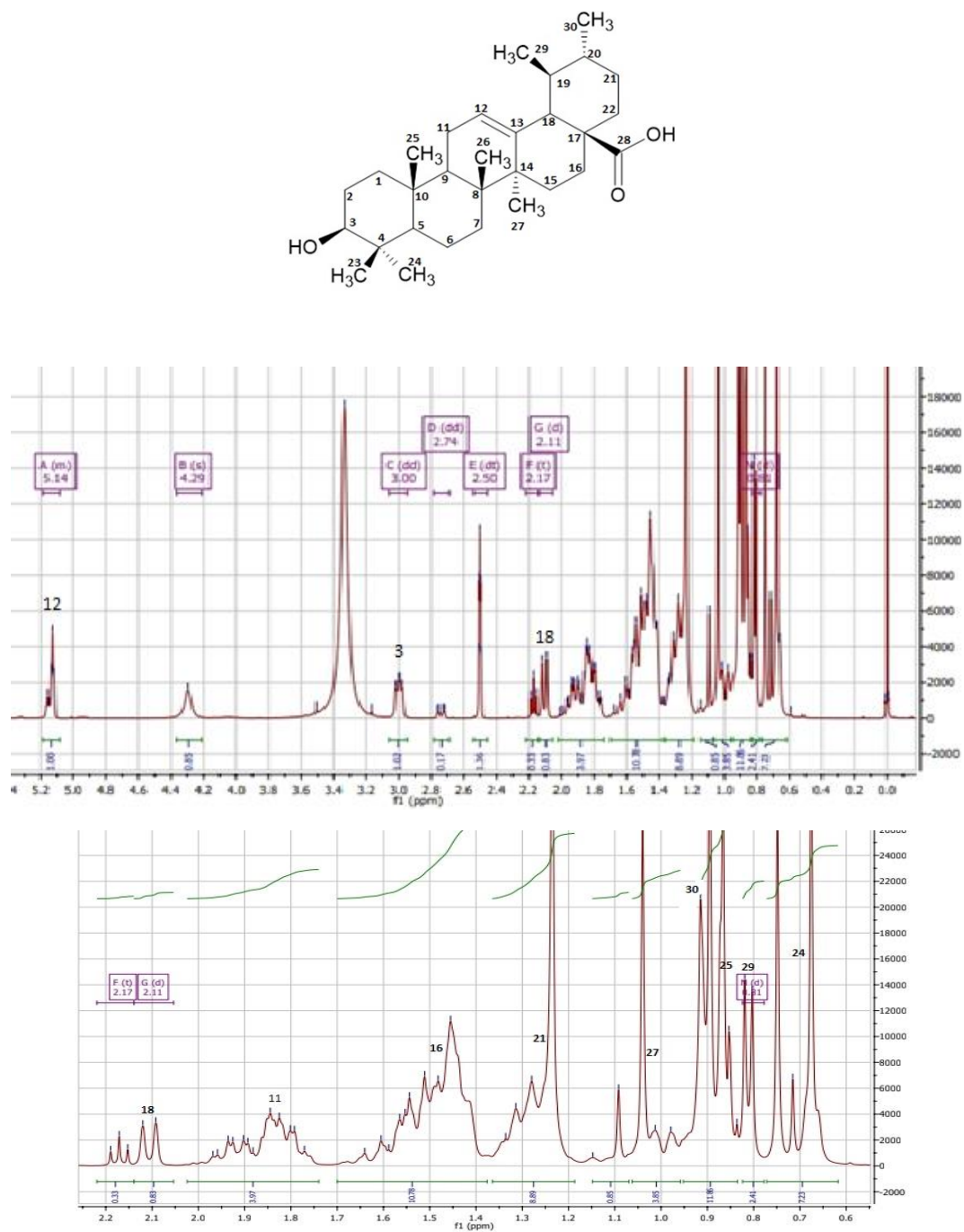
P-2' nin ^1H NMR spektrumu incelendiğinde, δ_{H} 3,00 ppm'de (dd, $J=10.8/5.6$, H-3) gözlenen proton sinyali bir hidroksil komşuluğuna, δ_{H} 5,13 ppm'de (dt, $J=12/3.6$, H-12) görülen proton sinyali ise olefinik proton varlığına işaret etmiştir. Bunların yanında δ_{H} 0,67-1,03 ppm arasında, 3H değerinde, 5'i singlet, 2'si dublet şeklinde çıkan sinyaller, yapıda 7 metil grubu olduğunu göstermiştir (Şekil 4.6, Tablo 4.2). HMQC spektrumundan yararlanılarak bu protonlara ait karbon sinyalleri belirlenmiştir (Şekil 4.9, Tablo 4.2). ^{13}C NMR spektrumunda düşük alanda gözlenen, δ_{C} 125,0 (C-12, katerner) ve δ_{C} 138,6 (C-13, katerner) sinyalleri ile ^1H NMR spektrumunda δ_{H} 0,89 (H-29) ve δ_{H} 0,96 ppm'de (H-30) dublet olarak gözlenen 2 metil sinyali literatür verileri ile karşılaştırıldığında, C-12/C-13 çifte bağ ve 2 tane dublet metil sinyalinin ursan tipi triterpenler için karakteristik olduğu ve bileşiğin ursan yapısında olabileceğini göstermiştir. ^{13}C NMR spektrumunda, δ_{C} 178,7 ppm'de bir katerner karbon sinyalinin gözlenmesi, karboksilik asit varlığına işaret etmiştir. **P-2'** nin COSY spektrumunda δ_{H} 1,44 (H-2) ile δ_{H} 3,00 (H-3); δ_{H} 0,67 (H-5) ile δ_{H} 1,49 (H-6); δ_{H} 1,45 (H-9) ile δ_{H} 1,84 (H-11) ve δ_{H} 1,84 (H-11) ile δ_{H} 5,13 (H-12) arasında spin sistemleri belirlenmiştir (Şekil 4.6). **P-2'** nin HMBC spektrumu yardımıyla metil gruplarının uzak mesafe etkileşimleri aydınlatılmış ve ursan yapısına bağlanma noktaları kesin olarak belirlenmiştir. Ayrıca, δ_{H} 2,1 (H-18) protonu ile δ_{C} 178,7 karbonil karbonu arasındaki uzak mesafe etkileşimi de karbonil grubunun bağlantı noktasını açıklamıştır. (Şekil 4.10, Tablo 4.2).

P-2 bileşiğinin yapısı, 1D ve 2D (COSY, HMQC, HMBC) NMR spektrumlarının yorumlanması ve spektral değerlerin literatürde bulunan bilgilerle karşılaştırılması sonucunda **ursolik asit** olarak aydınlatılmıştır (33). Ursolik asit daha önce *Prunella vulgaris* ve *P. vulgaris* var. *lilacina* türlerinden izole edilmiştir (1, 30, 33, 83).

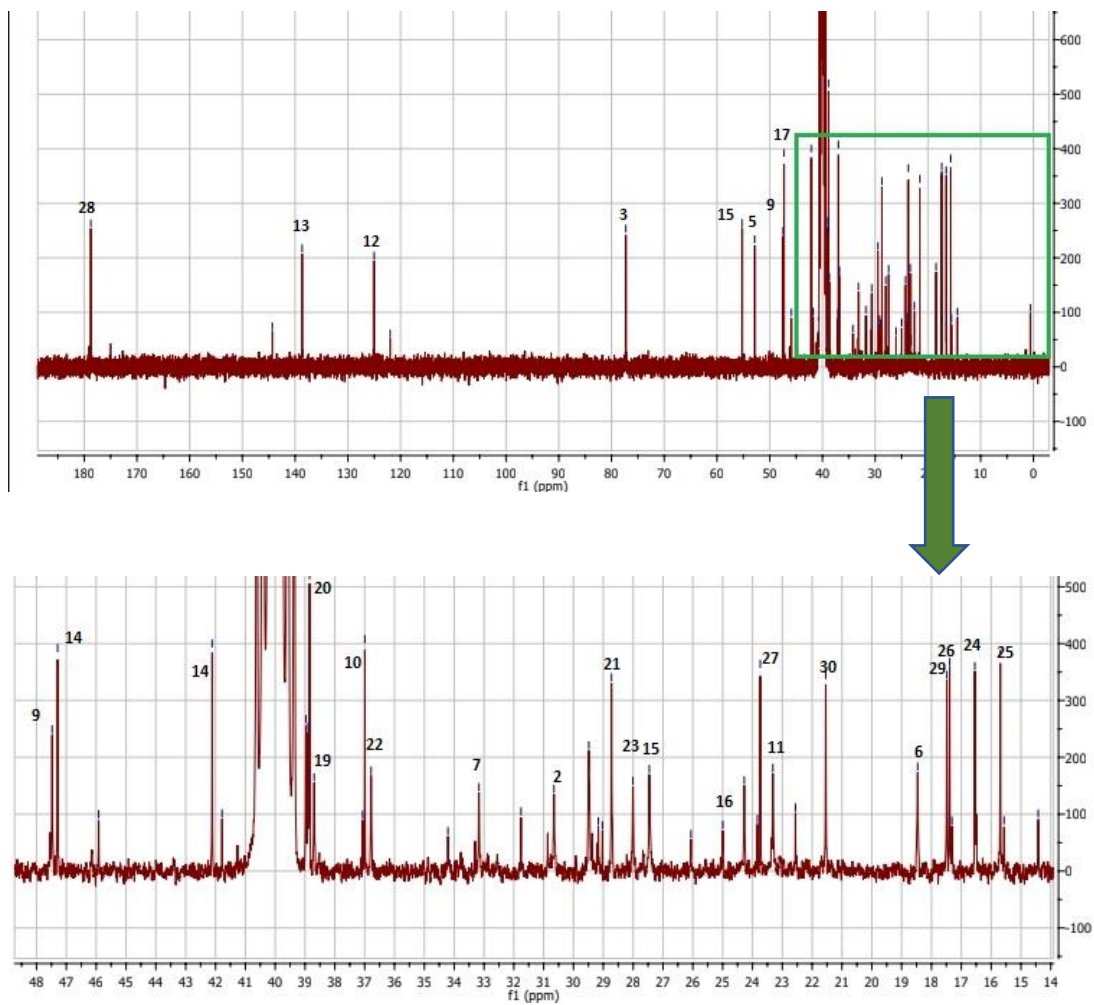
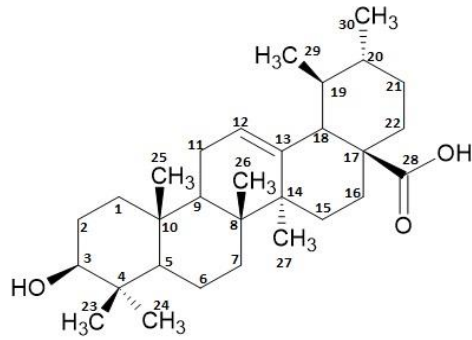
Tablo 4.2. Ursolik asit (**P-2**)'in ^{13}C ve ^1H NMR spektroskopik değerleri (CD_3OD ; ^1H : 400 MHz, ^{13}C :100 MHz) önemli HMBCkorelasyonları.

C/H	DEPT	δ_{C} ppm	δ_{H} ppm	J (Hz)	HMBC (H→C)
1	CH ₂	38,2	0,90 ve 1,55		
2	CH ₂	30,6	1,44		
3	CH	77,2	3,00 dd	10.8/5.6	C-23, C-24
	CH		3,39 s		
4	C	38,8			
5	CH	55,2	0,67 d	6.4	
6	CH ₂	18,4	1,49*		
7	CH ₂	33,1	1,44 ve 1,23*		
8	C	39,3			
9	CH	47,4	1,45*		
10	C	36,9			
11	CH ₂	23,3	1,84*		C-9
12	CH	125,0	5,13 dt	12/3.6	C-9, C-14, C-18
13	C	138,6			
14	C	42,1			
15	CH ₂	27,4	1,43*		
16	CH ₂	25,0	1,45*		C-14
17	C	47,2			
18	CH	52,8	2,10 d	11.2	
19	CH	38,8	0,9*		
20	CH	38,9	1,28*		
21	CH ₂	29,4	1,22*		
22	CH ₂	36,7			
23	CH ₃	28,7	0,89*		C-3, C-4, C-5, C-24
24	CH ₃	16,5	0,67*		C-3, C-4, C-5, C-23
25	CH ₃	15,6	0,85 s		C-5, C-9, C-10
26	CH ₃	17,3	0,73*		C-7, C-8, C-9, C-14
27	CH ₃	23,7	1,03 s		C-8, C-13, C-14
28	C	178,7			
29	CH ₃	17,4	0,81 d	6.36	C-18, C-20
30	CH ₃	21,5	0,90 d	8	C-17, C-21, C-22

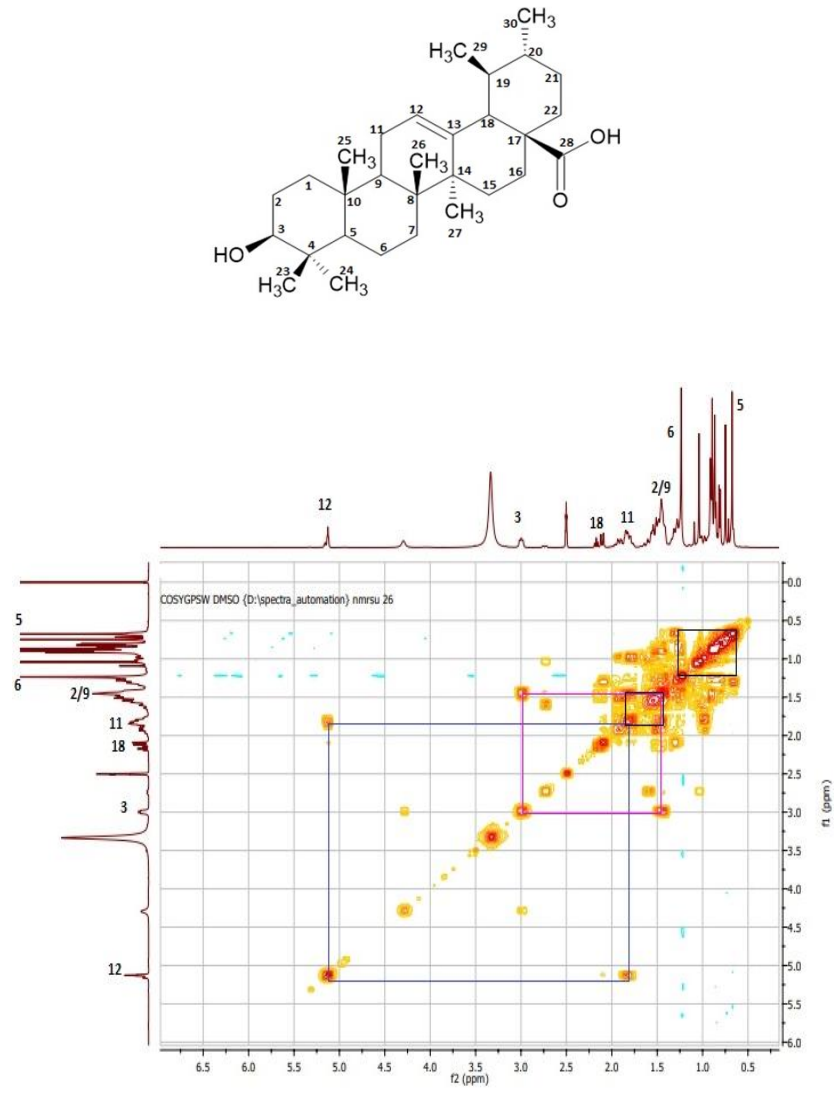
*Girişim nedeniyle bazı sinyallerin kenetlenme sabitleri (J) hesaplanamamıştır.



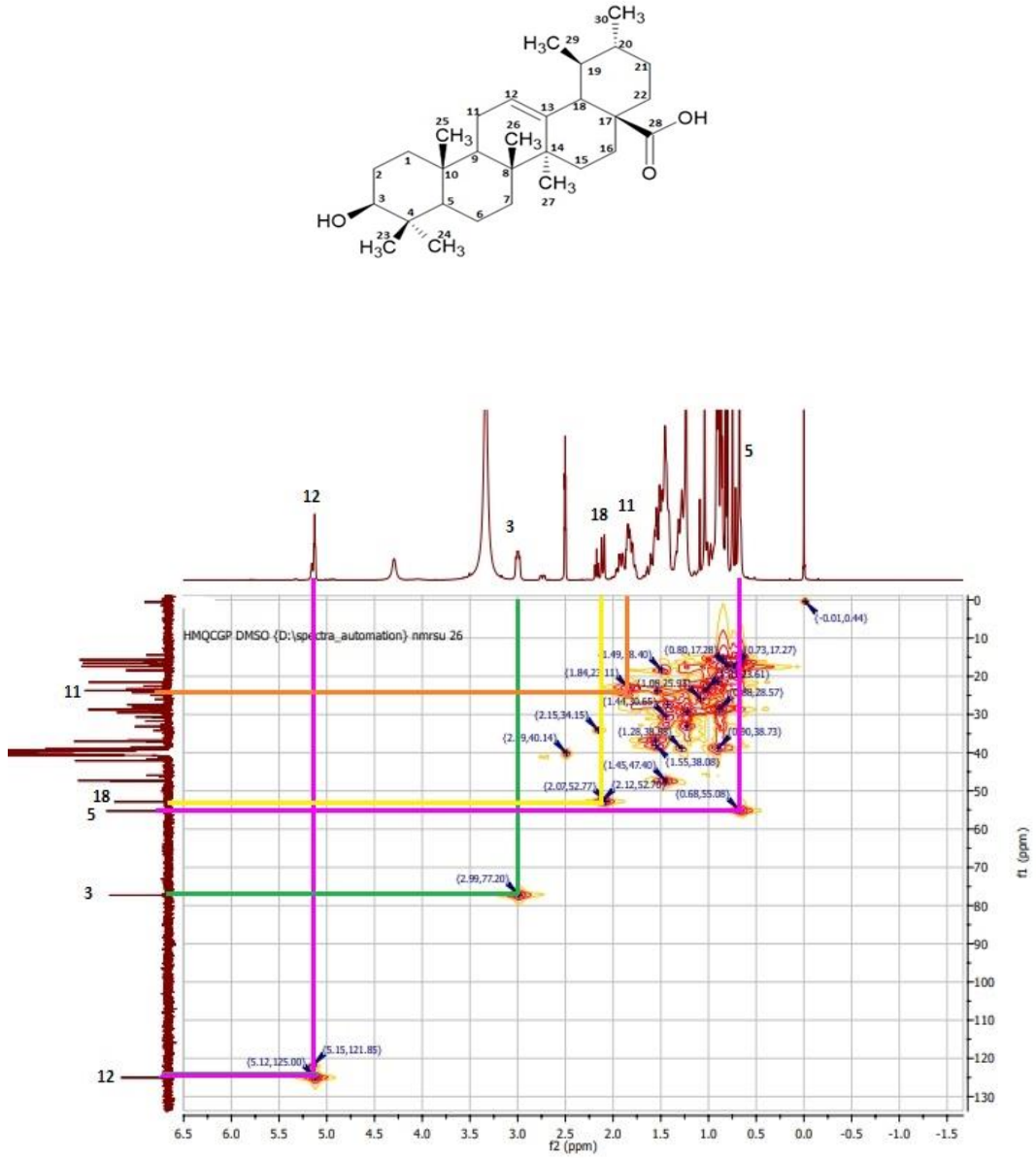
Şekil 4.6. Ursolik asit (P-2)'in ^1H NMR spektrumu (CD_3OD , 400 MHz).



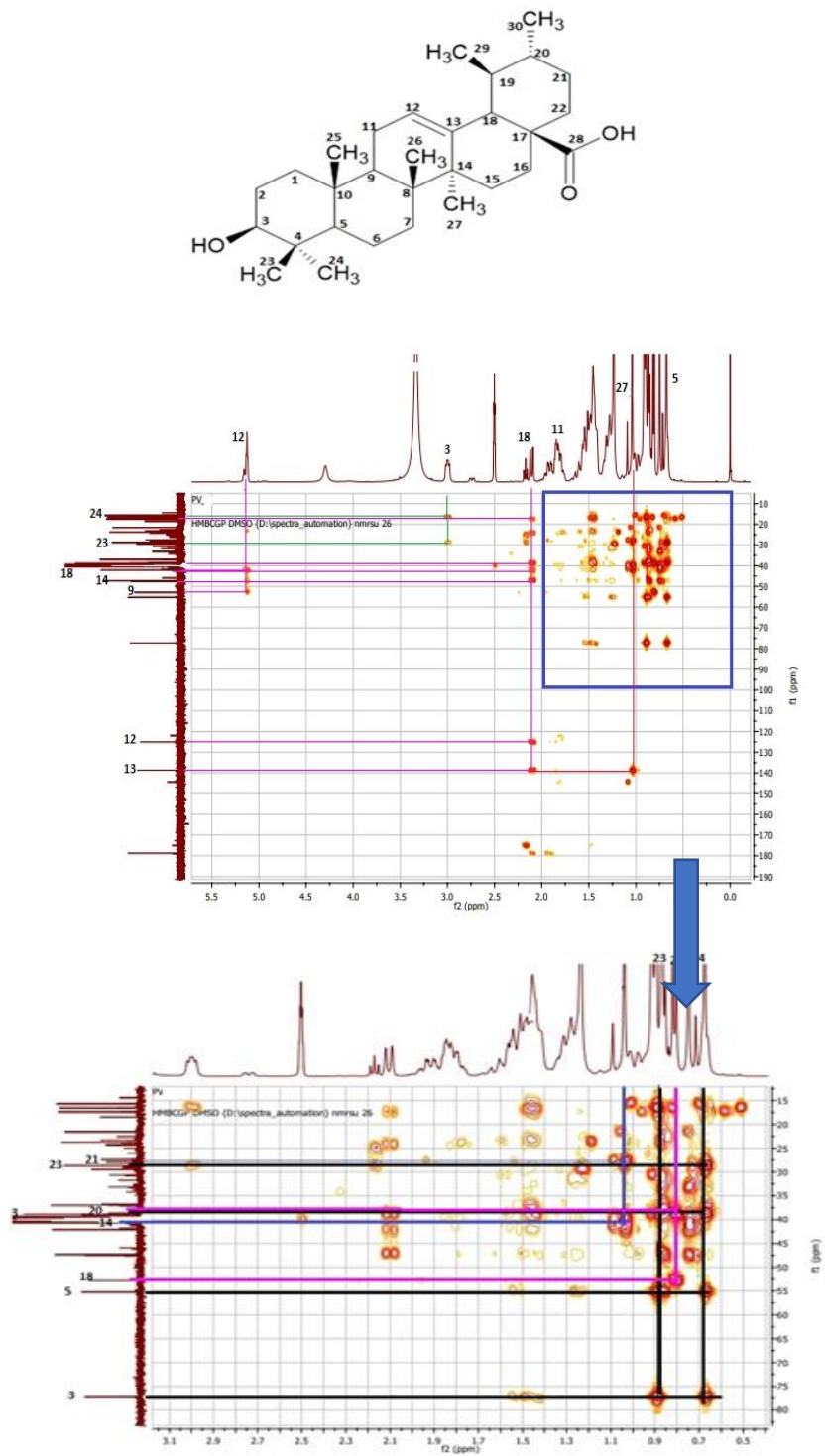
Şekil 4.7. Ursolik asit (P-2)'in ^{13}C NMR spektrumu (CD_3OD , 100 MHz).



