



TÜRKİYE CUMHURİYETİ  
DİCLE ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



**GÜNEYDOĞU ANADOLU BÖLGESİNDE YETİŞEN 6 ENDEMİK  
*Salvia* (ADA ÇAYI) TÜRÜNÜN VE ELDE EDİLEN BAZI  
SEKONDER METABOLİTLERİN SİTOTOKSİK ETKİLERİNİN  
VE GEN DÜZEYİNDE ANTİKANSER AKTİVİTELERİNİN  
İNCELENMESİ**

Hilal SARUHAN FİDAN  
YÜKSEK LİSANS TEZİ

BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

DANIŞMAN  
Prof. Dr. Nuriye METE

Bu çalışma Tübitak tarafından desteklenmiştir (Proje No: 114Z801)

DİYARBAKIR- 2019



TÜRKİYE CUMHURİYETİ  
DİCLE ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



ONAY

Dicle Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Biyokimya Anabilim Dalı Yüksek Lisans öğrencisi Hilal SARUHAN FİDAN' ın hazırladığı “Güneydoğu Anadolu Bölgesinde Yetişen 6 Endemik *Salvia* (Ada Çayı) Türünün ve Elde Edilen Bazı Sekonder Metabolitlerin Sitotoksik Etkilerinin ve Gen Düzeyinde Antikanser Aktivitelerinin İncelenmesi” başlıklı tez Dicle Üniversitesi Lisansüstü Eğitim - Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca kapsam ve bilimsel kalite yönünden değerlendirilerek Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tarih: 03/07/2019

Danışman Prof. Dr.Nuriye METE

**Jüri Üyeleri**

Jüri Başkanı Prof. Dr. Nuriye METE

Üye Prof. Dr. Pınar AKSOY SAĞIRLI

Üye Doç. Dr. Gülten TOPRAK

İmza

*N. Mete*  
*Pınar Aksoy Sağırlı*  
*Gülten Toprak*

Bu tez Dicle Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun ....../.../20.. tarih ve .....sayılı kararıyla onaylanmıştır.

...../...../.....

Prof. Dr. Hakkı Murat BİLGİN  
Dicle Üniversitesi  
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü



**TÜRKİYE CUMHURİYETİ  
DİCLE ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**



**BEYAN**

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarımı ihlal edici bir davranışımın olmadığını ve tezimi Dicle Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kılavuzu standartlarına uygun bir şekilde hazırladığımı beyan ederim.

03/07/2019

Hilal SARUHAN FİDAN

## TEŞEKKÜR

Bu tezin hazırlanması için gerekli olanakları sağlayan, tezin her aşamasında değerli fikirleri, bilgi birikimi ve deneyimleriyle yol gösteren Sayın Danışman Hocam Prof. Dr. Nuriye Mete'ye sonsuz teşekkür ederim.

Tez çalışmam sırasında kıymetli bilgi, birikim ve tecrübeleri ile bana yol gösterici ve destek olan ikinci danışman hocam sayın Doç. Dr. Abduselam Ertaş'a, teşekkür ederim.

Laboratuvar çalışmalarım esnasında beni yalnız bırakmayıp her türlü desteği veren değerli hocam Öğr. Gör. Dr. İsmail Yener'e teşekkür ederim.

Tezin her aşamasında, özellikle yapı aydınlatma konusunda tecrübesini ve bilgisini bizden esirgemeyen Sayın Prof. Dr. Ufuk Kolak'a teşekkür ederim. Yine yapı aydınlatma konusunda tecrübesini bizden esirgemeyen ve tezimin bir parçası olduğu 114Z801 nolu projenin Danışmanı olan Prof. Dr. Gülaçtı Topçu'ya teşekkür ederim.

Bitki materyallerini toplama ve teşhis konusunda destek veren Sayın Arş. Gör. Mehmet Fırat'a teşekkür ederim. Çalışmalarım esnasında laboratuvarımı kullandığım, bilgisi ve tecrübesiyle yol gösteren değerli hocam Doç. Dr. Sevgi İrtegin Kandemir'e teşekkür ederim.

Bugünlere gelmemde büyük emeği olan, hayatımın her aşamasında maddi ve manevi desteğini esirgemeyen canım aileme; bu çalışma için beni sürekli teşvik eden, her daim yanımda olan ve desteğini esirgemeyen sevgili eşim Mehmet Fidan'a sonsuz teşekkür ederim.

**Bu çalışma Tübitak tarafından desteklenmiştir (Proje No: 114Z801)**

## İÇİNDEKİLER

BEYAN.....	III
TEŞEKKÜR.....	II
İÇİNDEKİLER.....	III
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	V
RESİM DİZİNİ.....	VIII
TABLolar DİZİNİ.....	IX
KISALTMALAR VE SİMGELER DİZİNİ.....	X
ÖZET.....	1
ABSTRACT.....	3
<b>1. GİRİŞ VE AMAÇ</b> .....	5
<b>2. GENEL BİLGİLER</b> .....	8
2.1. Botanik Bilgiler.....	8
2.1.1. Labiatae (Lamiaceae) familyası.....	8
2.1.2. <i>Salvia</i> L. cinsi.....	8
2.2. <i>Salvia</i> Türlerinin Türkiye’de Etnofarmakognozideki Yeri.....	9
2.3. <i>Salvia</i> Türlerinin Ekonomik ve Tıbbi Önemi.....	11
2.4. <i>Salvia</i> Türlerinde Bulunan Fenolik Asitler.....	12
2.5. <i>Salvia</i> Türlerinde Bulunan Polifenoller.....	13
2.6. Terpenler ve <i>Salvia</i> Türlerinde Bulunan Terpenler.....	14
2.7. <i>Salvia</i> Türleri Üzerinde Yapılmış Biyoaktivite Çalışmaları.....	16
2.8. Sitotoksik Aktivite.....	33
2.8.1. Kanser.....	33
2.8.2. Apoptozis.....	34
2.8.3. MTT ve sitotoksik aktivite.....	34
2.8.4. Western blot.....	37
<b>3. GEREÇ VE YÖNTEM</b> .....	41
3.1. Bitkisel Materyallerin Toplanması ve Teşhis Edilmesi.....	41
3.2. Sitotoksikite Deneyleri.....	46
3.2.1. Hücre seçimi ve kültürü.....	46
3.2.2. Örneklerin hücre proliferasyonu üzerindeki etkilerinin araştırılması.....	46

3.3. Gen Ekspresyonu Çalışmaları .....	47
3.3.1. Western blot için hücrelerin ekimi .....	47
3.3.2. Western blot için hücre lizatlarının hazırlanması .....	47
3.3.3. Western blot için protein örneklerinin jelde ayrımı ve membrana transferi ....	48
<b>4. BULGULAR</b> .....	<b>50</b>
4.1. Sitotoksosite Deneyleri .....	50
4.1.1. Ekstrelerin sitotoksosite sonuçları .....	50
4.2. Saf Maddelerin Antioksidan Aktivite Deneyleri .....	64
4.3. Saf maddelerin antikanser çalışmaları .....	66
4.3.1. Detaylı antikanser çalışmalarda denenen maddelerin seçilme nedenleri .....	68
4.4. Western Blot için Protein Örneklerinin Jelde Ayrımı ve Membrana Transferi ..	69
<b>5. TARTIŞMA</b> .....	<b>73</b>
<b>6. SONUÇ</b> .....	<b>78</b>
<b>7. KAYNAKLAR</b> .....	<b>79</b>
<b>8. ÖZGEÇMİŞ</b> .....	<b>94</b>
<b>9. TEZ ORJİNALLİK RAPORU</b> .....	<b>97</b>

## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. İzoprenoid molekülünün yapısı ve karbon sayısına göre terpenlerin sınıflandırılması .....	15
Şekil 2. Apoptoziste intrinsik ve ekstrinsik yolak .....	34
Şekil 3. MTT'nin Reaksiyon Şeması.....	36
Şekil 4. Western blot yönteminin temelini oluşturan antikor etkileşimlerinin şematik gösterimi.....	38
Şekil 5. Western blot yönteminin bloklama, birincil ve ikincil antikor basamakları .....	39
Şekil 6. Membranın görüntülenmesi .....	40
Şekil 7. <i>S. cerino-pruinosa</i> var. <i>cerino-pruinosa</i> Kloroform Ekstresinin Fibroblast Canlı Hücrelerine Etkisi (48 saat) .....	52
Şekil 8. <i>S. cerino-pruinosa</i> var. <i>cerino-pruinosa</i> Kloroform Ekstresinin Fibroblast Canlı Hücrelerine Etkisi (72 saat) .....	52
Şekil 9. <i>S. cerino-pruinosa</i> var. <i>cerino-pruinosa</i> Kloroform Ekstresinin HT-29 Hücrelerine Etkisi (48 saat) .....	52
Şekil 10. <i>S. cerino-pruinosa</i> var. <i>cerino-pruinosa</i> Kloroform Ekstresinin HT-29 Hücrelerine Etkisi (72 saat) .....	52
Şekil 11. <i>S. cerino-pruinosa</i> var. <i>cerino-pruinosa</i> Kloroform Ekstresinin MCF-7 Hücrelerine Etkisi (48 saat) .....	52
Şekil 12. <i>S. cerino-pruinosa</i> var. <i>cerino-pruinosa</i> Kloroform Ekstresinin MCF-7 Hücrelerine Etkisi (72 saat) .....	52
Şekil 13. <i>S. cerino-pruinosa</i> var. <i>cerino-pruinosa</i> Etanol Ekstresinin Fibroblast Canlı Hücrelerine Etkisi (48 saat) .....	53
Şekil 14. <i>S. cerino-pruinosa</i> var. <i>cerino-pruinosa</i> Etanol Ekstresinin Fibroblast Canlı Hücrelerine Etkisi (72 saat) .....	53
Şekil 15. <i>S. cerino-pruinosa</i> var. <i>cerino-pruinosa</i> Etanol Ekstresinin HT-29 Hücrelerine Etkisi (48 saat) .....	53
Şekil 16. <i>S. cerino-pruinosa</i> var. <i>cerino-pruinosa</i> Etanol Ekstresinin HT-29 Hücrelerine Etkisi (72 saat) .....	53
Şekil 17. <i>S. cerino-pruinosa</i> var. <i>cerino-pruinosa</i> Etanol Ekstresinin MCF-7 Hücrelerine Etkisi (48 saat) .....	53
Şekil 18. <i>S. cerino-pruinosa</i> var. <i>cerino-pruinosa</i> Etanol Ekstresinin MCF-7 Hücrelerine Etkisi (72 saat) .....	53
Şekil 19. <i>S. cerino-pruinosa</i> var. <i>elazigensis</i> Kloroform Ekstresinin Fibroblast Canlı Hücrelerine Etkisi (48 saat) .....	54
Şekil 20. <i>S. cerino-pruinosa</i> var. <i>elazigensis</i> Kloroform Ekstresinin Fibroblast Canlı Hücrelerine Etkisi (72 saat) .....	54
Şekil 21. <i>S. cerino-pruinosa</i> var. <i>elazigensis</i> Kloroform Ekstresinin HT-29 Hücrelerine Etkisi (48 saat) .....	54
Şekil 22. <i>S. cerino-pruinosa</i> var. <i>elazigensis</i> Kloroform Ekstresinin HT-29 Hücrelerine Etkisi (72 saat) .....	54
Şekil 23. <i>S. cerino-pruinosa</i> var. <i>elazigensis</i> Kloroform Ekstresinin MCF-7 Hücrelerine Etkisi (48 saat) .....	54