Şekil 4.8. Ursolik asit (P-2)'in 2D ¹H, ¹H-homonükleer korelasyonlu spektrumu (COSY)

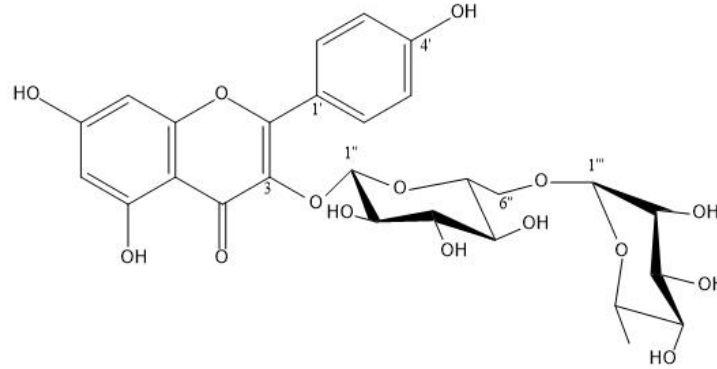


Şekil 4.9. Ursolik asit (P-2)'in 2D ^1H , ^{13}C -heteronükleer korelasyonlu (yakın mesafe) NMR spektrumu (HMQC).



Şekil 4.10. Ursolik asit (P-2)'in 2D ^1H , ^{13}C -heteronükleer korelasyonlu (uzak mesafe) spektrumu (HMBC).

Kemferol-3-*O*-rutinozit (P-3)



Molekül Ağırlığı: 594.5 g/mol

^1H NMR	Tablo 4.3 Şekil 4.11
^{13}C NMR	Tablo 4.3 Şekil 4.13
COSY	Şekil 4.13
HMQC	Şekil 4.14
HMBC	Şekil 4.15

P-3 kodlu bileşik, sarı renkli amorf bir katı formda elde edilmiştir. İTK analizlerinde revelatörü püskürtmeden önce gün ışığında sarı, UV_{254} nm'de mor ve UV_{366} nm'de sarı renkli floresans gözlenmiş, ardından Vanilin/ H_2SO_4 püskürtülmesi ile birlikte plak 105°C de 1-2 dakika boyunca ısıtıldığında gün ışığında sarı-turuncu bir renk görülmesi ve UV_{366} nm'de görülen sarı floresansın şiddetlenmesi bu bileşiğin bir flavonoid olabileceğini düşündürmüştür.

P-3 kodlu bileşiğin ^1H NMR spektrumu (Şekil 4.11) incelendiğinde, flavonoidin 5,7-disüstitüe A halkasındaki meta kenetlenmeyi işaret eden, δ_{H} 6,37 (d, $J=2,1$ Hz, H-8) ve 6,15 (d, $J=2,1$ Hz, H-6) sinyalleri gözlenmiştir. Bu sinyallere ilave olarak, δ_{H} 7,97 (2H, d, $J=8,8$ Hz, H-2'/ H-6') ve 6,88 (2H, d, $J=8,8\text{Hz}$ H-3'/H-5') ppm'

de AB sistem şeklinde tespit edilen ikişer proton değerindeki aromatik proton sinyalleri 4'-süstitüe B halkası için karakteristiktir (Şekil 4.11, Tablo 4.3). Bu protonlardan başka aromatik proton sinyali görülmemesi C halkasının dolu ve yapının bir flavonol olduğunu göstermiştir. **P-3**'ün ^{13}C NMR spektrumu incelendiğinde (Şekil 4.12), gözlenen toplam 27 karbon sinyalinden, aglikona ait 15 karbon çıkarıldığında kalan 12 sinyal yapıda 2 oz olabileceğini göstermiş ve HMQC spektrumu yardımıyla tüm karbonlara ait protonlar belirlenmiştir (Şekil 4.14). ^1H -NMR spektrumunda, δ_{H} 5.28 (d, $J=7.5\text{Hz}$, H-1'') ve δ_{H} 4.58 (d, $J=1.4\text{ Hz}$, H-1''')'de görülen 2 anomerik proton sinyali, bileşiğin diglikozidik yapıda olduğunu doğrulamış ve HMQC spektrumunda, bu protonlara karşılık gelen karbon rezonansları da sırasıyla δ_{C} 101,3 ve δ_{C} 100,5'de gözlenmiştir (Şekil 4.15, Tablo 4.3). COSY spektrumu yardımıyla anomerik protonlardan hareketle diğer oz sinyallerinin yeri tespit edilmiştir (Şekil 4.13). HMQC spektrumunda bu protonlara karşılık gelen karbon rezonansları da saptandığında, yapıdaki ozların glukoz ve ramnoz olduğu anlaşılmıştır. ^1H NMR spektrumunda, ramnozun metil grubuna ait sinyal δ_{H} 0,99 (d, $J=6.2\text{ Hz}$, H-6'')'da gözlenmiştir. Ayrıca, glukozun anomerik proton sinyalinin kenetlenme sabitinin ($J=7.5\text{ Hz}$) ve ramnozun anomerik proton sinyalinin kenetlenme sabitinin ise ($J=1,4\text{ Hz}$) olması glukozun β , ramnozun ise α konfigürasyona sahip olduğunu göstermiştir.

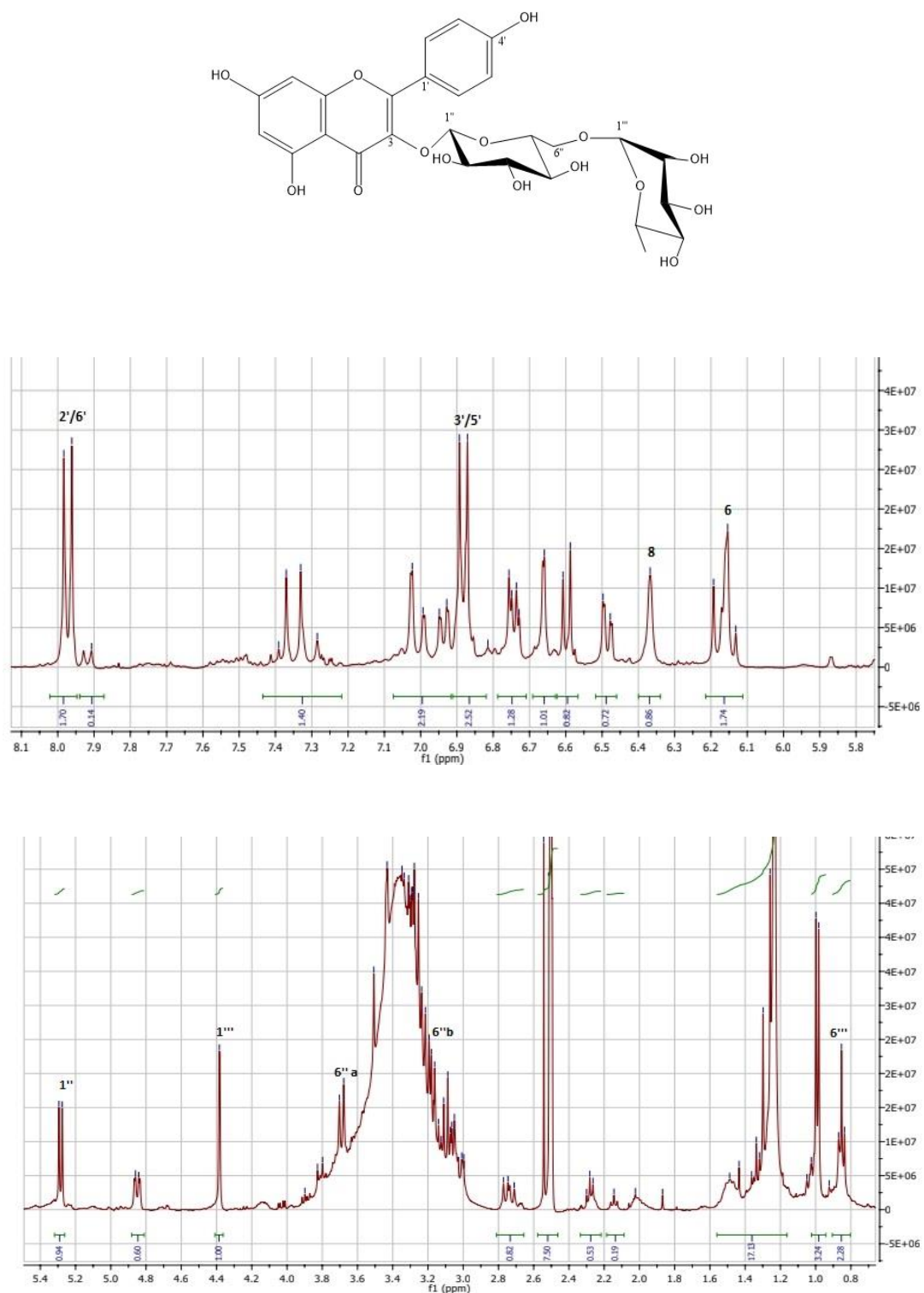
HMBC spektrumundaki uzak mesafe etkileşimleri incelendiğinde (Şekil 4.15, Tablo 4.3), glukozu ait anomerik proton sinyali (δ_{H} 5.28) ile aglikona ait C-3 (δ_{C} 132,5) arasında görülen etkileşim, oz zincirinin aglikona C-3 OH'dan süstitüe olduğunu göstermektedir. Ramnozun anomerik protonuna ait sinyalle (δ_{H} 4.58) glukozu ait C-6'' (δ_{C} 66.4) sinyali arasındaki etkileşim ve glukozun C-6'' sinyalinin bu konumda süstitüsyon bulundurmayan glukozu göre (**P-4**) yaklaşık 4 ppm düşük alana kayması ise ramnozun glukozu C-6''dan bağılı olduğunu açıklamıştır.

1D ve 2D NMR spektrumlarından elde edilen veriler, literatürdeki verilerle karşılaştırıldığında **P-3** kodlu bileşiğin yapısı **Kemferol 3-O-rutinozit (Kemferol 3-O- α -ramnopiranozil-(1 \rightarrow 6)- β -glukopiranozit)** olarak aydınlatılmıştır (94). Bu bileşik daha önce *P. vulgaris* var. *lilacina* türünden izole edilmiştir (32).

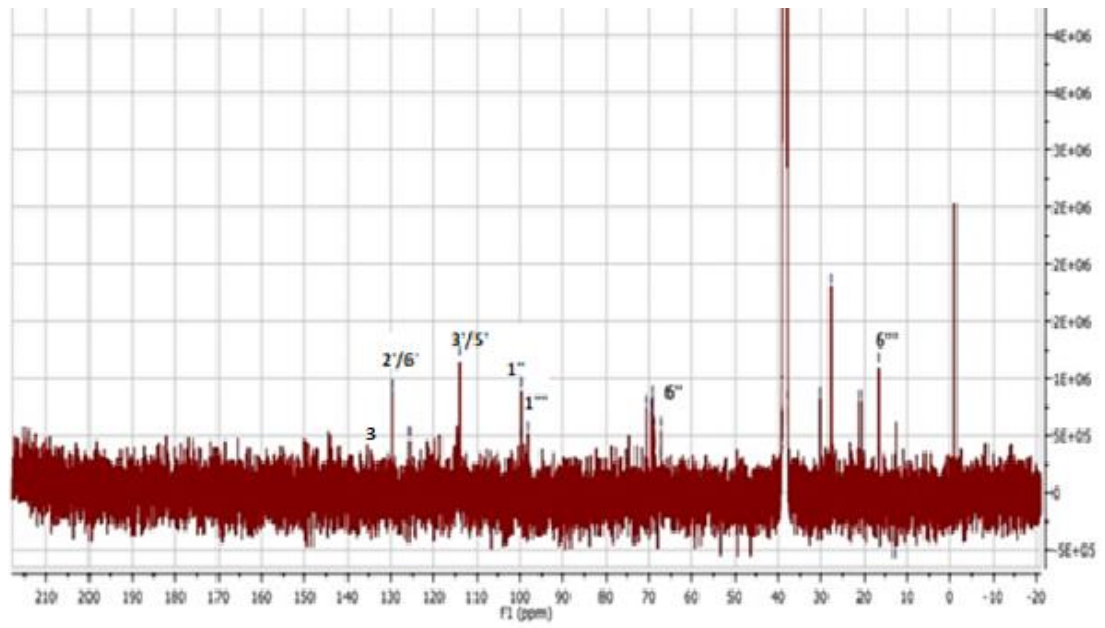
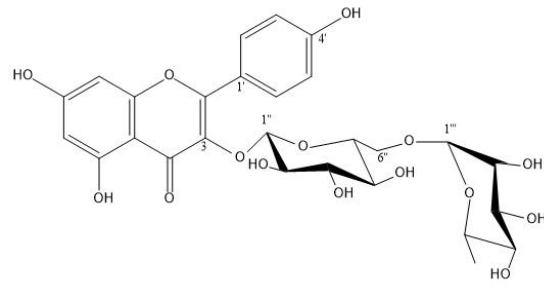
Tablo 4.3. Kemferol 3-*O*-rutinozit (**P-3**)'in ^{13}C NMR ve ^1H NMR spektroskopik değerleri (DMSO- d_6 ; ^1H : 400 MHz, ^{13}C :100 MHz); önemli HMBC korelasyonları.

C/H	DEPT	δ_c (ppm)	δ_H (ppm)	<i>J</i> Hz	HMBC (H→C)
2	C	151,6			
3	C	132,5			
4	C	177,0			
5	C	161,0			
6	CH	98,9	6,15 d	2.1	C-5, C-8, C-10, C-7
7	C	165,9			
8	CH	93,8	6,37 d	2.1	C-2, C-6, C-10, C-7, C-9
9	C	155,7			
10	C	103,2			
1'	C	126,8			
2'	CH	130,5	7,97 d	8.8	C-2, C-4'
3'	CH	116,1	6,88 d	8.8	
4'	C	158,6			
5'	CH	116,1	6,88 d	8.8	C-1', C-3', C-4'
6'	CH	130,5	7,97 d	8.8	C-4'
Glukoz					
1''	CH	101,3	5,28 d	7.5	C-3
2''	CH	74,2	3,00-3,70*		
3''	CH	76,4	3,00-3,70*		
4''	CH	69,3	3,00-3,70*		
5''	CH	76,5	3,00-3,70*		
6''a	CH ₂	66,4	3,68 dd	1.2/11.9	C-4''
6''b			3,25 dd	6.0/11.9	C-4''
Ramnoz					
1'''	CH	100,5	4,38 d	1.4	C-6''
2'''	CH	70,0	3,43 dd	3.2/1.8	
3'''	CH	70,4	3,28 dd	9.8/3.7	
4'''	CH	69,6	3,05*		
5'''	CH	68,2	3,27 m		
6'''	CH ₃	17,3	0,99 d	6,1	C-4''', C-5'''

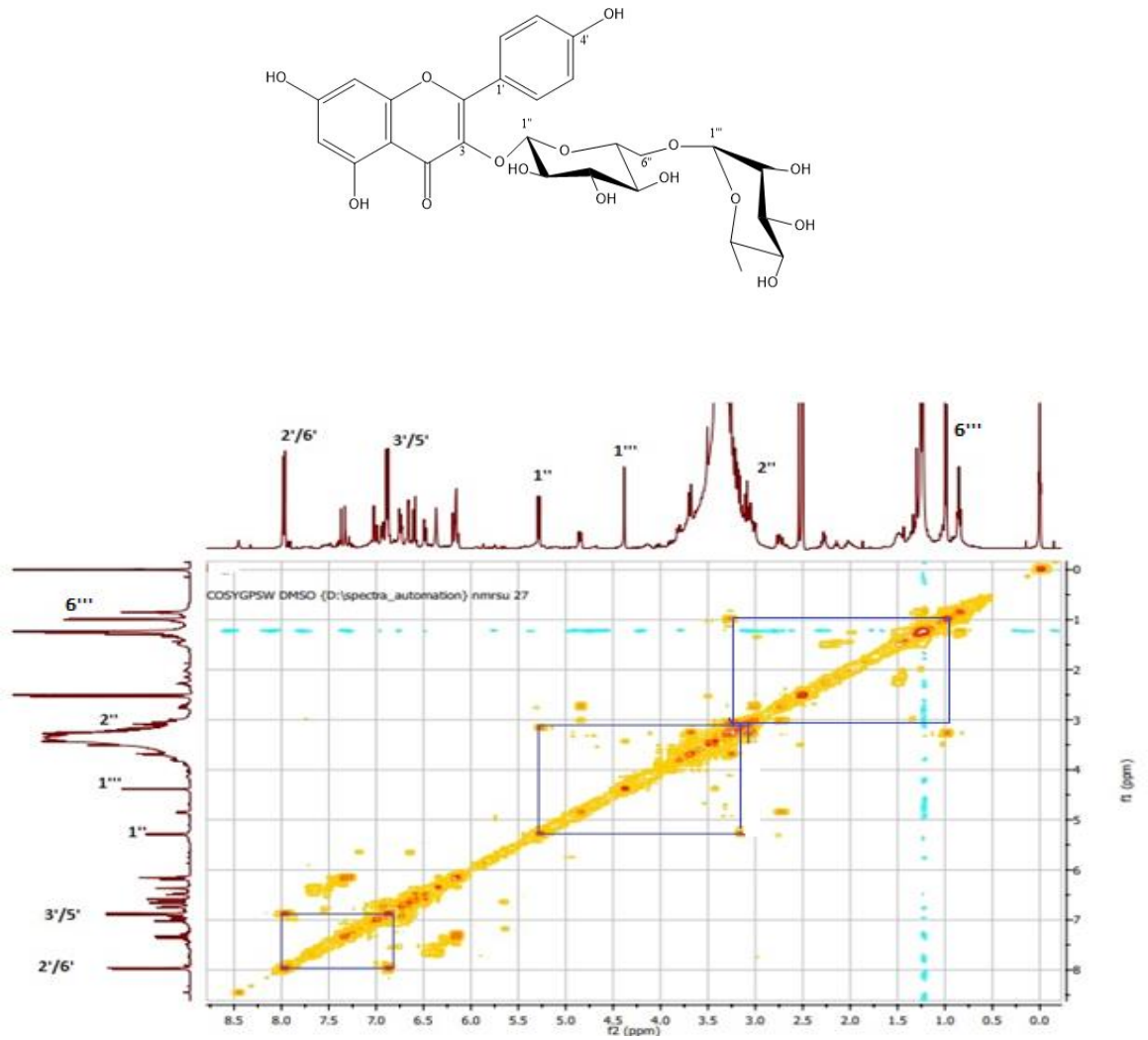
*Girişim sebebiyle sinyaller aydınlatılamamıştır.



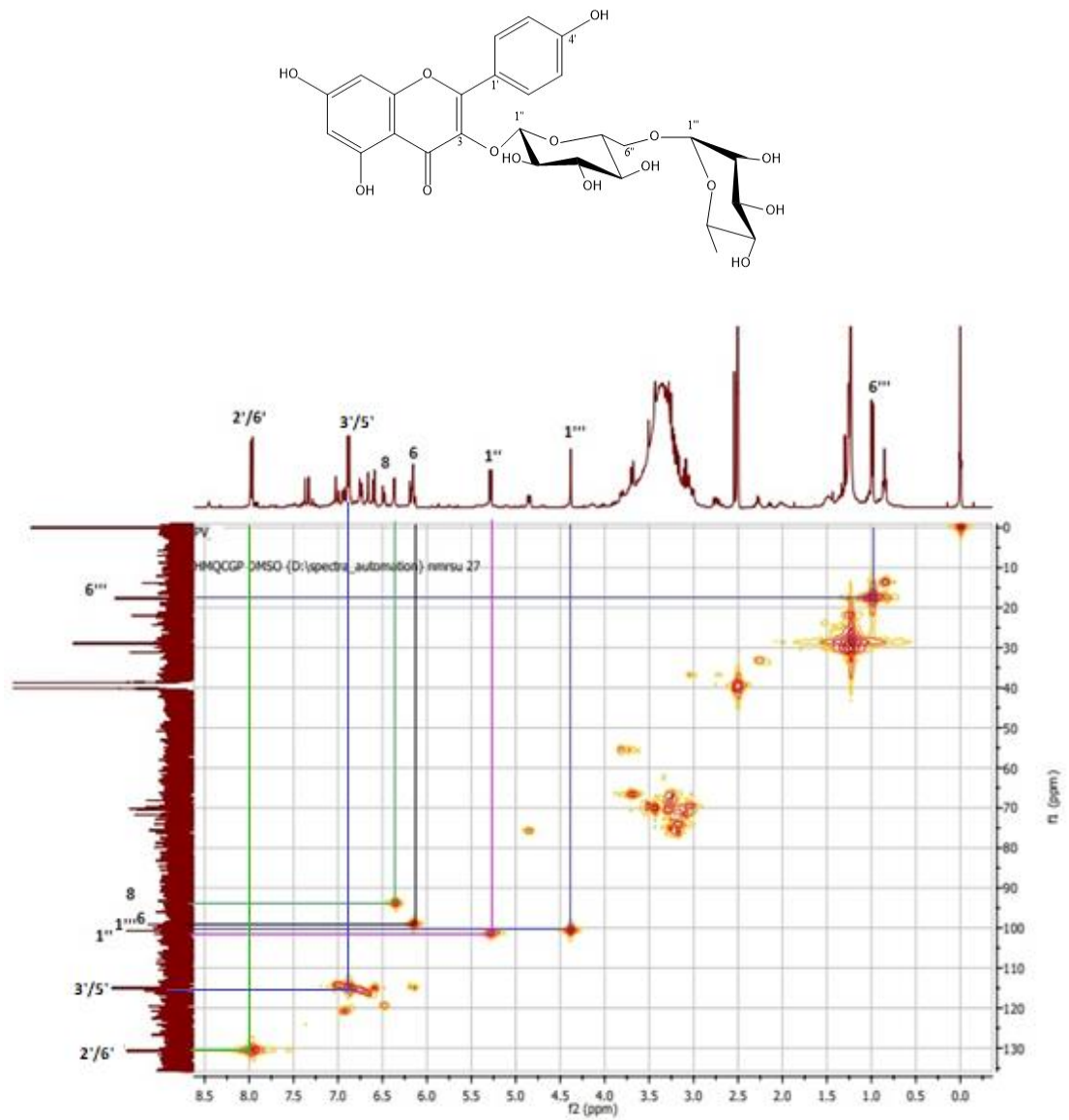
Şekil 4.11. Kemferol 3-*O*-rutinozid (**P-3**)'in ¹H NMR spektrumu (DMSO-d₆, 400 MHz).



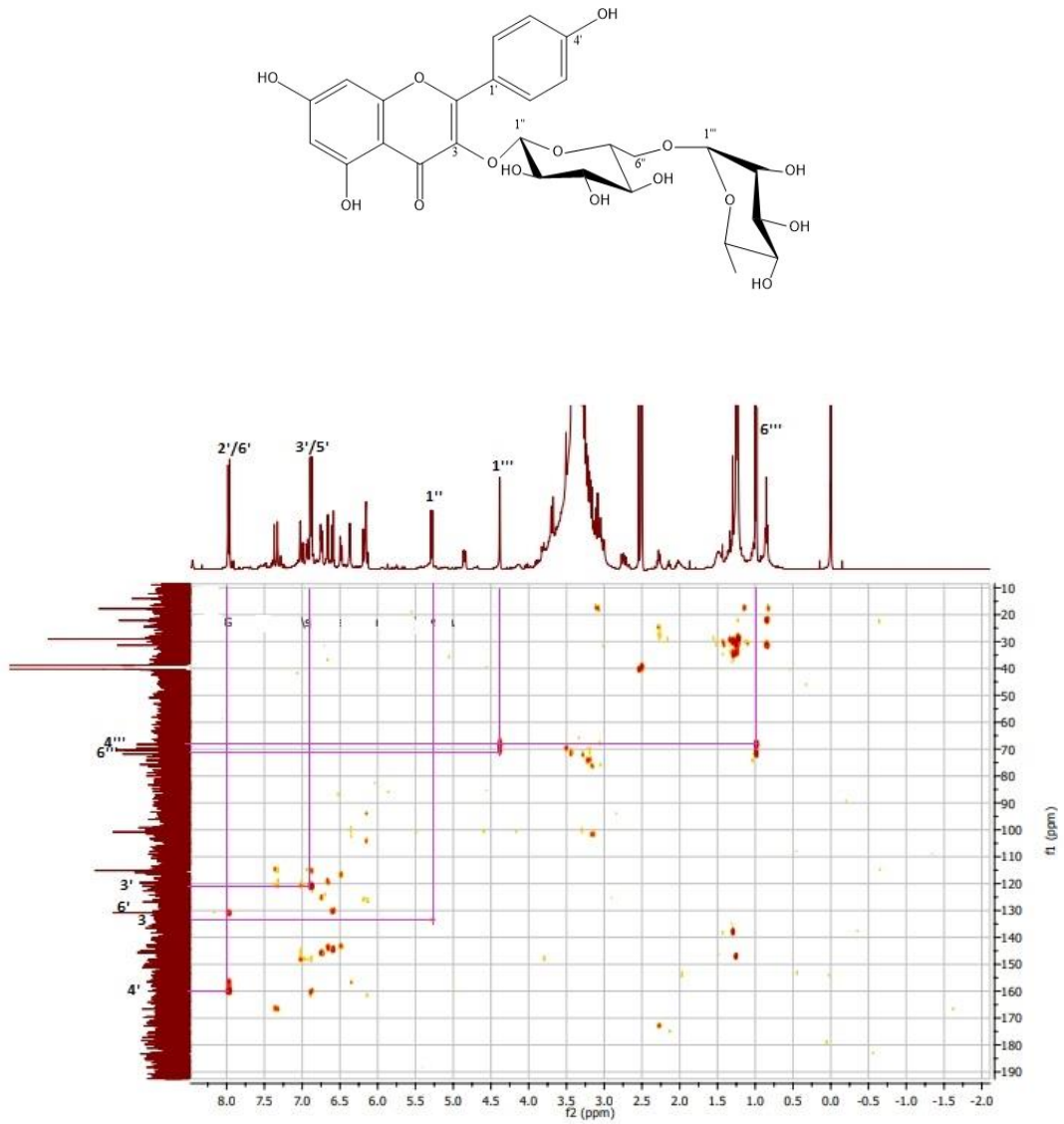
Şekil 4.12. Kemferol 3-*O*-rutinozit (**P-3**)'in ^{13}C NMR spektrumu (DMSO- d_6 , 100 MHz).



Şekil 4.13. Kemferol 3-*O*-rutinozid (**P-3**)'in 2D ^1H , ^1H -homonükleer korelasyonlu spektrumu (COSY).

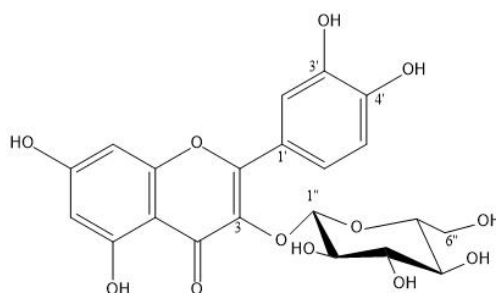


Şekil 4.14. Kemferol 3-*O*-rutinozit (**P-3**)'in 2D ^1H , ^{13}C -heteronükleer korelasyonlu (yakın mesafe) NMR spektrumu (HSQC).



Şekil 4.15. Kemferol 3-*O*-rutinozit (P-3)'in 2D ^1H , ^{13}C -heteronükleer korelasyonlu (uzak mesafe) NMR spektrumu (HMBC).

Kersetin 3-O-glukozit (P-4)



Molekül Ağırlığı: 464.38 g/mol

1H NMR	Tablo 4.4 Şekil 4.16
^{13}C NMR	Tablo 4.4 Şekil 4.17
COSY	Şekil 4.18
HSQC	Şekil 4.19
HMBC	Şekil 4.20

P-4 kodlu bileşik, sarı renkli amorf bir katı formda elde edilmiştir. İTK analizlerinde revelatörü püskürtmeden önce gün ışığında sarı, UV_{254} nm'de mor ve UV_{366} nm'de sarı renkli floresans gözlenmiş, ardından Vanilin/ H_2SO_4 püskürtülmesi ile birlikte plak $105^\circ C$ de 1-2 dakika boyunca ısıtıldığında gün ışığında sarı-turuncu bir renk görülmesi ve UV_{366} nm'de görülen sarı floresansın şiddetlenmesi bu bileşiğin bir flavonoid olabileceğini düşündürmüştür.

Bileşiğin 1H NMR spektrumunun aromatik bölgesi incelendiğinde (Şekil 4.16, Tablo 4.4), meta kenetlenmeyi işaret eden, δ_H 6,35 (d, $J=2.0$ Hz, H-8) ve 6,17 (d, $J=2.0$ Hz, H-6) sinyalleri gözlenmiş olup, bu sinyaller 5,7- disüstitüe A halkası varlığını açıkça göstermiştir. Bu sinyallere ilave olarak, δ_H 7,71 (d, $J=2.1$, H-2'), 7,58 (dd, $J=2.0/8.5$, H-6') ve 6,86 (d, $J=8.5$, H-5')' de ABX sistem şeklinde görülen 3 aromatik proton sinyali 3',4' disüstitüe B halkası için karakteristiktir.

Bileşiğin 1H NMR spektrumunda başka aromatik proton sinyali gözlenmemesi C halkasının dolu ve yapının bir flavonol olduğunu göstermiştir. P-4'ün ^{13}C NMR

spektrumu incelendiğinde (Şekil 4.17), gözlenen toplam 21 karbon sinyalinden, aglikona ait 15 karbon çıkarıldığında kalan 6 sinyal yapıda 1 heksoz olabileceğini göstermiştir. HSQC spektrumu yardımıyla tüm karbonlara ait protonlar belirlenmiştir (Şekil 4.19).

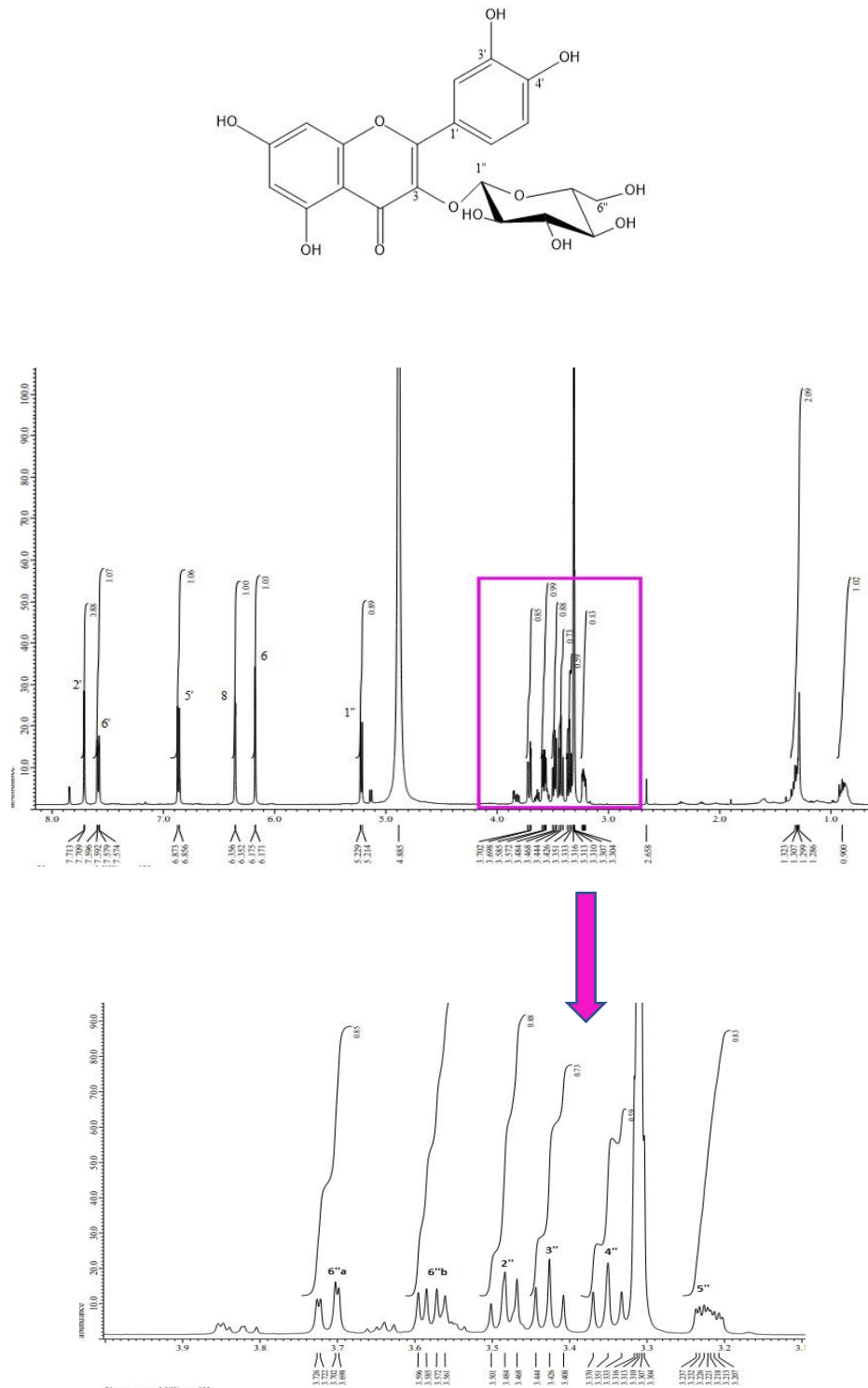
^1H NMR spektrumunda, δ_{H} 5,22 (d, $J=7.5$ Hz, H-1'')'de gözlenen, oza ait anomerik proton ve ^{13}C NMR spektrumunda δ_{C} 104,4 anomerik karbon sinyali, bileşiğin monoglikozidik yapıda olduğunu doğrulamıştır. Anomerik proton sinyalinin kenetlenme sabitinin $J=7.5$ Hz olması, uzun β konfigürasyonda olduğunu göstermiştir. COSY spektrumu (Şekil 4.18) yardımıyla anomerik protondan hareketle diğer oz sinyalleri kesin olarak tespit edilmiş ve HSQC spektrumunda bu protonlara karşılık gelen karbon rezonansları da saptandığında, yapıdaki uzun β -glukoz olduğu anlaşılmıştır (Tablo 4.4).

HMBC spektrumundaki uzak mesafeli etkileşimler (Şekil 4.20) değerlendirildiğinde, glukozun anomerik proton sinyali (δ_{H} 5,22) ile aglikona ait C-3 (δ_{C} 135,5) arasındaki etkileşim, glukozun aglikona C-3 OH 'den bağlı olduğu bilgisini vermiştir.

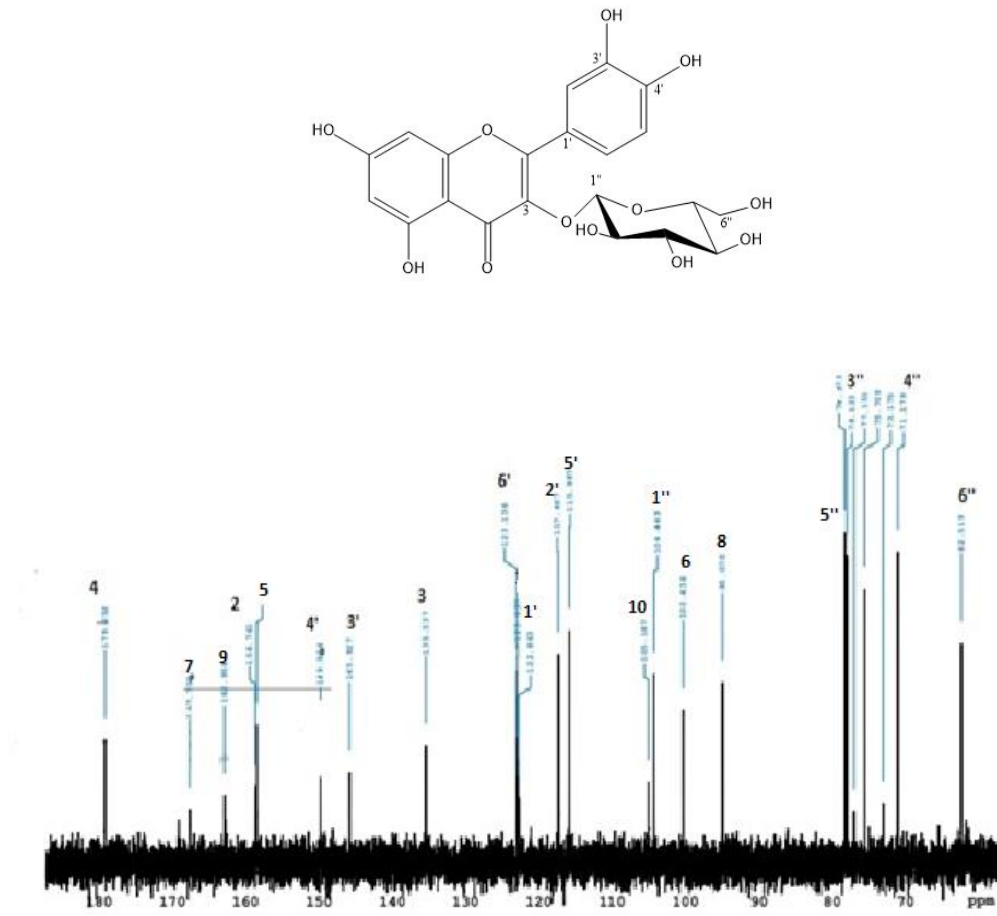
Bileşiğin 1D ve 2D NMR spektrumlarından elde edilen spektral değerler, literatürdeki NMR bulguları ile karşılaştırıldığında **P-4** bileşiğinin yapısı, **Kersetin 3-O-glukozit** olarak aydınlatılmıştır (95). Kersetin-3-O-glukozit daha önce *Prunella vulgaris*, *P. vulgaris* var. *lilacina* *P. grandiflora*, *P. laciniata* ve *P. hyssopifolia* türlerinden izole edilmiştir (1, 10, 32)

Tablo 4.4. Kersetin 3-*O*-glukozit (**P-4**)'in ^{13}C NMR ve ^1H NMR spektroskopik değerleri (CD_3OD ; ^1H : 500 MHz, ^{13}C :125 MHz) önemli HMBC korelasyonları.

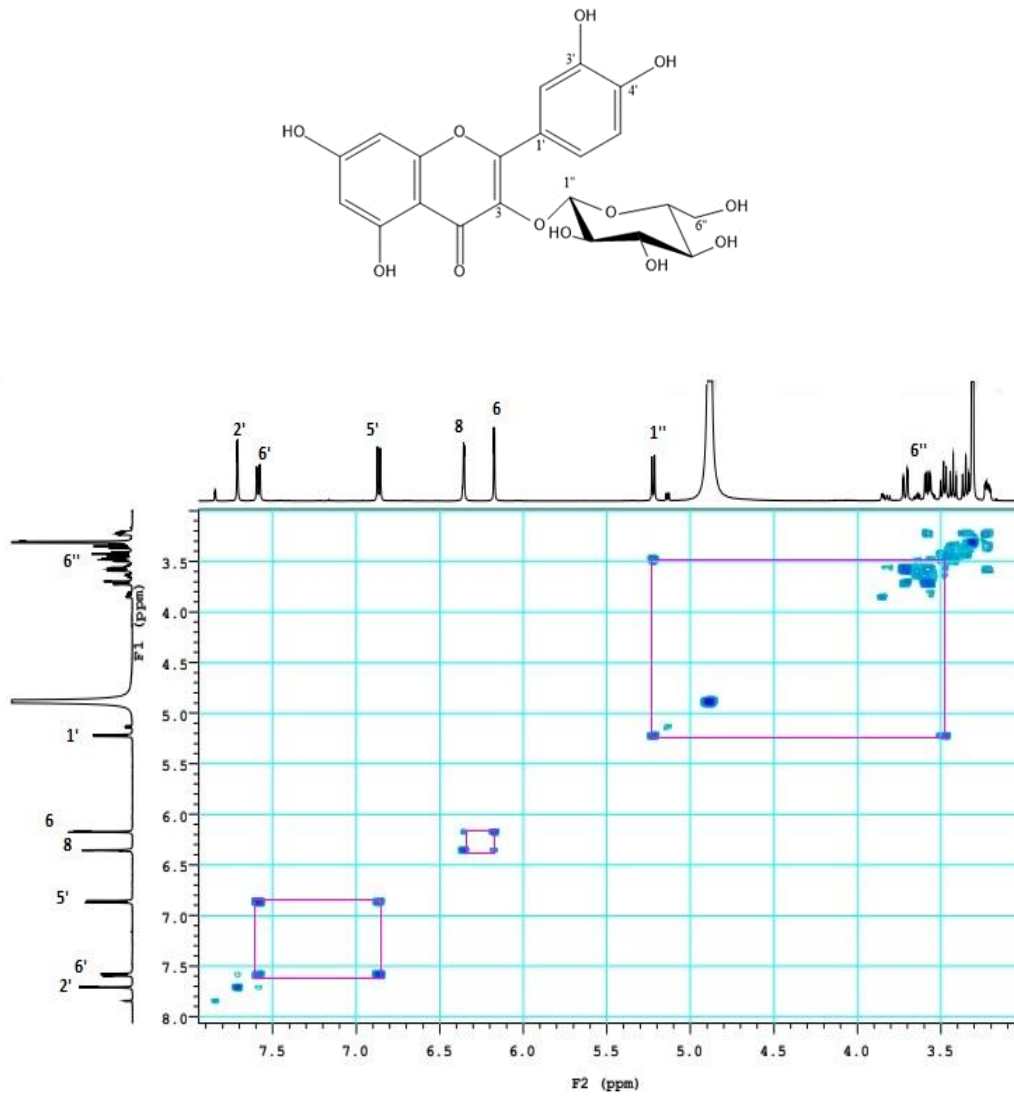
C/H	DEPT	$\delta_c(\text{ppm})$	$\delta_H(\text{ppm})$	$J\text{ Hz}$	HMBC (H→C)
2	C	158,7			
3	C	135,5			
4	C	179,2			
5	C	162,9			
6	CH	100,4	6,17 d	2	C-5, C-8, C-10, C-7
7	C	167,7			
8	CH	95,0	6,35 d	2	C-2, C-6, C-10, C-7, C-9
9	C	158,5			
10	C	105,1			
1'	C	122,8			
2'	CH	117,4	7,71 d	2.1	C-2
3'	C	145,9			
4'	C	149,9			
5'	CH	115,9	6,86 d	8.5	C-1', C-3', C-4'
6'	CH	123,1	7,58 dd	2.0/8.5	
Glukoz					
1''	CH	104,4	5,22 d	7.5	C-3
2''	CH	75,0	3,46 t	8.0	
3''	CH	78,1	3,42 t	9.0	
4''	CH	71,1	3,35 t	9.0	
5''	CH	78,3	3,22 m		
6''a	CH ₂	62,5	3,58 dd	6.0/11.2	C-4''
6''b			3,74 dd	2.0/11.2	C-4''



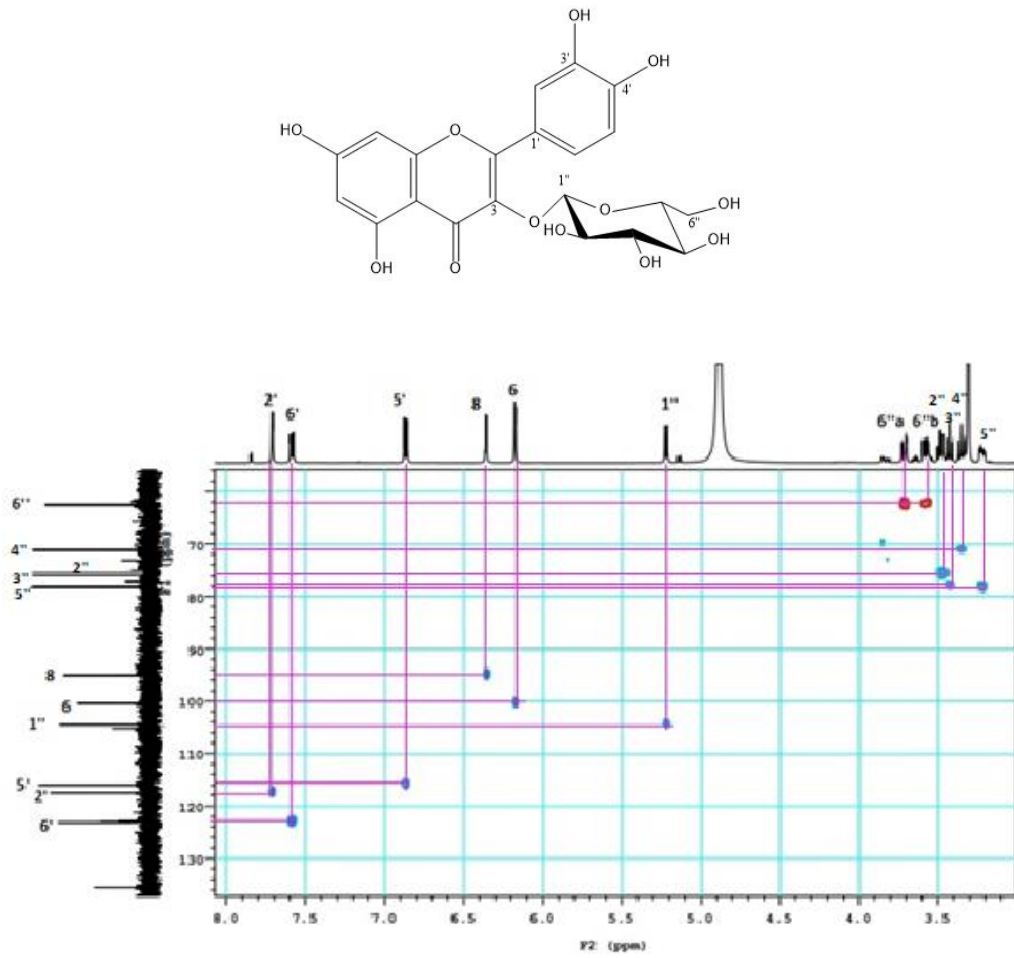
Şekil 4.16. Kersetin 3-O-glukozit (P-4)'in ¹H NMR spektrumu (CD₃OD, 500 MHz).