<b>Şekil 24.</b> <i>S. cerino-pruinosa</i> var. <i>elazigensis</i> Kloroform Ekstresinin MCF-7 Hücrelerine Etkisi (72 saat).....	54
<b>Şekil 25.</b> <i>S. cerino-pruinosa</i> var. <i>elazigensis</i> Etanol Ekstresinin Fibroblast Canlı Hücrelerine Etkisi (48 saat).....	55
<b>Şekil 26.</b> <i>S. cerino-pruinosa</i> var. <i>elazigensis</i> Etanol Ekstresinin Fibroblast Canlı Hücrelerine Etkisi (72 saat).....	55
<b>Şekil 27.</b> <i>S. cerino-pruinosa</i> var. <i>elazigensis</i> Etanol Ekstresinin HT-29 Hücrelerine Etkisi (48 saat).....	55
<b>Şekil 28.</b> <i>S. cerino-pruinosa</i> var. <i>elazigensis</i> Etanol Ekstresinin HT-29 Hücrelerine Etkisi (72 saat).....	55
<b>Şekil 29.</b> <i>S. cerino-pruinosa</i> var. <i>elazigensis</i> Etanol Ekstresinin MCF-7 Hücrelerine Etkisi (48 saat).....	55
<b>Şekil 30.</b> <i>S. cerino-pruinosa</i> var. <i>elazigensis</i> Etanol Ekstresinin MCF-7 Hücrelerine Etkisi (72 saat).....	55
<b>Şekil 31.</b> <i>S. pseudeuphratica</i> Kloroform Ekstresinin Fibroblast Canlı Hücrelerine Etkisi (48 saat).....	56
<b>Şekil 32.</b> <i>S. pseudeuphratica</i> Kloroform Ekstresinin Fibroblast Canlı Hücrelerine Etkisi (72 saat).....	56
<b>Şekil 33.</b> <i>S. pseudeuphratica</i> Kloroform Ekstresinin HT-29 Hücrelerine Etkisi (48 saat).....	56
<b>Şekil 34.</b> <i>S. pseudeuphratica</i> Kloroform Ekstresinin HT-29 Hücrelerine Etkisi (72 saat).....	56
<b>Şekil 35.</b> <i>S. pseudeuphratica</i> Kloroform Ekstresinin MCF-7 Hücrelerine Etkisi (48 saat).....	56
<b>Şekil 36.</b> <i>S. pseudeuphratica</i> Kloroform Ekstresinin MCF-7 Hücrelerine Etkisi (72 saat).....	56
<b>Şekil 37.</b> <i>S. pseudeuphratica</i> Etanol Ekstresinin Fibroblast Canlı Hücrelerine Etkisi (48 saat).....	57
<b>Şekil 38.</b> <i>S. pseudeuphratica</i> Etanol Ekstresinin Fibroblast Canlı Hücrelerine Etkisi (72 saat).....	57
<b>Şekil 39.</b> <i>S. pseudeuphratica</i> Etanol Ekstresinin HT-29 Hücrelerine Etkisi (48 saat).....	57
<b>Şekil 40.</b> <i>S. pseudeuphratica</i> Etanol Ekstresinin HT-29 Hücrelerine Etkisi (72 saat).....	57
<b>Şekil 41.</b> <i>S. pseudeuphratica</i> Etanol Ekstresinin MCF-7 Hücrelerine Etkisi (48 saat).....	57
<b>Şekil 42.</b> <i>S. pseudeuphratica</i> Etanol Ekstresinin MCF-7 Hücrelerine Etkisi (72 saat).....	57
<b>Şekil 43.</b> <i>S. siirtica</i> Kloroform Ekstresinin Fibroblast Canlı Hücrelerine Etkisi (48 saat).....	58
<b>Şekil 44.</b> <i>S. siirtica</i> Kloroform Ekstresinin Fibroblast Canlı Hücrelerine Etkisi (72 saat).....	58
<b>Şekil 45.</b> <i>S. siirtica</i> Kloroform Ekstresinin HT-29 Hücrelerine Etkisi (48 saat).....	58
<b>Şekil 46.</b> <i>S. siirtica</i> Kloroform Ekstresinin HT-29 Hücrelerine Etkisi (72 saat).....	58
<b>Şekil 47.</b> <i>S. siirtica</i> Kloroform Ekstresinin MCF-7 Hücrelerine Etkisi (48 saat).....	58
<b>Şekil 48.</b> <i>S. siirtica</i> Kloroform Ekstresinin MCF-7 Hücrelerine Etkisi (72 saat).....	58
<b>Şekil 49.</b> <i>S. siirtica</i> Etanol Ekstresinin Fibroblast Canlı Hücrelerine Etkisi (48 saat).....	59
<b>Şekil 50.</b> <i>S. siirtica</i> Etanol Ekstresinin Fibroblast Canlı Hücrelerine Etkisi (48 saat).....	59
<b>Şekil 51.</b> <i>S. siirtica</i> Etanol Ekstresinin HT-29 Hücrelerine Etkisi (48 saat).....	59