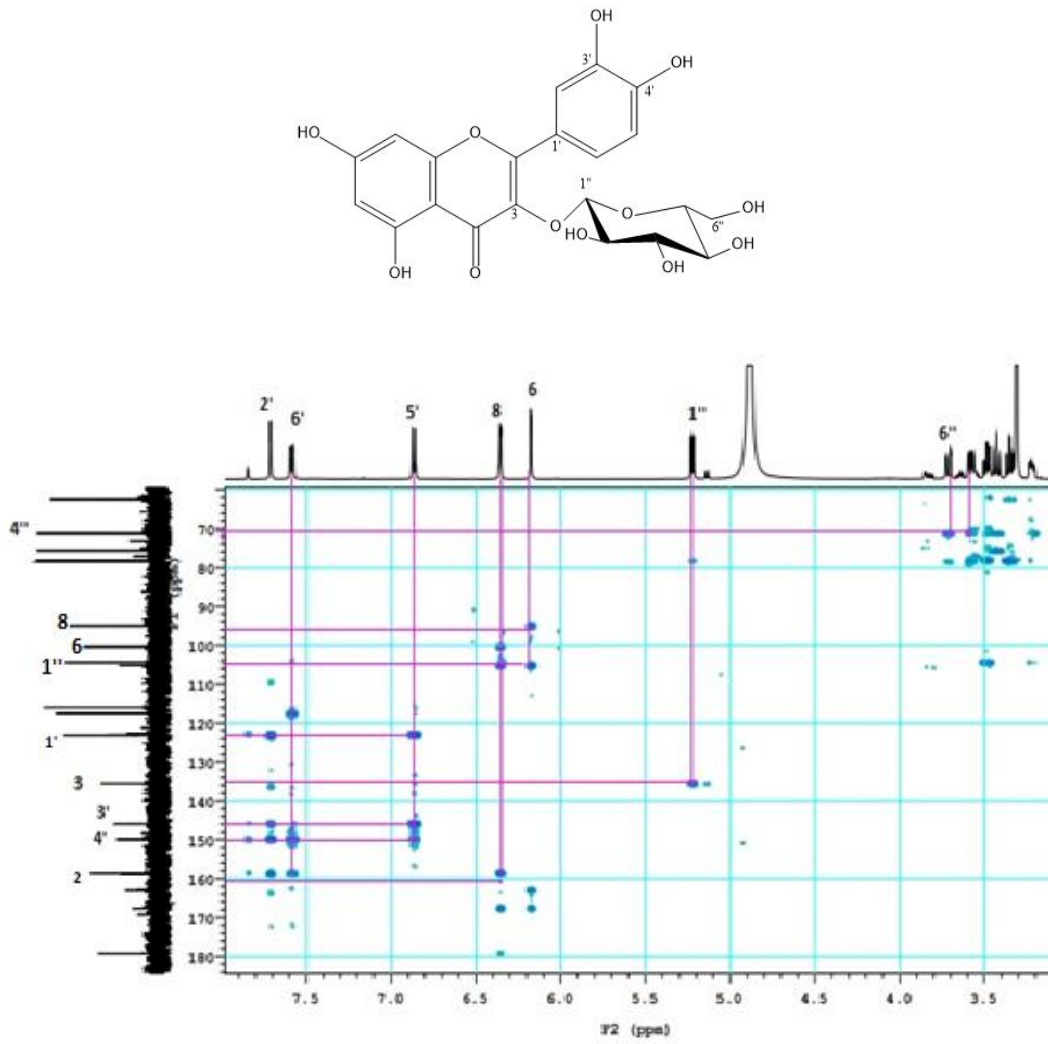
Şekil 4.17. Kersetin 3-O-glukozit (P-4)' in ^{13}C NMR spektrumu (CD₃OD, 125 MHz)



Şekil 4.18. Kersetin 3-*O*-glukozit (P-4)'in 2D ¹H, ¹H-homonükleer korelasyonlu spektrumu (COSY).

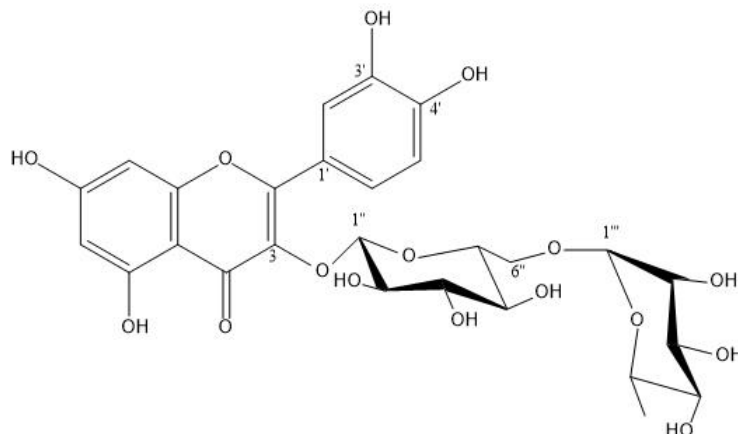


Şekil 4.19. Kersetin 3-*O*-glukozit (P-4)'in 2D ^1H , ^{13}C -heteronükleer korelasyonlu (yakın mesafe) NMR spektrumu (HSQC).



Şekil 4.20. Kersetin 3-O-glukozit (P-4)'in 2D ^1H , ^{13}C -heteronükleer korelasyon (uzak mesafe) NMR spektrumu (HMBC).

Rutin (Kersetin 3-O-rutinozit) (P-5)



Molekül Ağırlığı: 610,5 g/mol

1H NMR	Tablo 4.5 Şekil 4.21
^{13}C NMR	Tablo 4.5 Şekil 4.22
COSY	Şekil 4.23
HMQC	Şekil 4.24
HMBC	Şekil 4.25

P-5 kodlu bileşik, sarı renkli amorf bir katı formda elde edilmiştir. İTK analizlerinde revelatörü püskürtmeden önce gün ışığında sarı, UV₂₅₄ nm'de mor ve UV₃₆₆ nm'de sarı renkli floresans gözlenmiş, ardından Vanilin/H₂SO₄ püskürtülmesi ile birlikte plak 105°C de 1-2 dakika boyunca ısıtıldığında gün ışığında sarı-turuncu bir renk görülmesi ve UV₃₆₆ nm'de görülen sarı floresansın şiddetlenmesi bu bileşiğin bir flavonoit olabileceğini düşündürmüştür.

P-5 bileşiğinin 1H NMR spektrumu incelendiğinde (Şekil 4.21, Tablo 4.5), spektrumun aromatik alanındaki sinyallerin P-4'ün 1H NMR spektrumuyla olduğu görülmüştür. A halkasındaki meta kenetlenmeyi işaret eden, δ_H 6,36 (d, $J=1.7$ Hz, H-8) ve 6,16 (d, $J=1.7$ Hz, H-6) sinyalleri ve ilave olarak, δ_H 7,53 (dd, $J=8.3/2.2$, Hz, H-6'), δ_H 7,56 (d, $J=2.2$ Hz, H-2') ve 6,83 (d, $J=8.3$ Hz, H-5') ppm' de ABX sistem

şeklinde gözlenen 3 aromatik proton sinyali 3',4' disüstitüe B halkası için karakteristiktir. Bu protonlardan başka aromatik proton sinyali görülmemesi C halkasının dolu ve yapının bir flavonol olduğunu göstermiştir. Spektrumun oz bölgesindeki sinyallerin ise P-3 bileşiği ile benzer olduğu anlaşılmıştır.

^{13}C NMR spektrumu incelendiğinde (Şekil 4.22), gözlenen toplam 27 karbon sinyalinden, aglikona ait 15 karbon çıkarıldığında kalan 12 sinyal, yapıda 2 oz olabileceğini göstermiş ve HMQC spektrumu yardımıyla tüm karbonlara ait protonlar (Şekil 4.24, Tablo 4.5).

^1H NMR spektrumunda, δ_{H} 5,32 (d, $J=7.7$ Hz, H-1'') ve 4,38 (d, $J=1.7$ Hz, H-1''')'de gözlenen 2 anomerik proton sinyali, bileşiğin diglikozidik yapılu olduğunu doğrulamış ve HMQC spektrumunda (Şekil 4.24), bu protonlara karşılık gelen karbon rezonansları da sırasıyla δ_{C} 101,2 ve δ_{C} 100,6'de gözlenmiştir (Tablo 4.5).

COSY spektrumu yardımıyla anomerik protonlardan hareketle diğer oz sinyallerinin yeri tespit edilmiştir (Şekil 4.23). HMQC spektrumunda bu protonlara karşılık gelen karbon rezonansları da saptandığında, yapıda glukoz ve ramnoz olduğu anlaşılmıştır. Ozların anomerik protonlarının kenetlenme sabitlerinden ($J=7.7$ Hz, H-1'' ve $J=1.7$ Hz, H-1''') α -glukoz ve α -ramnoz oldukları tespit edilmiştir. Ayrıca, ^1H NMR spektrumunda, ramnozun metil grubuna ait sinyal δ_{H} 1,00 (d, $J=6.2$ Hz, H-6''')'de gözlenmiş olup, bu bulgu yapıdaki ramnozu kesinleştirmiştir.

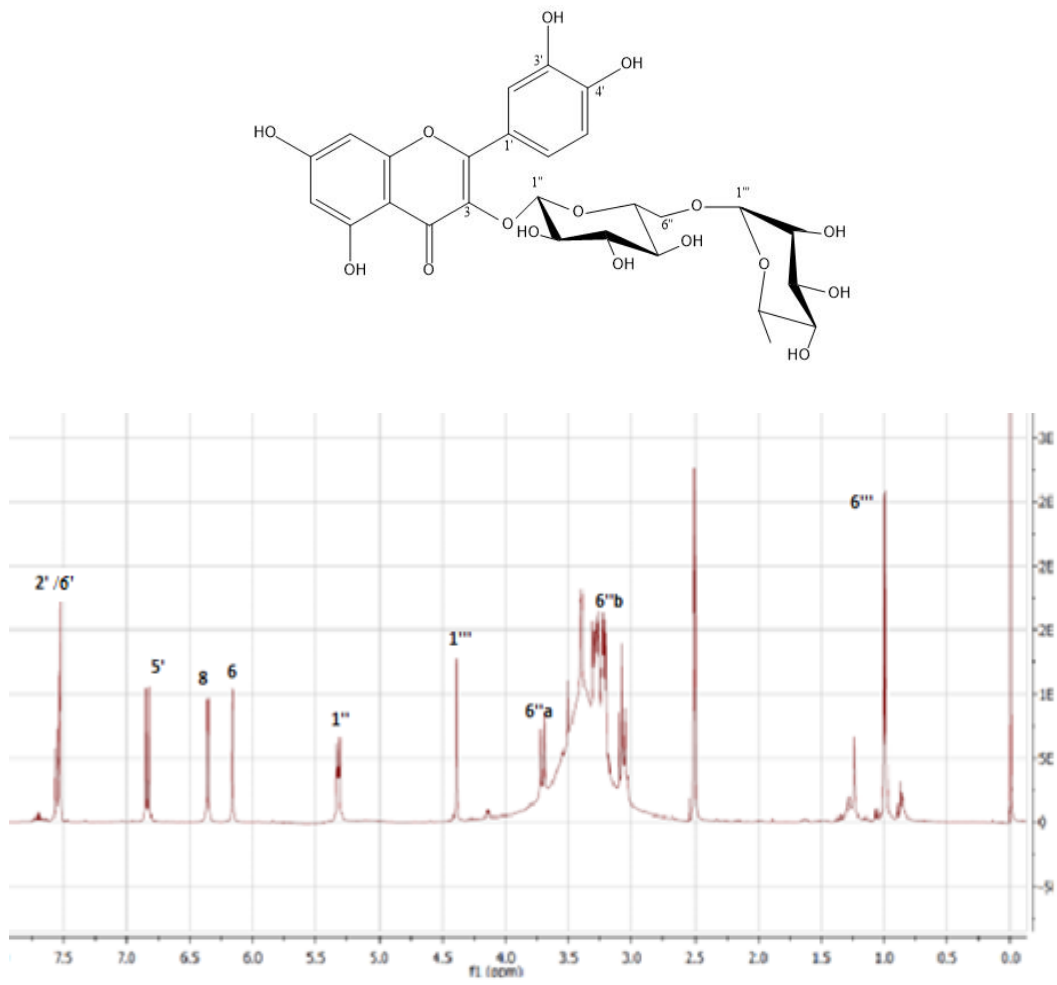
HMBC spektrumundaki (Şekil 4.25, Tablo 4.5) uzak mesafeli etkileşimler incelendiğinde, glukozu ait anomerik proton sinyali (δ_{H} 5.32) ile aglikona ait C-3 (δ_{C} 133,1) arasında görülen etkileşim, oz zincirinin aglikona C-3 OH'dan bağlı olduğunu göstermiştir. Ramnozun anomerik protonuna ait sinyalle (δ_{H} 4.38) glukozu ait C-6'' (δ_{C} 66,8) sinyali arasında bir etkileşim gözlenmesi ve glukozun C-6'' sinyalinin bu konumda süstitüsyon bulundurmayan glukozu göre (**P-4**) yaklaşık 4.3 ppm düşük alana kayması, ramnozun glukozu C-6''dan bağlı olduğunu açıklamıştır.

1D ve 2D NMR spektrumlarından elde edilen veriler, literatürdeki verilerle karşılaştırıldığında **P-5** kodlu bileşiğin yapısı, **Rutin (Kersetin 3-O-rutinozit = Kersetin 3-O- α -ramnopiranozil-(1 \rightarrow 6)- β -glukopiranozit)** olarak aydınlatılmıştır (94). Bu bileşik daha önce *Prunella vulgaris*, *P. vulgaris* var. *lilacina*, *P. grandiflora* ve *P. hyssopifolia*, *P. lacianata* ve *P. vulgaris* subsp. *asiatica* türlerinden izole edilmiştir (10, 25, 32, 39).

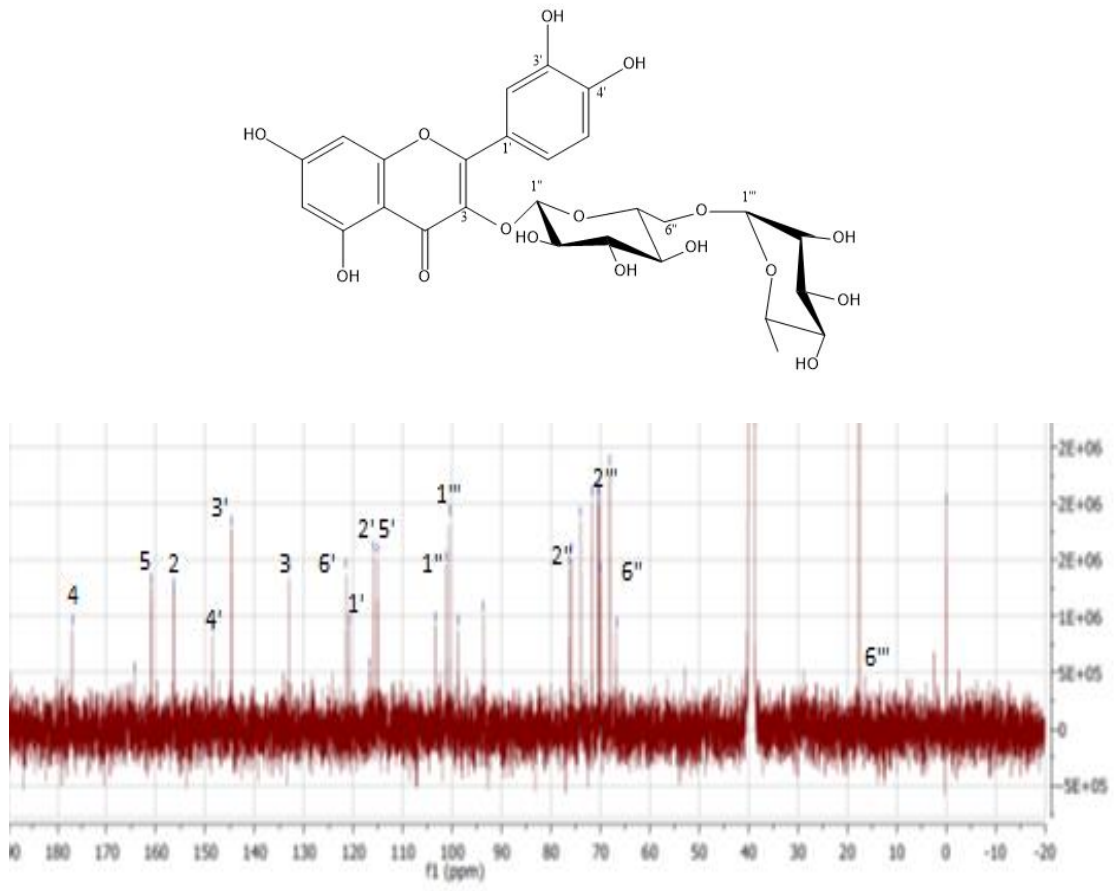
Tablo 4.5. Rutin (**P-5**)'in ^{13}C NMR ve ^1H NMR spektroskopik değerleri (DMSO- d_6 ; ^{13}C : 100 MHz; ^1H : 400 MHz); önemli HMBC korelasyonları.

C/H	DEPT	δ_{C} (ppm)	δ_{H} (ppm)	J Hz	HMBC (H→C)
2	C	156,3			
3	C	133,1			
4	C	177,0			
5	C	161,0			
6	CH	98,0	6,16 d	1.7	C-5, C-8, C-10, C-7
7	C	164,3			
8	CH	93,6	6,36 d	1.7	C-2, C-6, C-10, C-7, C-9
9	C	156,3			
10	C	103,4			
1'	C	120,8			
2'	CH	116,0	7,56 d	2.2	C-2
3'	C	144,0			
4'	C	148,5			
5'	CH	115,1	6,83 d	8.3	C-1', C-3', C-4'
6'	CH	121,4	7,53 dd	8.3/2.2	
Glukoz					
1''	CH	101,2	5,32 d	7.7	C-3
2''	CH	74,7	3-3,75*		
3''	CH	75,7	3-3,75*		
4''	CH	69,8	3-3,75*		
5''	CH	76,3	3-3,75*		
6''a	CH ₂	66,8	3,72 dd	2.2/12	C-4''
6''b			3,20*		C-4''
Ramnoz					
1'''	CH	100,6	4,38 d	1.7	C-6''
2'''	CH	70,2	3-3,75*		
3'''	CH	70,4	3-3,75*		
4'''	CH	73,9	3-3,75*		
5'''	CH	68,1	3,28*		
6'''	CH ₃	17,6	1,00 d	6.2	C-4''',C-5'''

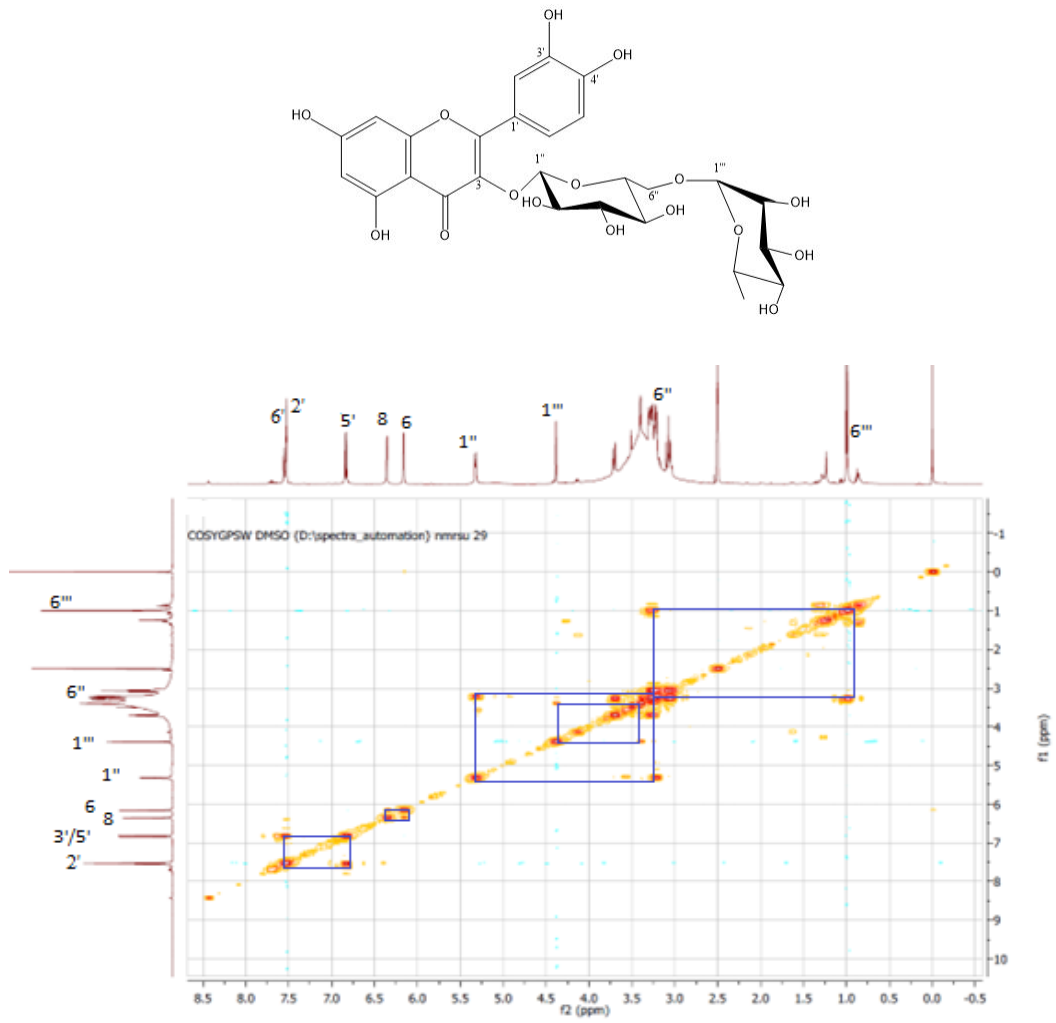
*Girişim sebebiyle sinyaller aydınlatılamamıştır.



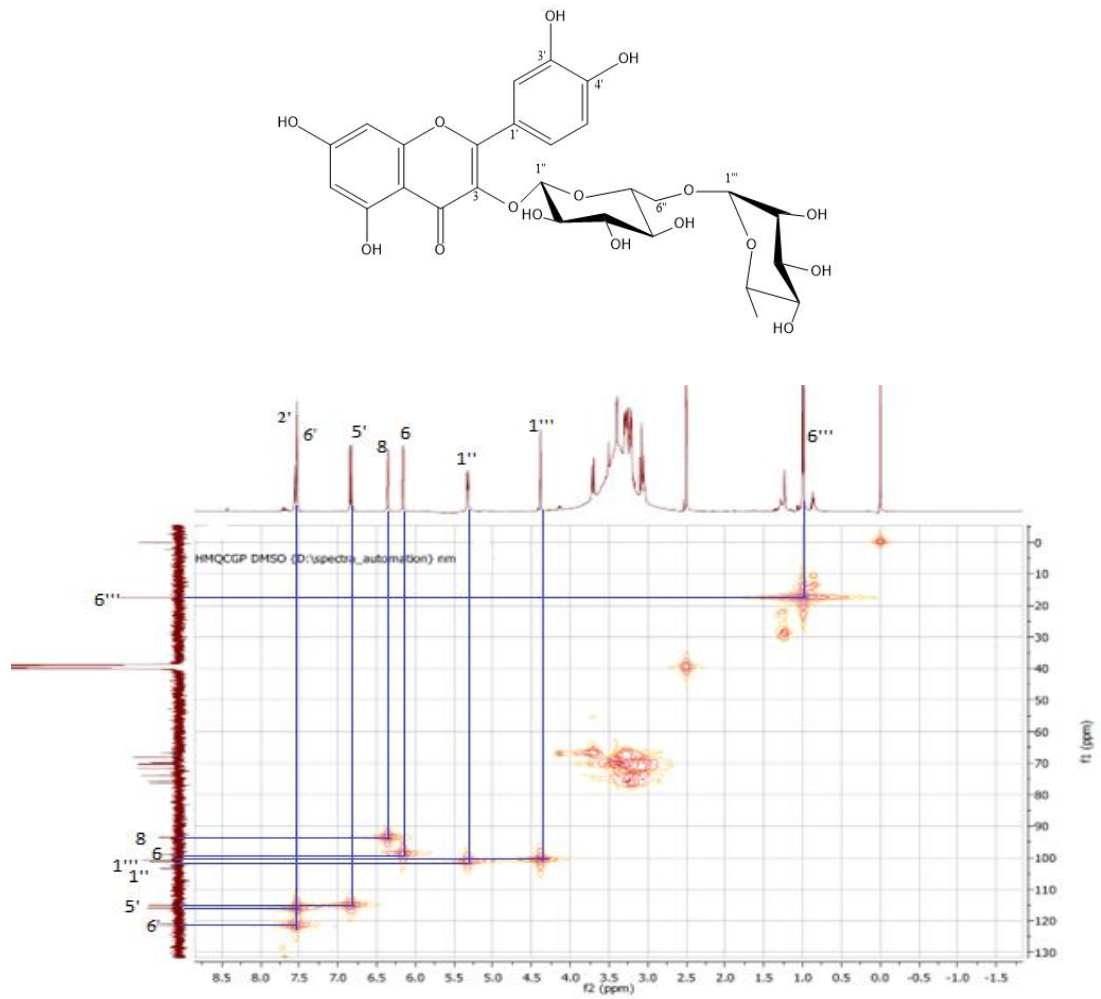
Şekil 4.21. Rutin (P-5)'in ^1H NMR spektrumu (DMSO- d_6 , 400 MHz).



Şekil 4.22. Rutin (P-5)'in ^{13}C NMR spektrumu (DMSO- d_6 , 100 MHz).



Şekil 4.23. Rutin (P-5)'in 2D ^1H , ^1H -homonükleer korelasyonlu spektrumu (COSY).



Şekil 4.24. Rutin (P-5)'in 2D ^1H , ^{13}C -heteronükleer korelasyonlu (yakın mesafe) NMR spektrumu (HMQC).

Çalışmalarımız sırasında, etkisi araştırılacak olan her örnek ve/veya konsantrasyon için en az 3, en fazla 6 farklı kuyucuk kullanılarak, deney şartlarından kaynaklanan hatalar en aza indirilmeye çalışılmıştır. Ayrıca tüm deneyler farklı zamanlarda tekrar edilerek, en az üç tekrarlı olarak yapılmış, sonuçlar \pm standart sapmalar hesaplanarak verilmiştir. Sonuçların istatistiksel analizi tek yönlü ANOVA post hoc Tukey ile yapılmış ve $p < 0,05$ anlamlı kabul edilmiştir.

Bu kısımda bulgularımız; çalışılan biyolojik etkiler esas alınarak aşağıdaki ana başlıklar altında, tablo ve grafikler ile desteklenerek sunulmuştur.

4.2.1. Asetilkolinesteraz (AChE) ve Bütirilkolinesteraz (BChE) İnhibisyon Çalışmasına Ait Bulgular

4.2.2. SH-SY5Y Hücrelerinde Nöroprotektif Etkinin Belirlenmesine Ait Bulgular

4.2.1. Asetilkolinesteraz (AChE) ve Bütirilkolinesteraz (BChE) İnhibisyon Çalışmasına Ait Bulgular

Asetilkolinesteraz ve bütirilkolinesteraz inhibisyonlarının ölçümünde Elmann'ın kolorimetrik yöntemi ufak modifikasyonlarla kullanılmıştır (96). Ekstre için 1000, 400, 200 ve 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ konsantrasyonları uygulanmış; rozmarinik asit (**P-1**), ursolik asit (**P-2**) ve rutin (**P-5**) için ise 100, 50, 20 ve 5 μM konsantrasyonları kullanılmıştır. Deneyde pozitif kontrol olarak takrin kullanılmış ve 0,5- 12,5 μM konsantrasyon aralığında uygulanmıştır. AChE ve BChE inhibisyon sonuçları Tablo 4.6 ve Tablo 4.7 'de sunulmuştur.

Ekstre ve saf bileşiklerin AChE ve BChE enzim inhibisyon değerlerinin konsantrasyona bağlı olarak arttığı gözlenmiştir. Ekstrenin AChE ve BChE enzimini benzer şekilde inhibe ettiği (sırasıyla %32,80 ve %44,87) gözlenmiş ancak, BChE inhibitör etkisinin daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. Rozmarinik asit (**P-1**), ursolik asit (**P-2**) ve rutin (**P-5**) için yapılan testlerin sonuçları incelendiğinde, bu bileşiklerin BChE enzimini daha etkili bir şekilde inhibe ettiği gözlenmiştir (Tablo 4.6 ve Tablo 4.7).

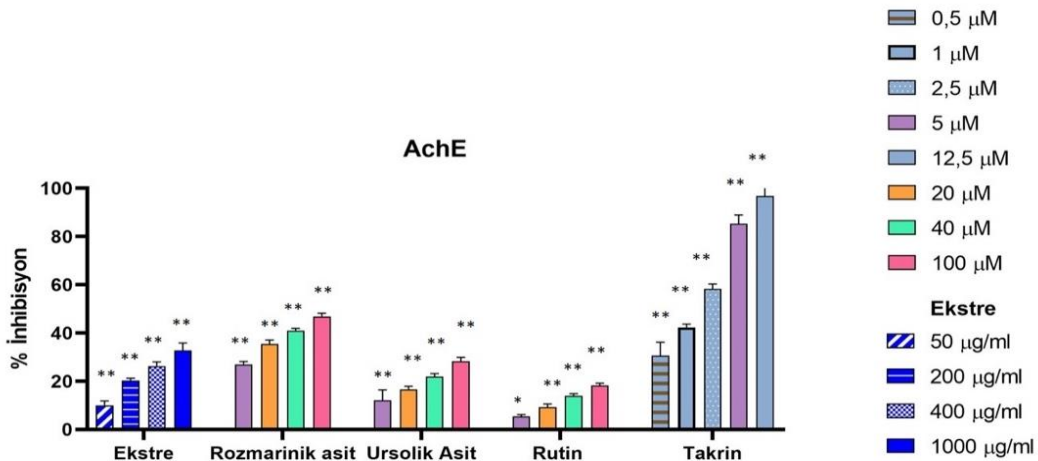
AChE enzimi üzerine 100 μM konsantrasyonda en yüksek inhibitör etkiyi (% 46,86) gösteren bileşik rozmarinik asit (**P-1**) iken en düşük etkiyi ise (% 18,28) rutinin

(P-5) gösterdiği belirlenmiştir. Ekstre ve bileşiklerin inhibitör etki düzeyleri referans olarak kullanılan takrinin etki düzeyine ulaşamamıştır (Tablo 4.6, Şekil 4.26).

Rozmarinik asitin (P-1) 100 μM konsantrasyonda BChE enzimini % 84,28 oranında inhibe ettiği ve bu inhibisyonun referans olarak kullanılan takrin ile karşılaştırılabilir düzeyde olduğu anlaşılmıştır. İkinci yüksek inhibitör etkiyi ise % 63,8 inhibisyon ile ursolik asit (P-2) göstermiştir (Tablo 4.7, Şekil 4.27).

Tablo 4.6. Ekstre ve saf bileşiklerin AChE enzim inhibisyonu.

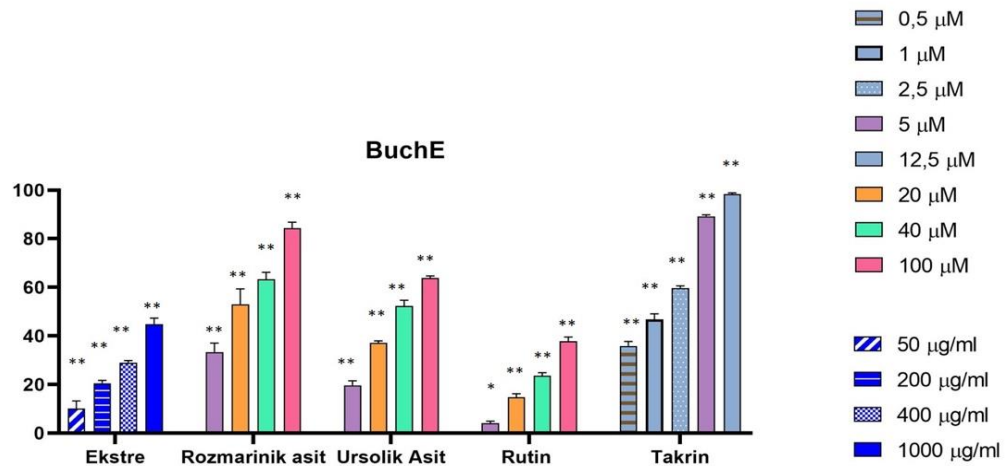
Örnek	Konsantrasyonlar (Ekstre $\mu\text{g/ml}$; Saf Bileşikler μM)/ %İnhibisyon Değerleri				
	1000	400	200	50	
Ekstre	32,80 \pm 3,04	26,34 \pm 1,70	20,27 \pm 1,00	10,06 \pm 1,82	
Saf Bileşikler	100	40	20	5	
Rozmarinik asit	46,86 \pm 1,32	41,04 \pm 0,87	35,44 \pm 1,65	27,06 \pm 1,17	
Ursolik asit	28,32 \pm 1,62	21,95 \pm 1,22	16,61 \pm 1,31	12,15 \pm 4,34	
Rutin	18,28 \pm 0,90	13,97 \pm 0,91	9,30 \pm 1,31	5,42 \pm 0,75	
Kontrol	12,5	5	2,5	1	0,5
Takrin	98,3 \pm 0,56	89,32 \pm 0,55	59,65 \pm 1,00	46,88 \pm 2,28	35,84 \pm 1,88



Şekil 4.26. Rozmarinik asit, ursolik asit, rutin ve P. vulgaris ekstresinin asetilkolinesteraz enzim inhibisyon değerleri (* $p < 0.05$, ** $p < 0.0001$).

Tablo 4.7. Ekstre ve saf bileşiklerin BChE enzim inhibisyonu.

Örnek	Konsantrasyonlar (Ekstre µg/ml; Saf Bileşikler µM)				
	% İnhibisyon Değerleri				
	1000	400	200	50	
Ekstre	44,87±2,53	28,98±0,91	20,53±1,15	10,14±3,19	
Saf Bileşikler	100	40	20	5	
Rozmarinik asit	84,28±2,54	63,35±2,89	53,03±4,38	33,38±3,67	
Ursolik asit	63,8±0,88	52,25±2,44	37,09±0,86	16,69±1,86	
Rutin	37,8±1,77	23,64±1,21	14,80±1,44	4,09±0,85	
Kontrol	12,5	5	2,5	1	0,5
Takrin	96,3±1,56	79,32±0,69	55,65±1,55	42,61±1,14	33,87±1,84

**Şekil 4.27.** Rozmarinik asit, ursolik asit, rutin ve *P. vulgaris* ekstresinin bütirikolinesteraz enzim inhibisyon değerleri (* $p < 0.05$, ** $p < 0.0001$).

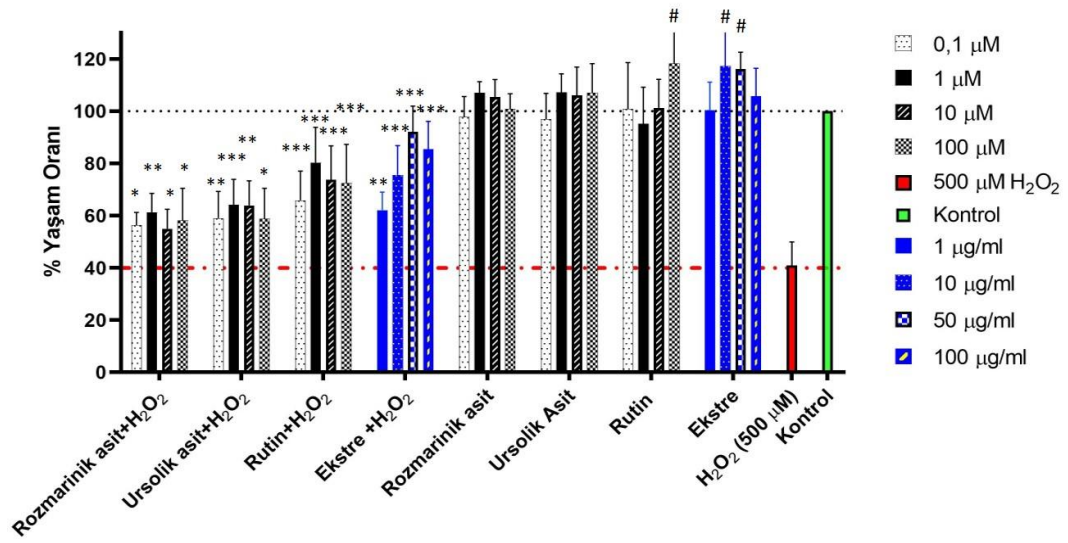
4.2.2. SH-SY5Y Hücrelerinde Nöroprotektif Etkinin Belirlenmesine Ait Bulgular

SH-SY5Y hücrelerinde nöroprotektif etkinin incelenmesi için H_2O_2 ile uyarılmış nörotoksisite modeli kullanılmıştır (90). Bu yöntemde test edilen ekstre ve saf bileşikler hem tek başlarına hem de $500 \mu M H_2O_2$ ile birlikte hücrelere uygulanmış ve % yaşam oranı olarak verilen sonuçlar Şekil 4.28'de sunulmuştur. Sadece hidrojen

peroksit ile muamele edilen hücreler, H₂O₂ (500 µM) yazan sütunda yer almaktadır. Kontrol yazan sütun ise H₂O₂ ve örnekleri içermeyen sağlıklı hücreleri ifade etmektedir. Sadece H₂O₂ (500 µM) uygulanan hücrelerin yaşam oranının % 40'a düştüğü belirlenmiştir.

Ekstre 100, 50, 10, 1 µg/ml konsantrasyonlarda, rozmarinik asit (**P-1**), ursolik asit (**P-2**) ve rutin (**P-5**) ise 100, 10, 1 ve 0,1 µM konsantrasyonlarda, tek başlarına SH-SY5Y hücrelerine uygulanmış ve bu konsantrasyonların hiçbirisinde örneklere ait sitotoksisite gözlenmemiştir. Aksine, hücrelerin çoğalması ekstre ve bileşikler tarafından uyarılmış olup, % yaşam oranı kontrol hücrelerinden daha yüksek düzeye çıkmıştır (Şekil 4.28).

Diğer taraftan, ekstre ve bileşiklerin H₂O₂ ile birlikte uygulandığı durumda da hücre yaşam oranlarındaki bu belirgin artış açıkça görülmektedir (p<0,05, Şekil 4.28). Sadece H₂O₂ (500µM) uygulanan hücrelerde yaşam oranının %40'a düştüğü belirlenmiş; rozmarinik asit, ursolik asit ve rutinin 10 µM konsantrasyonda H₂O₂'nin neden olduğu bu hücre hasarını azaltarak, % 40'a düşmüş olan hücre yaşam oranını sırasıyla % 54, % 63 ve %73'e çıkardığı tespit edilmiştir. Bu bileşiklerin 0.1 µM konsantrasyonda bile nöroprotektif etkiye sahip oldukları görülmektedir. Ekstre ise 50 µg/ml konsantrasyonda hücre canlılığını % 92'ye çıkarmıştır (Şekil 4.28). Bu bulgular, H₂O₂ tarafından oluşturulan nörotoksisiteye karşı *P. vulgaris* ekstresi ve elde edilen saf bileşiklerin çalışılan tüm konsantrasyonlarda nöroprotektif etkiye sahip olduklarını açıkça göstermektedir.



Şekil 4.28. Ekstre, rozmarinik asit, ursolik asit ve rutinin H₂O₂ ile indüklenmiş SH-SY5Y hücrelerindeki hücre canlılığı üzerine etkileri. Sonuçlar ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir. (* $p < 0.05$, ** $p < 0.001$, *** $p < 0.0001$, 500 µM H₂O₂ içeren hücre) (# $p < 0.05$, kontrol hücre).

5. TARTIŞMA

Dünya genelinde 15 türü bulunan *Prunella* cinsi, ülkemizde 4 tür ile temsil edilmektedir. Bu türler arasında yer alan *P. vulgaris* L. halk arasında en yaygın kullanımı olan tıbbi bitkilerdendir (2). *P. vulgaris*' in geleneksel kullanım alanları incelendiğinde; bitkinin toprak üstü kısımlarının romatizma, soğuk algınlığı ve kardiyak bozukluklara karşı dahili olarak kullanıldığı bilinmektedir (11). Ayrıca; ateş düşürücü, hipertansiyon, göz ağrısı, ödem ve şişkinlik giderici gibi amaçlarla da geleneksel olarak kullanımı mevcuttur (1, 49). *Prunella* cinsi üzerinde yapılan biyolojik etki çalışmaları; antiviral, antioksidan, antienflamatuvar, nöroprotektif, immünmodülatör, antibakteriyel, antitümör, antihipertansif ve hipoglisemik etkiler üzerinde yoğunlaşmıştır (1, 8, 49)

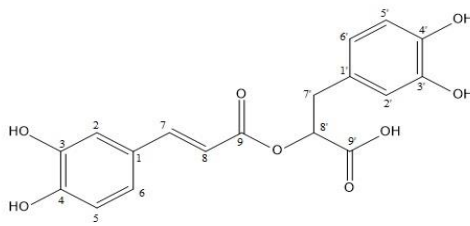
Demans türleri arasında en sık gözlenen Alzheimer hastalığı (AH), patolojik olarak beyin içinde amiloid plaklar ve nörofibriler yumakların birikimi ile karakterize, belirli beyin bölgelerindeki bazı nöron türlerinin dejenerasyona uğraması ve şiddetli nöronal kaybı ile sonuçlanan, nörodejeneratif bir bozukluktur (97). Alzheimer hastalığına karşı bitkiler başta olmak üzere doğal kaynaklardan çare bulma arayışları günümüzde artarak devam etmektedir. Bu nedenlerle, *P. vulgaris*'in geleneksel kullanımından ve antienflamatuvar etkisinden yola çıkılarak, nöroenflamasyonda da etkili olabileceği ve Alzheimer gibi nörodejeneratif hastalıklarda kullanılabileceği düşüncesi ile tez çalışmamızda, toprak üstü kısımlarından elde edilen ekstrenin nöroprotektif etkileri *in vitro* yöntemlerle araştırılmış ve etkiden sorumlu bileşikler tespit edilmiştir.