<b>Şekil 52.</b> <i>S. siirtica</i> Etanol Ekstresinin HT-29 Hücrelerine Etkisi (72 saat) .....	59
<b>Şekil 53.</b> <i>S. siirtica</i> Etanol Ekstresinin MCF-7 Hücrelerine Etkisi (48 saat) .....	59
<b>Şekil 54.</b> <i>S. siirtica</i> Etanol Ekstresinin MCF-7 Hücrelerine Etkisi (72 saat) .....	59
<b>Şekil 55.</b> <i>S. rosifolia</i> Kloroform Ekstresinin Fibroblast Canlı Hücrelerine Etkisi (48 saat).....	60
<b>Şekil 56.</b> <i>S. rosifolia</i> Kloroform Ekstresinin Fibroblast Canlı Hücrelerine etkisi (72 saat).....	60
<b>Şekil 57.</b> <i>S. rosifolia</i> Kloroform Ekstresinin HT-29 Hücrelerine Etkisi (48 saat).....	60
<b>Şekil 58.</b> <i>S. rosifolia</i> Kloroform Ekstresinin HT-29 Hücrelerine Etkisi (72 saat).....	60
<b>Şekil 59.</b> <i>S. rosifolia</i> Kloroform Ekstresinin MCF-7 Hücrelerine Etkisi (48 saat).....	60
<b>Şekil 60.</b> <i>S. rosifolia</i> Kloroform Ekstresinin MCF-7 Hücrelerine Etkisi (72 saat).....	60
<b>Şekil 61.</b> <i>S. rosifolia</i> Etanol Ekstresinin Fibroblast Canlı Hücrelerine Etkisi (48 saat).....	61
<b>Şekil 62.</b> <i>S. rosifolia</i> Etanol Ekstresinin Fibroblast Canlı Hücrelerine Etkisi (72 saat).....	61
<b>Şekil 63.</b> <i>S. rosifolia</i> Etanol Ekstresinin HT-29 Hücrelerine Etkisi (48 saat) .....	61
<b>Şekil 64.</b> <i>S. rosifolia</i> Etanol Ekstresinin HT-29 Hücrelerine Etkisi (72 saat) .....	61
<b>Şekil 65.</b> <i>S. rosifolia</i> Etanol Ekstresinin MCF-7 Hücrelerine Etkisi (48 saat) .....	61
<b>Şekil 66.</b> <i>S. rosifolia</i> Etanol Ekstresinin MCF-7 Hücrelerine Etkisi (72 saat) .....	61
<b>Şekil 67.</b> <i>S. kurdica</i> Kloroform Ekstresinin Fibroblast Canlı Hücrelerine Etkisi (48 saat).....	62
<b>Şekil 68.</b> <i>S. kurdica</i> Kloroform Ekstresinin Fibroblast Canlı Hücrelerine Etkisi (72 saat).....	62
<b>Şekil 69.</b> <i>S. kurdica</i> Kloroform Ekstresinin HT-29 Hücrelerine Etkisi (48 saat) .....	62
<b>Şekil 70.</b> <i>S. kurdica</i> Kloroform Ekstresinin HT-29 Hücrelerine Etkisi (72 saat) .....	62
<b>Şekil 71.</b> <i>S. kurdica</i> Kloroform Ekstresinin MCF-7 Hücrelerine Etkisi (48 saat) .....	62
<b>Şekil 72.</b> <i>S. kurdica</i> Kloroform Ekstresinin MCF-7 Hücrelerine Etkisi (72 saat) .....	62
<b>Şekil 73.</b> <i>S. kurdica</i> Etanol Ekstresinin Fibroblast Canlı Hücrelerine Etkisi (48 saat).....	63
<b>Şekil 74.</b> <i>S. kurdica</i> Etanol Ekstresinin Fibroblast Canlı Hücrelerine Etkisi (72 saat).....	63
<b>Şekil 75.</b> <i>S. kurdica</i> Etanol Ekstresinin HT-29 Hücrelerine Etkisi (48 saat) .....	63
<b>Şekil 76.</b> <i>S. kurdica</i> Etanol Ekstresinin HT-29 Hücrelerine Etkisi (72 saat) .....	63
<b>Şekil 77.</b> <i>S. kurdica</i> Etanol Ekstresinin MCF-7 Hücrelerine Etkisi (48 saat) .....	63
<b>Şekil 78.</b> <i>S. kurdica</i> Etanol Ekstresinin MCF-7 Hücrelerine Etkisi (72 saat) .....	63
<b>Şekil 79.</b> Bazı Saf Maddelerin HT-29 Hücrelerinde Bax Ekspresyonu .....	70
<b>Şekil 80.</b> Bazı Saf Maddelerin PDF Hücrelerinde Bax ve Bcl-2 Ekspresyonu .....	71
<b>Şekil 81.</b> Bazı Saf Maddelerin MCF-7 Hücrelerinde Bax ve Bcl-2 Ekspresyonu .....	72