P. vulgaris 'in gölgede kurutulmuş toprak üstü kısımları toz edildikten sonra, %80 EtOH ile 40°C de ekstre edilmiş, ekstraksiyon işlemi 5 kez tekrarlandıktan sonra ekstreler birleştirilmiş ve yoğunlaştırılmıştır. Yoğunlaştırılan ekstre suda çözüldükten sonra petrol eteri ile sıvı-sıvı ekstraksiyonu yapılarak lipofilik bileşiklerden kurtarılmış ve kalan sulu ekstre üzerinden izolasyon çalışmalarına devam edilmiştir. Sulu ekstrenin ön fraksiyonlama işleminde poliamit kolon kromatografisinden yararlanılmış ve beş ana fraksiyon elde edilmiştir. Ardından ana fraksiyonlar üzerinde izolasyon çalışmaları yürütülerek 3 flavonol glikoziti, 1 fenolik asit ve 1 triterpen olmak üzere, toplam 5 bileşik izole edilmiştir. İzole edilen bileşiklerin yapıları ileri spektral yöntemler yardımıyla, rozmarinik asit (**P-1**), ursolik asit (**P-2**), kemferol-3-O-

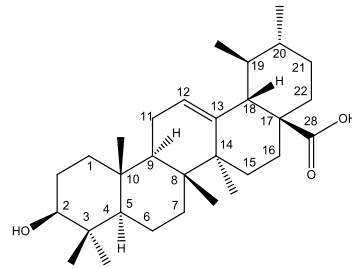
rutinozit (**P-3**), kersetin 3-*O*-glukozit (**P-4**) ve rutin (**P-5**) olarak aydınlatılmıştır. Bu bileşiklerin tamamı daha önce *Prunella* cinsinde tespit edilmiş veya *Prunella* türlerinden elde edilmiş bileşikler olup, yapıları Tablo 5.1’de gösterilmiştir.

Ekstrenin ve izole edilen bileşiklerin *in vitro* asetilkolinesteraz ve bütirikolinesteraz enzim inhibitör etkileri belirlenmiş ve ayrıca, H₂O₂ ile nörotoksisite oluşturulan SH-SY5Y (insan nöroblastoma) hücrelerinde hücre canlılığı üzerine olan nöroprotektif etkileri MTT yöntemi ile incelenmiştir.

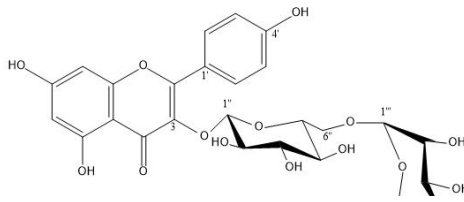
Tablo 5.1. *P. vulgaris*’ ten izole edilen bileşikler.



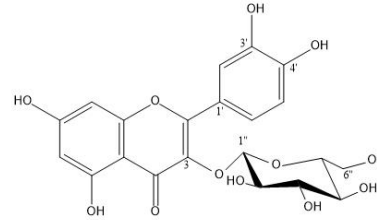
Rozmarinik asit (P-1)



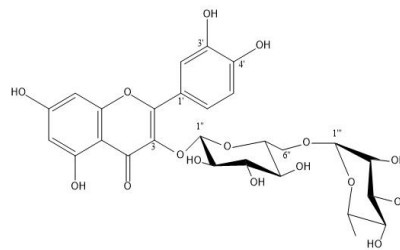
Ursolik asit (P-2)



Kemferol 3-*O*-rutinozit (P-3)



Kersetin 3-*O*-glukozit (P-4)



Rutin (P-5)

P-1 bileşiğinin ince tabaka kromatografisindeki davranışı, revelatör olarak vanilin/H₂SO₄ püskürtüldükten sonra plağın 105°C’de 1-2 dak. ısıtılması sonucunda kromatogramda zamanla solan koyu pembe renkli bir leke vermesi, UV-366’da mavi floresans gözlenmesi bileşiğın fenolik asit olabileceğini düşündürmüştür. **P-1** ‘in ¹H NMR spektrumu incelendiğinde (Bkz. Tablo 4.1; Şekil 4.1) aromatik sahada 2 ABX

sistemi şeklinde gözlenen 6 aromatik proton sinyali ile AB sistem şeklinde gözlenen 2 olefinik proton sinyali görülmüştür. Olefinik protonların yüksek kenetlenme sabitleri sebebi ile ($J=16$ Hz) trans-konumda oldukları anlaşılmıştır. Bu bulgular δ_C 168,9 ppm'de gözlenen α,β -doymamış ester karbonili sinyali ve birinci ABX sistemi ile birlikte değerlendirildiğinde yapıdaki *trans*-kafeik asit varlığını doğrulanmıştır. 1H NMR spektrumunda gözlenen metilen protonları ikinci ABX sistemi ile birlikte değerlendirildiğinde ve δ_C 172,9 ppm'de görülen karboksilat anyonu dikkate alındığında yapıda bir de dihidroksifenillaktik asit moyitesi bulunduğu anlaşılmıştır. Bileşiğin HMBC spektrumu değerlendirildiğinde (Bkz. Şekil 4.5), *trans*-kafeik asidin 3,4-dihidroksifenillaktik asit ile 8' konumundan bağlı olduğunu göstermiştir. Tüm bu bilgiler ışığında **P-1** bileşiğinin rozmarinik asit olduğu saptanmıştır. Bu bileşik daha önce *Prunella vulgaris*, *P. vulgaris* var. *lilacina*, *P. orientalis*, *P. grandiflora* ve *P. vulgaris* subsp. *asiatica* türlerinde tespit edilmiştir (1, 32, 39, 41, 43-45, 93)

Beyaz renkli amorf yapılı **P-2** bileşiğin İTK analizinde bileşiğin terpen yapısında olabileceğine işaret eden, pembe-mor renkli bir leke gözlenmiştir. **P-2'** nin 1H NMR spektrumu incelendiğinde (Bkz. Tablo 4.2; Şekil 4.6) δ_H 3,00 ppm' de görülen sinyal hidroksil komşuluğunu ve δ_H 5,13 ppm'deki sinyal ise olefinik proton varlığını göstermiştir. Bunların yanında yüksek alanda gözlenmiş (δ_H 0,67-1,03 ppm), 7 metil grubu varlığı saptanmıştır. ^{13}C NMR spektrumunda (Bkz Şekil 4.7) 30 karbon sinyali gözlenmesi, düşük alanda gözlenen, C-12/C-13 çifte bağını işaret eden, δ_C 125,0 (C-12, katerner) ve δ_C 138,6 (C-13, katerner) sinyalleri ile 1H NMR spektrumunda δ_H 0,89 ve δ_H 0,96 ppm'de dublet olarak gözlenen 2 metil sinyali, bileşiğin ursan yapısında olabileceğini göstermiştir. P-2 bileşiğinin yapısı, 1D ve 2D NMR spektrumları yardımıyla ursolik asit olarak aydınlatılmıştır. Ursolik asit daha önce *Prunella vulgaris* ve *P. vulgaris* var. *lilacina* türlerinden izole edilmiştir (1, 30, 33, 83).

Sarı renkli amorf bir katı formda elde edilen **P-3, P-4 ve P-5** kodlu bileşiklerin, İTK analizlerinde, revelatör püskürtülmeden önce gün ışığında sarı, UV₂₅₄ nm'de mor ve UV₃₆₆ nm'de sarı renkli floresans göstermesi, ardından vanilin/H₂SO₄ püskürtülmesi ile birlikte plağın 105°C de 1-2 dakika boyunca ısıtıldığında gün ışığında sarı-turuncu bir renk görülmesi ve UV₃₆₆ nm'de görülen sarı floresansın şiddetlenmesi bu bileşiklerin flavonoit olabileceklerini düşündürmüştür.

P-3 bileşiğinin ^{13}C NMR spektrumunda görülen toplam 27 karbon sinyalinden aglikona ait 15 karbon sinyali çıkarıldığında, yapıda 2 oz bulunduğu anlaşılmış, ^1H NMR ve ^{13}C NMR spektrumlarında (Bkz Şekil 4.11, Şekil 4.12) gözlenen 2 anomerik proton ve karbon sinyalleri bileşiğin diglikozidik yapıda olduğunu doğrulamıştır. COSY ve HMQC spektrumları incelendiğinde (Bkz. Şekil 4.13, Şekil 4.14), yapıdaki ozların β -glukoz ve α -ramnoz olduğu bulunmuştur. ^1H NMR spektrumunda, flavonoitin 5,7-disübstitüe A halkasındaki meta kenetlenmeyi işaret eden, δ_{H} 6,37 ve 6,15 ($J=2,1\text{Hz}$) sinyalleri gözlenmiştir. Bu sinyallere ilave olarak, δ_{H} 7,97 ve 6,88'de ($J=8,8\text{Hz}$) AB sistem şeklinde tespit edilen ikişer proton değerindeki 4 aromatik proton sinyali 4'-sübstitüe B halkası için karakteristik olup, başka proton sinyalinin gözlenmemiş olması aglikonun flavonol olduğunu göstermiştir. HMBC spektrumu incelendiğinde (Bkz. Şekil 4.15), oz zincirinin aglikona C-3 OH'dan bağlı olduğunu açıklamıştır. Ramnozun anomerik protonuna ait sinyalle (δ_{H} 4.58) glukozun C-6" (δ_{C} 66.4) sinyali arasındaki etkileşim ve glukozun C-6" sinyalinin bu konumda sübstitüsyon bulundurmayan glukozu göre yaklaşık 4 ppm düşük alana kayması ise ramnozun glukozu C-6"dan bağlı olduğunu göstermiştir. Bu bilgiler ışığında, **P-3** bileşiğinin yapısı kemferol 3-*O*-rutinozit olarak aydınlatılmıştır. Bu bileşik daha önce *P. vulgaris* var. *lilacina* türünden izole edilmiştir (32).

P-4 ve **P-5** bileşiklerinin ^1H NMR ve ^{13}C NMR spektrumları incelendiğinde (Bkz.Tablo 4.4, Tablo 4.5; Şekil 4.16, Şekil 4.21) aglikona ait sinyallerin çok benzer oldukları görülmüştür. Fark bileşiklerin taşıdıkları ozlardan kaynaklanmaktadır. **P-4**'te sadece tek anomerik proton ve karbon sinyali gözlenirken, **P-5**'te ise **P-3**'e benzer olarak 2 anomerik proton ve karbon sinyali olduğu gözlenmiştir. Her iki bileşiğin ^1H NMR spektrumunda 5,7- disübstitüe A halkası varlığını gösteren meta kenetlenmeye sahip sinyaller (**P-4**: δ_{H} 6,35 d ve 6,17 d, $J=2$; **P-5**: δ_{H} 6,36 d ve 6,16 d, $J=1,7$) ile ABX sistemine sahip, 3',4' disübstitüe B halkasına işaret eden sinyaller (**P-4**: δ_{H} 7,71 d, $J=2,1$; 7,58 dd, $J=2,0/8,5$; 6,86 d, $J=8,5$; **P-5**: δ_{H} 7,56 d, $J=2,2$; 7,53 dd, $J=2,2/8,3$; 6,83 d, $J=8,3$) aglikonun kersetin olduğunu göstermiştir. Her iki bileşiğin COSY ve HSQC (Bkz. Şekil 4.18, Şekil 4.19, Şekil 4.23, Şekil 4.24) spektrumlarının detaylı olarak incelenmesi ve yorumlanması sonucunda yapıdaki ozların **P-4** bileşiğinde β -glukoz, **P-5** bileşiğinde ise rutinoz [α -ramnopiranozil-(1 \rightarrow 6)- β -glukopiranozil] olduğu anlaşılmıştır.

P-4 ve **P-5** bileşiklerinin HMBC spektrumları (Bkz. Şekil 4.20 ve Şekil 4.25) incelendiğinde, oz zincirlerinin aglikona C-3 OH'dan bağlı olduğu anlaşılmıştır. 1D- ve 2D-NMR spektrumlarından elde edilen bulgulara dayanarak; **P-4** bileşiğinin yapısı, kersetin 3-*O*-glukozit olarak aydınlatılmıştır (95). Kersetin-3-*O*-glukozit daha önce *Prunella vulgaris*, *P.vulgaris* var. *lilacina*, *P. grandiflora*, *P. laciniata* ve *P. hyssopifolia* türlerinden izole edilmiştir (1, 10, 32)

Aynı şekilde, **P-5** bileşiği ise rutin (kersetin 3-*O*-rutinoz) olarak tanımlanmıştır. Bu bileşik daha önce *Prunella vulgaris*, *P. vulgaris* var. *lilacina*, *P. grandiflora* ve *P. hyssopifolia*, *P.lacianata* ve *P.vulgaris* subsp. *asiatica* türlerinden izole edilmiştir (10, 25, 32, 39).

Alzheimer hastalarında kolinerjik nöronlarda bozulmalar ile birlikte asetilkolin miktarında da azalma gerçekleşmekte ve bu durum asetilkolinesteraz enziminin işlevindeki bozulmalara paralel olarak gelişmektedir (22). Dolayısıyla, kolinesteraz enzimini inhibe ederek asetilkolin miktarını arttırmaya çalışan doğal kaynaklar arasında özellikle bitkiler, tedavi edici bileşik araştırmalarında ilgi odağı olmuştur.

Çalışmamızda, *P. vulgaris* sulu ekstresinin ve bu ekstreten elde edilen saf bileşiklerin AChE ve BChE enzim inhibitör etkileri değerlendirilmiştir. Ekstre, 1000 µg/ml konsantrasyonda AChE enzimini % 32,80 oranında inhibe etmiştir, BChE inhibitör etkisinin ise daha yüksek olduğu saptanmış ve ekstrenin aynı konsantrasyonda BChE enzimini % 44,87 oranında inhibe ettiği gözlenmiştir (Tablo 5.2, Tablo 5.3).

Elde edilen ve miktarı yeterli olan saf bileşiklerle yürütülen deneylerde AChE enzimi üzerine 100 µM konsantrasyonda en yüksek inhibitör etkiyi gösteren bileşik, % 46,86 inhibisyon oranı ile rozmarinik asit (**P-1**) olarak belirlenmiştir. Diğer bileşiklerin etkileri ise oldukça düşük bulunmuştur (Tablo 5.2).

Tablo 5.2. Ekstre ve saf bileşiklerin AChE enzim inhibisyonu.

Örnek	Konsantrasyonlar (Ekstre µg/ml; Saf Bileşikler µM)/ %İnhibisyon Değerleri				
	1000	400	200	50	
Ekstre	32,80±3,04	26,34±1,70	20,27±1,00	10,06±1,82	
Saf Bileşikler	100	40	20	5	
Rozmarinik asit	46,86±1,32	41,04±0,87	35,44±1,65	27,06±1,17	
Ursolik asit	28,32±1,62	21,95±1,22	16,61±1,31	12,15±4,34	
Rutin	18,28±0,90	13,97±0,91	9,30±1,31	5,42±0,75	
Kontrol	12,5	5	2,5	1	0,5
Takrin	98,3±0,56	89,32±0,55	59,65±1,00	46,88±2,28	35,84±1,88

Rozmarinik asitin (**P-1**) 100 µM konsantrasyonda BChE enzimini % 84,28 oranında inhibe ettiği ve bu inhibisyonun referans olarak kullanılan takrin ile karşılaştırılabilir düzeyde olduğu anlaşılmıştır (Bkz.Şekil 4.26,4.27). Aynı konsantrasyonda ikinci yüksek inhibitör etkiyi ise % 63,8 inhibisyon ile ursolik asit (**P-2**) göstermiştir. Rutinin (**P-5**) BChE inhibitör etkisinin %37,8 olduğu görülmüştür (Tablo 5.3). Rutinin, her iki enzim üzerinde en düşük etkiyi gösterdiği belirlenmiştir (Bkz. Şekil 4.26, Şekil4.27).

Tablo 5.3. Ekstre ve saf bileşiklerin BChE enzim inhibisyonu.

Örnek	Konsantrasyonlar (Ekstre µg/ml; Saf Bileşikler µM)				
	% İnhibisyon Değerleri				
	1000	400	200	50	
Ekstre	44,87±2,53	28,98±0,91	20,53±1,15	10,14±3,19	
Saf Bileşikler	100	40	20	5	
Rozmarinik asit	84,28±2,54	63,35±2,89	53,03±4,38	33,38±3,67	
Ursolik asit	63,8±0,88	52,25±2,44	37,09±0,86	16,69±1,86	
Rutin	37,8±1,77	23,64±1,21	14,80±1,44	4,09±0,85	
Kontrol	12,5	5	2,5	1	0,5
Takrin	96,3±1,56	79,32±0,69	55,65±1,55	42,61±1,14	33,87±1,84

Daha önce, çeşitli bitkiler üzerinde yapılan bir çalışmada, *P. vulgaris* var. *lilacina*'nın asetilkolinestraz inhibitör etkisi, %100 etanolü (85 °C'de hazırlanmış) ekstresi üzerinden *in vitro* olarak değerlendirilmiş ve 18.83µg/ml IC₅₀ değeri ile çalışılan bitkiler arasında en yüksek inhibitör etkiye sahip olduğu bulunmuştur (98). Başka bir çalışmada, *P.vulgaris*'in metanolü ekstresinin 1 mg/ml konsantrasyonda asetilkolinestraz enzimini % 89 oranında inhibe ettiği saptanmıştır (1). *P. vulgaris*'den elde edilen etil asetat ekstresi *in vitro* koşullarda AChE inhibisyon etkisi göstermiş, IC₅₀ değeri 101,8 µg/ml olarak bulunmuştur (74).

Ekstre ile ilgili sonuçlarımız daha önce yapılan çalışmalarını destekler nitelikte olup, ufak tefek farklılıkların kullanılan yöntemlerin ve ekstraksiyon çözücüsünün farkından kaynaklandığı düşünülmektedir.

Tarafımızdan elde edilen ve enzim inhibitör etkileri araştırılan saf bileşiklerle ilgili de daha önce yürütülmüş çalışmalar bulunmaktadır.

Rozmarinik asitin asetilkolinestraz inhibitör etkisi *in silico* incelenmiş düşük bağlanma enerjisinden nedeniyle diğer asetilkolinestraz enzim inhibitörleri galantamin, huperzin A ve fizostigminin (sırasıyla -8.0, -7.7, -7.5 ve -7.0 kcal/mol) daha etkili bulunmuştur (24). Rozmarinik asitin asetilkolinestraz ve bütirikolinestraz enzim inhibitör etkilerinin belirlendiği bir çalışmada, 1.0 mg/ml konsantrasyonda AchE enzimini % 47.3 ve BchE enzimini ise % 85.8 oranında inhibe

ettiği gözlenmiştir (99). Çalışmamızın sonuçları bu çalışmayı tamamen destekler niteliktedir (Tablo 5.2, 5.3).

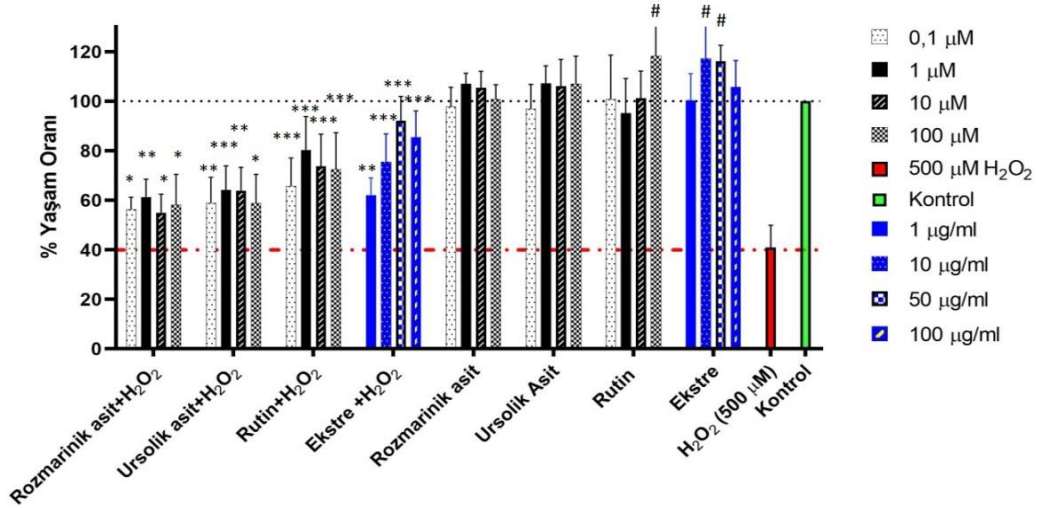
Ursolik asitin asetilkolinesteraz enzim inhibisyonunun incelendiği ve referans olarak takrinin kullanıldığı bir çalışmada, enzimi % 50 inhibe eden konsantrasyonu (IC₅₀ 7,5 nM olarak belirlenmiştir. Ursolik asitin AChE inhibitör etkisi takrine kıyasla daha düşük bulunmuştur (100). Ursolik asitin asetilkolinesteraz ve bütirikolinesteraz enzim inhibitör etkilerinin değerlendirildiği bir başka çalışmada 100µM konsantrasyonda AchE enzimini % 50.7 ve BchE enzimini ise % 66.7 oranında inhibe ettiği gözlenmiştir (101). Çalışmamızın sonuçları, ursolik asit (**P-2**) için daha düşük inhibitör etki tespit etmemize karşın (sırasıyla % 28 ve % 63 inhibisyon), bu çalışmayı destekler niteliktedir (Tablo 5.2, 5.3).

Rutinün sıçanlarda asetilkolinesteraz ve bütirikolinesteraz enzim aktivitelerini arttıran kolistin kaynaklı nörotoksositeye karşı nöroprotektif etkisi incelenmiştir. 35 erkek Sprague Dawley sıçanı 5 gruba ayrılmış ve tedavi grubuna rutin (50 ve 100 mg/kg vücut ağırlığı/oral) uygulanması sonucu sıçanlarda kolistin tarafından indüklenen beyin üzerinde AChE ve BChE enzim etkisi incelenmiştir. Rutinin uygulanan tüm dozlarda her iki enzimin aktivitesini kolistin ile tedavi edilen gruba kıyasla önemli ölçüde azalttığı bildirilmiştir (p<0.05) (22). Rutinin 1000 µg/ml konsantrasyonda, enzim inhibitör etkilerinin değerlendirildiği başka bir çalışmada AchE enzimini % 75 ve BchE enzimini % 72 oranında inhibe ettiği gözlenmiştir (102). Çalışmamızda ise AChE ve BChE inhibitör etkileri değerlendirilen 3 bileşikten en düşük etkiye sahip bileşiğin rutin (**P-5**) olduğu bulunmuştur (Tablo 5.2, 5.3)

Tez çalışmamızda, *P. vulgaris*' in *in vitro* nöroprotektif etkisi, hem bitkinin toprak üstü kısımlarından hazırlanan ekstresi hem de ekstreden elde edilen ve miktarı çalışma için yeterli olan saf bileşikler kullanılarak H₂O₂ ile nörotoksosite oluşturulan SH-SY5Y (insan nöroblastoma) hücrelerinde MTT yöntemi ile incelenmiştir.