## RESİM DİZİNİ

<b>Resim 1.</b> Toplanan <i>Salvia</i> türlerinin fotoğrafları .....	45
--	----



## TABLULAR DİZİNİ

<b>Tablo 1.</b> Çalışılan <i>Salvia</i> Türleri, Toplanma Yerleri ve Herbaryum Numaraları .....	43
<b>Tablo 2.</b> Elde Edilen ve Yapısı Aydınlatılan Bileşiklerin Antioksidan Aktiviteleri..	64
<b>Tablo 3.</b> Elde Edilen ve Yapısı Aydınlatılan Bileşiklerin 3 Hücre Serisine Karşı Sitotoksik Aktiviteleri .....	66



## KISALTMALAR VE SİMGELER DİZİNİ

ABTS	: 2,2'-Azinobis (3-etilbenzotrazolin-6-sülfonat)
AChE	: Asetilkolinesteraz enzimi
BChE	: Butirilkolinesteraz enzimi
BHA	: Bütillenmiş hidroksi anisol
BHT	: Bütillenmiş hidroksi toluen
°C	: Santigrat derece
CO <sub>2</sub>	: Karbondioksit
CUPRAC	: Bakır (II) iyonu indirgeme antioksidan kapasitesi
dk	: Dakika
DMEM	: Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	: Dimetilsülfoksit
DPPH	: 1,1-Difenil-2-pikrilhidrazil
EC <sub>50</sub>	: Yarı azami etkili konsantrasyon
FBS	: Fetal sığır serumu
FRAP	: Demir (III) indirgeme antioksidan gücü
g	: Gram
HPLC	: Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi
IC <sub>50</sub>	: Yarı maksimum inhibisyon konsantrasyonu
kg	: Kilogram
m	: Metre
mg	: Miligram
mL	: Mililitre
mM	: Milimolar
MTT	: 3-(4,5-dimetil-tiyazolil)-2,5-difeniltetrazolyum-bromid
nm	: Nanometre
NMR	: Nükleer magnetik rezonans
PBS	: Fosfat Tamponlu Tuz Çözeltisi
ppm	: Milyonda bir kısım
µg	: Mikrogram
µL	: Mikrolitre

# **Güneydoğu Anadolu Bölgesinde Yetişen 6 Endemik *Salvia* (Ada Çayı) Türünün ve Elde Edilen Bazı Sekonder Metabolitlerin Sitotoksik Etkilerinin ve Gen Düzeyinde Antikanser Aktivitelerinin İncelenmesi**