Çalışmamız sonucunda, denenen tüm örneklerin H₂O₂ hasarına karşı çalışılan tüm konsantrasyonlarda koruyucu etki gösterdiği ve istatistiksel olarak anlamlı düzeyde hücre canlılığını artırdığı gösterilmiştir (Şekil 5.4). Sadece H₂O₂ (500µM) ile uyarılmış hücrelerde yaşam oranının % 40'a düştüğü saptanmıştır. Ekstre 50 µg/ml konsantrasyonda hücre canlılığını %92'ye çıkarmıştır. Rozmarinik asit (**P-1**), ursolik asit (**P-2**) ve rutin (**P-5**) 0.1 µM konsantrasyonda bile nöroprotektif etkiye sahip

oldukları görülmüş; 10 μM konsantrasyonda H_2O_2 'nin neden olduğu bu hücre hasarını azaltarak, % 40'a düşmüş olan hücre yaşam oranını sırasıyla % 54, % 63 ve %73'e çıkardığı tespit edilmiştir. Çalışmamızın sonucuna göre, en yüksek nöroprotektif etkiye rutinin (P-5) sahip olduğu görülmektedir (Şekil 5.1).



Şekil 5.1. Ekstre, rozmarinik asit, ursolik asit ve rutinin H_2O_2 ile indüklenmiş SH-SY5Y hücrelerindeki hücre canlılığı üzerine etkileri. Sonuçlar ortalama \pm standart sapma olarak verilmiştir. (* $p < 0.05$, ** $p < 0.001$, *** $p < 0.0001$, 500 μM H_2O_2 içeren hücre) (# $p < 0.05$, kontrol hücre).

P. vulgaris'in farklı ekstreleri ve izole ederek etkilerini çalıştığımız saf bileşikler üzerinde farklı yöntemler, benzer veya farklı hücreler kullanılarak son yıllarda yürütülmüş bir kaç nöroprotektif etki çalışmasına rastlanmıştır.

Bir çalışmada, *P. vulgaris* etanol ekstresinin skopolamin ve MK-801 ile indüklenen fare hafızası bozukluklarında olumlu sonuçlar verdiği saptanmıştır. İlgili mekanizmanın ise; NMDA reseptör aracılı sinyalleşme yoluyla kolinerjik sistemin güçlendirilmesinin olabileceği düşünülmüştür (1). Başka bir çalışmada ise, *P. vulgaris*'in % 80 etanol ekstresinin, 6-hidroksidopamin (6-OHDA) tarafından uyarılmış SH-SY5Y hücrelerinde NO üretimine karşı etkisi incelenmiş ve 100 $\mu\text{g}/\text{mg}$ konsantasyonunda uygulanan ekstrenin inhibisyon değeri %44,3 olarak bulunmuştur. Ayrıca, ekstrenin SH-SY5Y hücre canlılığı üzerindeki etkisi WST-1 proliferasyon testi ile incelenmiş ve ekstre 100 $\mu\text{g}/\text{mg}$ konsantasyonda uygulandığında hücre canlılığını anlamlı bir şekilde koruduğu gözlenmiştir ($p < 0.05$) (73).

Rozmarinik asitin nörolojik hastalıklara karşı ve bazı nörotoksisite durumlarında nöroprotektif etkileri olduğu ve bu etkilerini oksidatif stresi azaltıp nöronal hücre ölümünü engelleyerek gösterdikleri düşünülmüştür (103). Rozmarinik asidin oksidatif stres durumlarında Bax ve Bcl-2 proteinlerinin regülasyonlarını sağlamak yoluyla apoptozu kontrol ederek SH-SY5Y hücrelerini koruduğu da farklı çalışmalarda ispatlanmıştır (104). Oksidatif stresi azaltarak nöronal hücreleri korumasının yanı sıra rozmarinik asit, A β peptidinin enjekte edildiği farelere intraserebroventriküler yolla uygulandığında nöron hücrelerinde A β plaklarının oligomerizasyonunu ve birikmesini belirgin ölçüde engellemiştir (105). Ovaryektomi yapılmış sıçanlara 60 gün boyunca oral rozmarinik asit (50 mg/kg) uygulanması ile, diğer tedavi gruplarına göre sıçanların motor aktivite ve bilişsel fonksiyonlarında anlamlı bir gelişme gözlenmiş ve buna ek olarak beyin dokusundaki lipid peroksidasyon seviyesi, COX-2 ekspresyonu ve prostaglandin E2 (PGE-2) seviyelerini anlamlı bir şekilde azalttığı bildirilmiştir ($p < 0.05$) (106). Rozmarinik asitin A β üzerindeki potansiyel nöroprotektif etkisine dair kanıtlar da *in vivo* olarak incelenmiştir. Farelerde oral yoldan 14 gün boyunca RA 0.25 mg/kg dozda uygulanmış, nöroenflamasyona sebep olan agregatlaşmış A β 25–35'in etkisini anlamlı derecede iyileştirdiği gözlenmiştir ($p < 0.05$) (107). Ayrıca, A β 25–35 ile Alzheimer modeli oluşturulmuş farelerde, RA'nın (0.25 mg/kg, intravasküler) uygulanması sonucunda farelerdeki bilişsel bozuklukları belirgin derecede düzenlediği gözlenmiştir ($p < 0.05$) (108). N2A fare nöroblastoma hücrelerinde MTT yöntemi ile rozmarinik asitin hücre canlılığı üzerine olan etkileri ve H₂O₂ ile uyarılmış N2A fare nöroblastoma hücrelerinde koruyucu etkileri tayin edilmiştir. Rozmarinik asitin 50 μ M konsantrasyonda hücre canlılığını % 98,3'e çıkardığı saptanmıştır (109). Yapılan başka bir çalışmada, TNF- α tarafından uyarılmış SH-SY5Y hücrelerinde MTT yöntemi ile rozmarinik asitin nöroprotektif etkisi incelenmiş ve 81 μ M konsantrasyonda hücre yaşam oranını %73,5'e çıkardığı tespit edilmiştir (110).

Ursolik asitin (UA) serebral iskemik patogenezi üzerindeki nöroprotektif etkisi incelenmiştir. Nrf2^(-/-) ve WT tip fare modellerinde beyindeki kan akışını engellemek için orta serebral arter geçici olarak tıkanarak serebral iskemiye sebep olmuş ve 24 saat sonra ursolik asit tedavisi uygulanmıştır. UA ile tedavi edilen farelerin nörolojik fonksiyonları incelendiğinde anlamlı bir iyileşme gözlendiği belirtilmiştir ($p < 0.05$).

Ayrıca, UA tedavisinin serabral iskeminin sebep olduğu mRNA düzeylerindeki TLR4 ve NF-kB'nin ekspresyonunu önemli ölçüde azalttığı bildirilmiş ($p < 0.05$) ve bu durum ursolik asitin antienflamatuvar etkilerini de desteklemiştir (111). Ursolik asitin nöroprotektif etkisinin incelendiği *ex vivo* bir çalışmada, sıçan beyinde 0.1 mM Fe₂SO₄ ile uyarılmış nörotoksisite modeli oluşturulmuş ve ursolik asitin oksidatif beyin hasarı üzerindeki etkilerini araştırmak üzere 15, 30, 60, 120, 240 µg/mL dozlarda uygulanmış ve her bir dozun asetilkolinesteraz etkisi incelenmiştir. Bu çalışma sonucunda, ursolik asitin asetilkolinesteraz inhibitör etkisinin doza bağlı ve istatistiksel olarak anlamlı olduğu gözlenmiştir ($p < 0.05$) (112).

Rutin, nörodejeneratif bir hastalık olan multipl skleroz (MS) model III lezyonunda 2 farklı dozda (50 veya 100 mg/kg/oral) nöroprotektif etkisi, C57BL/6 fareleri üzerinde standart ilaç olan dimetil fumarat (15 mg/kg) ile karşılaştırılmış ve cuprizon ile indüklemiş nöroenflamasyon modelinde incelenmiştir. Altı haftalık rutin tedavisi sonrasında, beyindeki motor fonksiyon aktiviteyi ve motor koordinasyonu önemli ölçüde iyileştirdiği gözlenmiştir ($p < 0.05$) ve farelerin beyindeki Corpus callosum bölgesindeki cuprizonun neden olduğu oksidatif stres ve enflamasyonu belirgin derecede azalttığı belirtilmiştir ($p < 0.05$) (113). 35 erkek Sprague Dawley sıçanı 5 gruba ayrılmış ve rutin tedavisi (50 ve 100 mg/kg vücut ağırlığı/oral) kolistin ile birlikte uygulandığında sıçan beyindeki nöroenflamasyon süreci incelenmiş ve rutin NF-kB seviyelerini uygulanan doz sırasıyla 0.10 ve 0.20 kat, TNF- α seviyelerini 0.15 ve 0.29 kat ve iNOS seviyelerini de 0.12 ve 0.20 kat olarak kolistin ile tedavi edilen gruba kıyasla belirgin derecede azalttığı gözlenmiştir ($p < 0.05$) (114).

Elde ettiğimiz bileşikler üzerinde yürütülmüş olan nöroprotektif etki çalışmalarının son yıllarda artış göstermesi tez çalışmamızın güncelliğini desteklemektedir. Kullanılan bazı yöntemlerin farklı olmasına karşın bulgularımızın, benzer yöntemlerle farklı hücrelerde yapılan çalışmalarla uyumlu olduğu da anlaşılmıştır.

Tez çalışmamız, *P. vulgaris* üzerinde yürütülen ayrıntılı fitokimyasal ve biyolojik etki çalışmalarının, *Prunella* türlerinin geleneksel kullanımını destekleyen ve nöroprotektif etkilerini kanıtlayan sonuçları ile literatüre katkıda bulunması açısından önem arz etmektedir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Tez çalışmamız sonucunda, tez önerisinde belirtilen hedeflerin tümüne ulaşılmış ve Türkiye bitki örtüsünde yetişen *Prunella vulgaris* L. hem biyolojik etkileri hem de kimyasal bileşimi açısından ayrıntılı olarak araştırılmıştır. *P. vulgaris*'in toprak üstü kısımlarının % 80 etanollü ekstresinin sulu fraksiyonu (sulu ekstre) üzerinde yürütülen çalışmamızda fitokimyasal çalışmalar sonucunda, 3 flavonol glikoziti, 1 fenolik asit ve 1 triterpen olmak üzere, toplam 5 tane bileşik izole edilmiştir. İzole edilen bileşiklerin yapıları 1D- ve 2D-NMR spektroskopileri ve kütle spektroskopisi kullanılarak aydınlatılmıştır. Rozmarinik asit (**P-1**), ursolik asit (**P-2**), kemferol-3-*O*-rutinozit (**P-3**), kersetin 3-*O*-glukozit (**P-4**) ve rutin (**P-5**) olarak tanımlanan bu bileşiklerin hepsi daha önce *Prunella* cinsinde tespit edilmiş veya *Prunella* türlerinden elde edilmiştir.

Prunella türlerinin dünya genelinde ve ülkemizde antienflamatuvar etkileri nedeniyle antiromatizmal ve yara iyi edici olarak, ayrıca soğuk algınlığında kullanıldığı bilinmektedir. Antienflamatuvar etkiden yola çıkılarak, bu türlerin nöroenflamasyonda da etki gösterebileceği ve Alzheimer gibi nörodejeneratif hastalıklarda da kullanılabilmesi hipotezinden hareketle *P. vulgaris*'in nöroprotektif etkileri *in vitro* yöntemlerle araştırılmış ve etkiden sorumlu bileşikleri tespit edilmiştir.

Bu amaçla, ekstrenin ve izole edilen bileşiklerin *in vitro* asetilkolinesteraz ve bütirikolinesteraz enzim inhibitör etkileri tayin edilmiş ve bunlara ek olarak; H₂O₂ ile nörotoksisite oluşturulan SH-SY5Y hücrelerinde hücre canlılığı üzerine olan nöroprotektif etkileri MTT yöntemi ile araştırılmıştır.

Sonuçlar, rozmarinik asitin BChE enzimini yüksek oranda inhibe ettiğini ve bu inhibisyonun pozitif kontrol olarak kullanılan takrin ile karşılaştırılabilir düzeyde olduğunu göstermiştir. Ayrıca, H₂O₂ tarafından oluşturulan nörotoksisiteye karşı ekstre ve elde edilen saf bileşiklerin çalışılan tüm konsantrasyonlarda nöroprotektif etkiye sahip oldukları belirlenmiştir. Bulgularımız *Prunella* cinsi üzerinde yapılan diğer çalışmaları desteklemiştir ve çalışmamızda elde edilen tüm sonuçlar literatüre katkıda bulunmuştur.

Günümüzde Alzheimer tedavisinde sınırlı sayıda ve sadece semptomatik amaçlı ilaçların bulunması ve doğal kaynaklı bileşiklerin yeni ilaç adayları moleküller

olabilme konusundaki potansiyelleri göz önüne alındığında çalışmamızın önemi bir kez daha ortaya çıkmaktadır.

Tez çalışmamız kapsamında yürütülen nöropotektif etki çalışmalarını daha ileriye taşımak amacıyla, farklı nörotransmitterler ile çalışılarak etki mekanizması aydınlatılabilir. Ayrıca, bulgular *in vivo* çalışmalarla desteklenerek kesinleştirilebilir. Bulgularımız; *in vitro* çalışmalarda yüksek nöroprotektif etki gösteren ve Alzheimer hastalığında kullanılabilir, birisi bitkinin ana bileşiği rozmarinik asit olmak üzere diğer etkili bileşikler, ursolik asit ve rutin, kullanılarak, çözünürlük, dağılma ve biyoyararlanımı artırmak amacıyla lipozom ve nanopartikül formülasyonlarının hazırlanmasına ve bu formülasyonların etkilerinin de *in vitro* ve *in vivo* çalışmalarla kanıtlanmasına katkıda bulunabilir.

7. KAYNAKLAR

1. Bai Y, Xia B, Xie W, Zhou Y, Xie J, Li H, et al. Phytochemistry and pharmacological activities of the genus *Prunella*. Food Chem. 2016;204:483-96.
2. Edmondson J.R. Flora of Turkey and the East Aegean Islands, University Press, Edinburg 1982;7:295-7.
3. Güner, A., Aslan, S., Ekim, T., Vural, M. ve Babaç, M.T. (edlr.), (2012). Türkiye Bitkileri Listesi (Damarlı Bitkiler). Nezahat Gökyiğit Botanik Bahçesi ve Flora Araştırmaları Derneği Yayını. İstanbul.
4. Wang S. J. WXH, Dai Y. Y., Ma M. H., Rahman K., Nian H., & Zhang H. *Prunella vulgaris*: A Comprehensive Review of Chemical Constituents, Pharmacological Effects and Clinical Applications. Current Pharmaceutical Design. 2019;25(3):359-69.
5. Ahmed J.H, Ezer N. *Prunella* L. Türlerinin Kimyasal Bileşikleri ve Biyolojik Aktiviteleri. Hacettepe Üniversitesi ,Eczacılık Fakültesi Dergisi 2008;28(1):93-113.
6. Yao X. J. WMA, Parniak M. A. . Mechanism of Inhibition of HIV-1 Infection In vitro by Purified Extract of *Prunella vulgaris*. 1992(1):26-62.
7. Çetin B, Kalyoncu F. Antibacterial Potential of Clonally Propagated *Prunella vulgaris* L. under *in vitro* Conditions. Journal of Advances in Medical and Pharmaceutical Sciences. 2018;18(2):1-4.
8. Koo B, Bae HJ, Goo N, Kim J, Kim J, Cai M, et al. A botanical drug composed of three herbal materials attenuates the sensorimotor gating deficit and cognitive impairment induced by MK-801 in mice. J Pharm Pharmacol. 2020;72(1):149-60.
9. Zdařilová A. SA, Šimánek V., Ulrichová J. *Prunella vulgaris* Extract and Rosmarinic Acid Suppress Lipopolysaccharide-Induced Alteration in Human Gingival Fibroblasts. (3), 386–392. 10.1016/j.tiv.2008.12.021. Toxicol Vitro 23 2009;3:386-92.
10. Jehad H. AHMED NE. *Prunella* L. Türlerinin Kimyasal Bileşikleri ve Biyolojik Aktiviteleri. Hacettepe Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi Dergisi. Ocak 2008;1(28):93-113.
11. Yeşilada E. GH, Sezik E., Tabata M., Goto K., Yasumasa Ikeshiro Traditional medicine in Turkey IV. Folk medicine in the Mediterranean subdivision. Journal of Ethnopharmacology. 1993;39(1):31-8.
12. Y. Cao, J.F. Chen Treatment of 23 cases of subacute thyroiditis with *Prunella vulgaris* L. combined with indomethacin Chinese Journal of Surgery of Integrated Traditional and Western Medicine. (2009)15 (3) , pp. 288-290.
13. Ryu, S. Y., Lee, C.-K., Lee, C. O., Kim, H. S., and Zee, O. P. . Antiviral Triterpenes from *Prunella Vulgaris*. Arch. Pharm. Res. (1992)15 (3), 242–245.

14. Y. Zheng, C.D. Qiao, W. Yuan, L. Zhao Influence of Self heal capsule on the expression of subsets of T lymphocyte in peripheral blood of rats with ulcerative colitis Chinese Journal of Integrated Traditional Western Medicine on Digestion, 12 (1) (2004), pp. 10-12.
15. Adámková H, Vicar, J., Palasová, J., Ulrichová, J., and Simánek, V. . *Macleya Cordata* and *Prunella Vulgaris* in Oral Hygiene Products - Their Efficacy in the Control of Gingivitis. . Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub. 2004;148(1):103-5.
16. Wu P. Shen Nong's Classic of the Materia Medica. Beijing, China: Scientific and Technical Documentation Press. 1996.
17. Şen M. A, Tüzün E., Kuçukali C. Nörodejeneratif Hastalıklara DNA Onarım Mekanizmaların Rolü. Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü dergisi. 2017;13(7):47-58.
18. Saka E. Alzheimer Hastalığı Patofizyolojisi : Deneysel ve Genetik Bulgular. 2010;13(3):21-6.
19. AL-RABEEİ MA. Geleneksel Bazı Tıbbi Bitkilerin Alzheimer Hastalığındaki Etkinliğinin *in-vitro* Olarak İncelenmesi. Yüksek Lisans Tezi. Marmara Üniversitesi 2019.
20. Perveen S, Al-Taweel AM, Fawzy GA, Ibrahim TA, Malik A, Khan A. Cholinesterase Inhibitory Triterpenes from *Perovskia atriplicifolia*. Asian Journal of Chemistry. 2014;26(18):6163-6.
21. Kato M, Ochiai R, Kozuma K, Sato H, Katsuragi Y. Effect of Chlorogenic Acid Intake on Cognitive Function in the Elderly: A Pilot Study. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine. 2018;2018:1-8.
22. Ghasemzadeh Rahbardar M, Hosseinzadeh H. Effects of rosmarinic acid on nervous system disorders: an updated review. Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology. 2020;393(10):1779-95.
23. Senol FS, Ślusarczyk S, Matkowski A, Pérez-Garrido A, Girón-Rodríguez F, Cerón-Carrasco JP, et al. Selective in vitro and in silico butyrylcholinesterase inhibitory activity of diterpenes and rosmarinic acid isolated from *Perovskia atriplicifolia Benth.* and *Salvia glutinosa* L. Phytochemistry. 2017;133:33-44.
24. Demirezer LO, Gurbuz P, Kelicen Ugur EP, Bodur M, Ozenver N, Uz A, et al. Molecular docking and *ex vivo* and *in vitro* anticholinesterase activity studies of *Salvia* sp. and highlighted rosmarinic acid. Turk J Med Sci. 2015;45(5):1141-8.4
25. Pan J, Wang H, Chen Y. *Prunella vulgaris* L. - A Review of its Ethnopharmacology, Phytochemistry, Quality Control and Pharmacological Effects. Front Pharmacol. 2022;13:903171.
26. Meng G, Wang M, Zhang K, Guo Z, Shi J. Research Progress on the Chemistry and Pharmacology of *Prunella vulgaris* Species. OALib. 2014;01(03):1-19.
27. Yang Y, Nan H, Wang G, Yang W, Xu J. Comparative Determination of the Volatile Components of *Prunella vulgaris*L. from Different Geographical

- Origins by Headspace Solid-Phase Microextraction and Gas Chromatography-Mass Spectrometry. *Analytical Letters*. 2013;46(13):2001-16.
28. Sendra J. Phytochemical Studies on *Prunella vulgaris* and *Prunella grandiflora*. *J Saponin and Triterpene Compounds*. 1963;15(3):333.
 29. Yu Q, Qi J, Wang L, Liu SJ, Yu BY. Pentacyclic Triterpenoids from Spikes of *Prunella vulgaris* L. Inhibit Glycogen Phosphorylase and Improve Insulin Sensitivity in 3T3-L1 Adipocytes. *Phytotherapy Research*. 2014;29(1):73-9.
 30. Du D, Cheng Z, Chen D. A new unusual Δ^{11} (12)-oleane triterpene and anti-complementary triterpenes from *Prunella vulgaris* spikes. *Natural Product Communications*. 2012;7(4):1934578X1200700422.
 31. Yu Q, Qi J, Wang L, Liu SJ, Yu BY. Pentacyclic triterpenoids from spikes of *Prunella vulgaris* L. inhibit glycogen phosphorylase and improve insulin sensitivity in 3T3-L1 adipocytes. *Phyther Res*. 2015;29(1):73-9
 32. Il Kyun Lee DHK, Seung Young Lee, Kyung Ran Kim, Sang Un Choi, Jong Ki Hong, Jei Hyun Lee, Young Hyun Park & Kang Ro Lee. Triterpenoic acids of *Prunella vulgaris* var. *lilacina* and their cytotoxic activities *in vitro*. *Drug Efficacy and Safety*. 2008;31:1578–83.
 33. Gu X, Li Y, Mu J, Zhang Y. Chemical constituents of *Prunella vulgaris*. *Journal of Environmental Sciences*. 2013;25:S161-S3.
 34. Kojima H, Tominaga, H., Sato, H., Ogura, H. Pentacyclic triterpenoides from *Prunella vulgaris*. *Phytochemistry*. 1987;26(4):1107-11.
 35. Hyun Gyu Choi THK, Sang-Hyun Kim and Jeong Ah Kimformat_ quoteCITE. Anti-allergic Inflammatory Triterpenoids Isolated from the Spikes of *Prunella Vulgaris*. *Communications*. 2016;11(1):31-2.
 36. Lou H-Y, Yao J-N, Pan J, Zheng S, Liu Y-Z, Liang G-Y, et al. C21 Steroidal Glycosides from *Prunella vulgaris*. *Journal of Carbohydrate Chemistry*. 2015;34(6):358-64.
 37. Wang Z. Studies on the chemical constituents from *Prunella vulgaris*. *Acta Pharm Sinica*. 1999;34:679-81.
 38. Olennikov DN, Shamilov AA, Kashchenko NI. New Glycoside of Quercetin from the Genus *Prunella*. *Chemistry of Natural Compounds*. 2023;59(4):647-50.
 39. Zholdasbayev ME, Atazhanova GA, Musozoda S, Poleszak E. *Prunella vulgaris* L.: An Updated Overview of Botany, Chemical Composition, Extraction Methods, and Biological Activities. *Pharmaceuticals (Basel)*. 2023;16(8):1106.
 40. Li HM, Kim JK, Jang JM, Kwon SO, Cui CB, Lim SS. The inhibitory effect of *Prunella vulgaris* L. on aldose reductase and protein glycation. *BioMed* .
 40. Li HM, Kim JK, Jang JM, Kwon SO, Cui CB, Lim SS. The inhibitory effect of *Prunella vulgaris* L. on aldose reductase and protein glycation. *BioMed Research International*. 2012;2012:928159.

41. Lee C, Shim SH. A New Neolignan from the Aerial Parts of *Prunella vulgaris* var. *lilacina*. *Chemistry of Natural Compounds*. 2017;53(1):24-7.
42. Raafat K, Wurglics M, Schubert-Zsilavec M. *Prunella vulgaris* L. active components and their hypoglycemic and antinociceptive effects in alloxan-induced diabetic mice. *Biomed Pharmacother*. 2016;84:1008-18.
43. Sahin S., Ari F., Demir C., Ulukaya E. Isolation of Major Phenolic Compounds from the Extracts of *Prunella* L. Species Grown in Turkey and Their Antioxidant and Cytotoxic Activities. 2013;38(2):248-57.
44. Şahin S, Tezcan G, Demir C, Tunca B, Çeçener G, Egeli Ü. *Prunella vulgaris* L. ve *Prunella grandiflora* L.'den Saflaştırılan Rozmarinik asit Asitin Farklı Tümör Hücreleri Üzerindeki Sitotoksik Aktvitesi. *Trakya University Journal of Natural Sciences*. 2017.
45. Dar KA, Senthilmurugan S, Ali S, Al-Sadoon MK, Paray BA. Studies on the isolation and identification of the antibacterial compound from *Prunella vulgaris* L. Flower extract. *Journal of King Saud University - Science*. 2022;34(8).
46. Wang SJ, Wang XH, Dai YY, Ma MH, Rahman K, Nian H, et al. *Prunella vulgaris*: A Comprehensive Review of Chemical Constituents, Pharmacological Effects and Clinical Applications. *Curr Pharm Des*. 2019;25(3):359-69.
47. Hu X, Cui S, Chen X, Hu Z. CE with Field-Enhanced Stacking for Rapid and Sensitive Determination of Umbelliferone, Rutin and Aesculetin in *Prunella vulgaris*. *Chromatographia*. 2009;70(11-12):1733-6.
48. Dogan Z. Kutluay VM, Saracoglu I. Self Heal (*P.vulgaris* L.) *in vitro* and *in vivo* Aspects of Anticancer Activity in Different Cancers. *Ancient and Traditional Foods, Plants, Herbs and Spices used in Cancer*. 2023:267-80.
49. ChoonSeok Oh JP, Melinda A Brindley, Mark P Widrlechner, Luping Qu, Joe-Ann McCoy, Patricia Murphy, Cathy Hauck , Maury W. Inhibition of HIV-1 infection by aqueous extracts of *Prunella vulgaris* L. Oh et al *Virology* 2011;8:188.
50. Brindley M. A. WMP, Mccoy J. A., Murphy P., Hauck C., Rizshsky L., et al. Inhibition of Lentivirus Replication by Aqueous Extracts of *Prunella vulgaris*. *Viol*. 2009;6(1):8-13.
51. Feng L, Wang L, Ma YY, Li M, Zhao GQ. A potential *in vitro* and *in vivo* anti-HIV drug screening system for Chinese herbal medicines. *Phytother Res*. 2012;26(6):899-907.
52. Chen Y, Zhang X, Guo Q. A comparison of HIV-1 integrase inhibition by aqueous and methanol extracts of Chinese medicinal herbs. *Life Sciences* 2001; 68: 1687–1694.
53. T.L. Lam MLL, T.K. Au, D.T.M. Ip, T.B. Ng, W.P. Fong, D.C.C. Wan. A comparison of human immunodeficiency virus type-1 protease inhibition activities by the aqueous and methanol extracts of Chinese medicinal herbs. *Life Sciences* 67. 2000:2889–96.

54. Hong-Xi Xu SHSL, Robert L. White C., Jonathan B. Isolation and characterization of an anti-HSV polysaccharide from *Prunella vulgaris*. *Antiviral Research* 44. 1999:43-54.
55. Chi-Ming Chiu L, Zhu W, Eng-Choon Ooi V. A polysaccharide fraction from medicinal herb *Prunella vulgaris* downregulates the expression of herpes simplex virus antigen in Vero cells. *Journal of Ethnopharmacology*. 2004;93(1):63-8.
56. Langston D, L. Sandra, H. Jonathan Acyclovir Topical Therapy of Cutaneous Herpes Simplex Virus Infection in Guinea Pigs. *Arch Dermatol Res*. 2015;116.
57. Li B, Li J, Shi K, Shen Y, Zhu B. Ursolic Acid from *Prunella vulgaris* L. Efficiently Inhibits IHN V Infection *in Vitro* and *in Vivo* . *Virus Res*. 2019 Nov;273:197741.
58. Patel JK, Joshi CK, Sharma MK. *Prunella vulgaris* L. Potentiates Answer to the Emergence of Dreaded Antibiotic Resistance. *Journal of Pure and Applied Microbiology*. 2021;15(3):1429-41.
59. Komal S, Kazmi SAJ, Khan JA, Gilani MM. Antimicrobial activity of *Prunella vulgaris* extracts against multi-drug resistant Escherichia Coli from patients of urinary tract infection. *Pak J Med Sci*. 2018;34(3):616-20.
60. Ohanyan A, Shishkoyan N, Kazaryan S, Hovhannisyan A, Tiratsuyan S, Elbekyan K, et al. Antioxidant and hemolytic properties of different extracts from *Prunella vulgaris* L. leaves. *Medical news of the North Caucasus*. 2018;13(3).
61. Chen Y, Zhang X, Guo Q, Liu L, Li C, Cao L, et al. Effects of UV-B Radiation on the Content of Bioactive Components and the Antioxidant Activity of *Prunella vulgaris* L. Spica during Development. *Molecules*. 2018;23(5) :989.
62. Hwang Y-J, Lee, Eun-Ju, Kim, Haeng-Ran, Hwang, Kyung-A. *In vitro* antioxidant and anticancer effects of solvent fractions from *Prunella vulgaris* var. *lilacina*. *BMC Complementary and Alternative Medicine*. 2013;13:310.
63. Seo J-K, Kang M-J, Shin J-H, Lee S-J, Jeong H-G, Sung N-J, et al. Antibacterial and Antioxidant Activities of Solvent Extracts from Different Parts of Hagocho (*Prunella vulgaris*). *Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition*. 2010;39(10):1425-32.
64. Kupeli Akkol E, Renda G, Ilhan M, Bektas NY. Wound healing acceleration and anti-inflammatory potential of *Prunella vulgaris* L.: From conventional use to preclinical scientific verification. *J Ethnopharmacol*. 2022;295:115411.
65. Min Soo Jun HSK, Young Min Kim, Hye Jung Kim, Eun Jung Park, Jae Heun Lee, Kang Ro Lee, Yeong Shik Kim, Ki Churl Chang. Ethanol Extract of *Prunella vulgaris* var. *lilacina* Inhibits HMGB1 Release by Induction of Heme Oxygenase-1 in LPS-activated RAW 264.7 Cells and CLP-induced Septic Mice. *Phytotherapy Research*. 2012;26(4):605-12.
66. Harput S. Saracoglu İ., Ogihara Y. Effects of two *Prunella* species on lymphocyte proliferation and nitric oxide production. *Phytotherapy Research*. 2006;20(157-159).

67. Lu Jun QR, Ye Song , Yang Mei. *Prunella vulgaris* L. extract improves cellular immunity in MDR-TB challenged rats. *Journal of Medical Colleges of PLA*. 2011;26:230-7.
69. Chen F, Kawashima A, Luo Y, Kiriya M, Suzuki K. Innate Immune-Modulatory Activity of *Prunella vulgaris* in Thyrocytes Functions as a Potential Mechanism for Treating Hashimoto's Thyroiditis. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2020;11:579648.
70. Eun Hee Han JHC, Yong Pil Hwang , Hye Jin Park , Chul Yung Choi , Young Chul Chung , Jong Kwon Seo , Hye Gwang Jeong. Immunostimulatory activity of aqueous extract isolated from *Prunella vulgaris*. *Food and Chemical Toxicology*. 2009;47(1):62-9.
71. Park SJ, Kim DH, Lee IK, Jung WY, Park DH, Kim JM, et al. The ameliorating effect of the extract of the flower of *Prunella vulgaris* var. *lilacina* on drug-induced memory impairments in mice. *Food Chem Toxicol*. 2010;48(6):1671-6.
72. Lee B-H, Lee, Eun Seog Kang, Kye-JungHong, Nam-Doo Screening of the Acetylcholinesterase Inhibitors from Medicinal Plants. *Korean Journal of Pharmacognosy* 1997; 28(4):167-73.
73. Choi D, Min K, Seo H-S, Lee K, Kim M, Jeong H, et al. Anti-oxidative and anti-inflammatory property of ethanol extracts of Chungyu medicines in human neuroblastoma cells, SH-SY5Y. *Oriental Pharmacy and Experimental Medicine*. 2013;13(4):239-45.
74. Zhuo Qu JZ, Honggai Yang , Jing Gao , Hong Chen , Changxiao Liu , Wenyuan Gao *Prunella vulgaris* L., an Edible and Medicinal Plant, Attenuates Scopolamine-Induced Memory Impairment in Rats. 2017;65(2):291-300.
75. Feng LA, Wai Xu, Y. Wang, Shan-Shan Z. Oleanolic acid from *Prunella vulgaris* L. induces SPC-A-1 cell line apoptosis via regulation of Bax, Bad and Bcl-2 expression. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*. 2011;12(2):403-8.
76. Feng L, Jia X, Zhu MM, Chen Y, Shi F. Antioxidant activities of total phenols of *Prunella vulgaris* L. *in vitro* and in tumor-bearing mice. *Molecules*. 2010;15(12):9145-56.
77. Chen C. WG, Zhang M. . The Effects and Mechanism of Action of *Prunella vulgaris* L Extract on Jurkat Human T Lymphoma Cell Proliferation. *Chin - Ger J Clin Oncol*. 2009;8(7):426-9.
78. Woo HJ, Jun do Y, Lee JY, Woo MH, Yang CH, Kim YH. Apoptogenic activity of 2alpha,3alpha-dihydroxyurs-12-ene-28-oic acid from *Prunella vulgaris* var. *lilacina* is mediated via mitochondria-dependent activation of caspase cascade regulated by Bcl-2 in human acute leukemia Jurkat T cells. *J Ethnopharmacol*. 2011;135(3):626-35.
79. Zhao J, Ji D, Zhai X, Zhang L, Luo X, Fu X. Oral Administration of *Prunella vulgaris* L Improves the Effect of Taxane on Preventing the Progression of Breast Cancer and Reduces Its Side Effects. *Front Pharmacol*. 2018;9:806.

80. Lin H. MQ, Lin B. Effect of Common Selfheal for the Treatment of Rats with Bacteritic Vaginitis. . J Shanxi Univ Chin Med 2011;12(1):21-3
81. Y.X. Wang JBY, Q.S. Guo, Y.H. Xiao. Dynamic change in active component content in different parts of *Prunella vulgaris* Chinese Journal of Chinese Materia Medica. 2011;36(6):741-5.
82. M.H. Shyu TCK, G.C. Yen. Oleanolic acid and ursolic acid induce apoptosis in HuH7 human hepatocellular carcinoma cells through a mitochondrial-dependent pathway and downregulation of XIAP Journal of Agricultural and Food Chemistry. 2010;58(10):6110-8.
83. Il Kyun Lee DHK, Seung Young Lee, Kyung Ran Kim, Sang Un Choi, JKH, Jei Hyun Lee ,Young Hyun Park , and Kang Ro Lee. Triterpenic Acids of *Prunella vulgaris* var. *lilacina* and Their Cytotoxic Activities *In Vitro*. Arch Pharm Res. 2008;31(12):1578-83.
84. Qiao Z, Zhou X, JingShuo Z. Effects of triterpenic acid from *Prunella vulgaris* L. on glycemia and pancreas in rat model of streptozotocin diabetes. Institute of Pediatric Medicine, Soochow University 2013.
85. Hwang SM, Kim, Jin Sook Lee, Yun Jung Yoon, Jung Joo Lee, So Min Kang, Dae Gill. Anti-diabetic atherosclerosis effect of *Prunella vulgaris* in db/db mice with type 2 diabetes. American Journal of Chinese Medicine. 2012;40(5):937-51.
86. Psotova J, Svobodova A, Kolarova H, Walterova D. Photoprotective properties of *Prunella vulgaris* and rosmarinic acid on human keratinocytes. J Photochem Photobiol B. 2006;84(3):167-74.
87. iaoyong Sun XC, Shengjun Wang, Jinfeng Zhang, Bin Wu and Guozheng Qin. Protective Effect of Ursolic Acid in *Prunella vulgaris* L. on LPS-Induced Asthenozoospermia via Bcl-2/Bax Apoptosis Signaling Pathway. Current Pharmaceutical Biotechnology. 2021;22(14):1953-9.
88. Ping Li XL, JunrongWang, Chenyang Zhang, Jiahao Zhao & YadongYang. Research on the anti-ageing mechanism of *Prunella vulgaris* L. 2023;13(12).
89. Kim HI, Quan FS, Kim JE, Lee NR, Kim HJ, Jo SJ, et al. Inhibition of estrogen signaling through depletion of estrogen receptor alpha by ursolic acid and betulinic acid from *Prunella vulgaris* var. *lilacina*. Biochem Biophys Res Commun. 2014;451(2):282-7.
90. Saraçoğlu İ., Akdemir Z. Caffeic Acid Oligomers from *Calamintha grandiflora*. Hacettepe University, Journal of Faculty of Pharmacy. 2003;23(1):1-8.
91. Uz A., Demirezer Ö. Phenolic compounds from the roots of *Anchusa azurea* var. *azurea*. Turkish Journal of Pharmaceutical Sciences. . Turkish Journal of Pharmaceutical Sciences. 2013(10):177-84.
92. Dar K. A. SS, Venkatesan A. Antibacterial, Antioxidant Potential and Functional Group Analysis of Kashmir Grown *Prunella Vulgaris* L. Root Extract. Int J Bot Stud 2022;7(1):19-25.

93. Saraçoğlu İ., Harput Ş. *Pinaropappus roseus*'un Flavonoitleri. Hacettepe Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi Dergisi. 1997;17(1):1-8.
94. Harborne JB. The Flavonoids Advances in Research Since 1986. Routledge. 1994:676.
95. Komersová AK, K and Cegan, A. New findings about Ellman's method to determine cholinesterase activity ZEITSCHRIFT FÜR NATURFORSCHUNG C-A JOURNAL OF BIOSCIENCES 2007;62(1):150-4.
96. Ayhan S. *Lavandula stoechas* L. subsp. *stoechas* üzerinde biyolojik aktivite rehberli çalışmalar. . [Doktora Tezi] Ankara: Hacettepe Üniversitesi;. 2023.
97. Ozer Y, Ozen F, Diler Y, Yalcin AD, Atasever-Arslan B. Proteasome modulator 9 (PSMD9) gene rs14259 polymorphism in Alzheimer's disease. Bratisl Lek Listy. 2020;121(5):331-3.
98. Lee S, Lee D, Baek J, Jung EB, Baek JY, Lee IK, et al. *In vitro* assessment of selected Korean plants for antioxidant and antiacetylcholinesterase activities. Pharmaceutical Biology. 2017;55(1):2205-10.
99. Orhan I, Aslan S, Kartal M, Sener B, Husnu Can Baser K. Inhibitory effect of Turkish *Rosmarinus officinalis* L. on acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase enzymes. Food Chem. 2008;108(2):663-8.
100. Chung Y-K, Heo H-J, Kim E-K, Kim H-K, Huh T-L, Lim Y, et al. Inhibitory Effect of Ursolic Acid Purified from *Origanum majorana* L. on the Acetylcholinesterase. Molecules and Cells. 2001;11(2):137-43.
101. Ulubelen A, Topçu G, Özgökçe F, Öztürk M, Hacibekiroğlu I, Kolak U. Antioxidant and anticholinesterase constituents of *Salvia pocalata*. Turkish Journal of Chemistry. 2009; 33 (6) : 813 – 823.
102. Zafar R, Ullah H, Zahoor M, Sadiq A. Isolation of bioactive compounds from *Bergenia ciliata* (haw.) Sternb rhizome and their antioxidant and anticholinesterase activities. BMC Complement Altern Med. 2019;19(1):296.
103. Ma Z, Lu Y, Yang F, Li S, He X, Gao Y, et al. Rosmarinic acid exerts a neuroprotective effect on spinal cord injury by suppressing oxidative stress and inflammation via modulating the Nrf2/HO-1 and TLR4/NF-kappaB pathways. Toxicol Appl Pharmacol. 2020;397:115014.
104. Cui X, Lin Q, Liang Y. Plant-Derived Antioxidants Protect the Nervous System From Aging by Inhibiting Oxidative Stress. Front Aging Neurosci. 2020;12:209.
105. Noguchi-Shinohara M, Ono K, Hamaguchi T, Nagai T, Kobayashi S, Komatsu J, et al. Safety and efficacy of *Melissa officinalis* extract containing rosmarinic acid in the prevention of Alzheimer's disease progression. Scientific Reports. 2020;10(1).
106. Kantar Gok D, Ozturk N, Er H, Aslan M, Demir N, Derin N, et al. Effects of rosmarinic acid on cognitive and biochemical alterations in ovariectomized rats treated with D-galactose. Folia Histochem Cytobiol. 2015;53(4):283-93.

107. Lee AY, Hwang BR, Lee MH, Lee S, Cho EJ. Perilla frutescens var. japonica and rosmarinic acid improve amyloid- β 25-35 induced impairment of cognition and memory function. *Nutr Res Pract*. 2016;10(3):274-81.
108. Alkam T, Nitta A, Mizoguchi H, Itoh A, Nabeshima T. A natural scavenger of peroxynitrites, rosmarinic acid, protects against impairment of memory induced by Abeta(25-35). *Behav Brain Res*. 2007;180(2):139-45.
109. Ghaffari H, Venkataramana M, Jalali Ghassam B, Chandra Nayaka S, Nataraju A, Geetha NP, et al. Rosmarinic acid mediated neuroprotective effects against H₂O₂-induced neuronal cell damage in N2A cells. *Life Sci*. 2014;113(1-2):7-13.
110. Luan H, Kan Z, Xu Y, Lv C, Jiang W. Rosmarinic acid protects against experimental diabetes with cerebral ischemia: relation to inflammation response. *J Neuroinflammation*. 2013;10:28.
111. Li L, Zhang X, Cui L, Wang L, Liu H, Ji H, et al. Ursolic acid promotes the neuroprotection by activating Nrf2 pathway after cerebral ischemia in mice. *Brain Res*. 2013;1497:32-9.
112. Salau VF, Erukainure OL, Ayeni G, Ibeji CU, Islam MS. Modulatory effect of ursolic acid on neurodegenerative activities in oxidative brain injury: An *ex vivo* study. *J Food Biochem*. 2021;45(2):e13597.
113. Nicola MA, Attaai AH, Abdel-Raheem MH, Mohammed AF, Abu-Elhassan YF. Neuroprotective effects of rutin against cuprizone-induced multiple sclerosis in mice. *Inflammopharmacology*. 2024.
114. Celik H, Kandemir FM, Caglayan C, Ozdemir S, Comakli S, Kucukler S, et al. Neuroprotective effect of rutin against colistin-induced oxidative stress, inflammation and apoptosis in rat brain associated with the CREB/BDNF expressions. *Mol Biol Rep*. 2020;47(3):2023-34.

8. EKLER

EK-1: Tez Orjinallik Raporu

Prunella

ORJİNALLİK RAPORU

%9

BENZERLİK ENDEKSİ

%9

İNTERNET KAYNAKLARI

%2

YAYINLAR

%4

ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİBİYEL KAYNAKLAR

1

Submitted to Hacettepe University

Öğrenci Ödevi

%3

2

openaccess.hacettepe.edu.tr

İnternet Kaynağı

%2

3

nek.istanbul.edu.tr:4444

İnternet Kaynağı

%1

4

openaccess.hacettepe.edu.tr:8080

İnternet Kaynağı

%1

5

acikbilim.yok.gov.tr

İnternet Kaynağı

%1

6

www.openaccess.hacettepe.edu.tr:8080

İnternet Kaynağı

%1

7

tez.yok.gov.tr

İnternet Kaynağı

<%1

8

Submitted to Higher Education Commission

Pakistan

Öğrenci Ödevi


<%1

9

Qian Yu, Jin Qi, Lu Wang, Shou-Jin Liu, Bo-Yang Yu. " Pentacyclic Triterpenoids from

<%1

EK-2: Tez Çalışması Dijital Makbuzu




Digital Receipt

This receipt acknowledges that Turnitin received your paper. Below you will find the receipt information regarding your submission.

The first page of your submissions is displayed below.

Submission author:	EDA YALÇIN
Assignment title:	pru
Submission title:	Prunella
File name:	turnitin_tez.docx
File size:	5.25M
Page count:	133
Word count:	21,828
Character count:	140,382
Submission date:	19-May-2024 02:00PM (UTC+0300)
Submission ID:	2383031731



Copyright 2024 Turnitin. All rights reserved.

9. ÖZGEÇMİŞ