**Öğrencinin Adı ve Soyadı:** Hilal SARUHAN FİDAN

**Danışmanı:** Prof. Dr. Nuriye METE

**Anabilim Dalı:** Biyokimya

## **1.1. ÖZET**

**Amaç:** Dünya üzerindeki yıllık ölümlerin yaklaşık %2 ile %3'ünün kanserden kaynaklandığı ve yılda yaklaşık 3.5 milyon insanın kanser nedeniyle öldüğü bildirilmiştir. *Salvia* türlerinden hazırlanan ekstraların çok sayıda kanserli hücreye karşı aktivite gösterdiği de bilinmektedir. Bu çerçevede, 6 endemik *Salvia* türünden elde edilen 12 ekstre ile saflaştırılan sekonder metabolitlerin sitotoksik etkileri ve gen düzeyinde antikanser aktivitelerinin incelenmesi amaçlandı.

**Gereç ve Yöntem:** Hücre canlılığı ve apoptozis üzerindeki etkileri yaygın iki farklı kanserli hücre serisi ve sağlıklı bir hücre serisi üzerinde (MCF-7, HT-29 ve PDF) araştırıldı. Hücre canlılığı MTT hücre proliferasyon kiti kullanılarak ölçüldü. Örneklerin apoptozis genlerinin (Bax ve Bcl-2) ekspresyonu üzerindeki etkileri Western Blot yöntemi kullanılarak ölçüldü.

**Bulgular:** Çalışılan 12 ekstrenin ancak yüksek konsantrasyonlarda HT-29 ve MCF-7 hücre serilerine karşı sitotoksik etki gösterdiği belirlendi. Ancak bu konsantrasyonlarda sağlıklı fibroblast hücre serisine karşı da toksik etki gösterdiği belirlendi. Ekstrelerin aksine izole edilen bazı maddelerin oldukça sitotoksik potansiyele sahip olduğu belirlendi. Elde edilen diterpen yapısındaki 6,7-dehidroroyleanon, asetil royleanon, ferruginol, inuroyleanol, 12-demetilmultikaulin, 12-hidroksi abieta-1,3,5(10),8,11,13-hekzan ve triterpen yapısındaki 4 yeni bileşiğin (21 $\alpha$ -hidroksi-2 $\alpha$ ,3 $\beta$ -diasetoksi urs-9(11),12-dien, 3 $\beta$ -hidroksi-2 $\alpha$ -asetoksi urs-9(11),12-dien, 2 $\alpha$ ,3 $\beta$ ,21 $\alpha$ -trihidroksi urs-9(11),12-dien, 1 $\alpha$ ,21 $\alpha$ -dihidroksi-2,3-(1',1'-dimetil-dioksimetilen) urs-9(11),12-dien) oldukça yüksek bir sitotoksik potansiyele sahip olduğu tespit edildi.

**Sonuç:** Sonuç olarak 6 endemik *Salvia* türü ilk defa tarafımızdan detaylı bir şekilde kimyasal ve biyolojik yönden incelendi. Ülkemizin zenginliklerinden olan *Salvia* türleri ile yapılacak diğer kimyasal ve biyolojik aktivite çalışmalarına bu tez sonuçları önemli katkı sağlayacaktır.

**Anahtar Sözcükler:** Anti-Bax ve Bcl-2 Genleri, Antikanser, PDF / MCF-7 ve HT-29 Hücre Serileri, *Salvia*, Sitotoksik Aktivite

**Bu çalışma, TÜBİTAK tarafından desteklenmiştir (Proje No: 114Z801)**



## **Investigation of cytotoxic effects and anticancer activities at the level of gene of endemic 6 *Salvia* species growing in southeastern anatolia region and some secondary metabolites obtained**

**Surname and Name:** SARUHAN FİDAN Hilal

**Adviser of Thesis:** METE Nuriye

**Department:** Biochemistry

### **1.2. ABSTRACT**

**Aim:** It has been reported that approximately 2% to 3% of annual deaths in the world are caused by cancer and approximately 3.5 million people die from cancer annually. It is also known that extracts from *Salvia* species show activity against a large number of cancer cells. In this context, we aimed to investigate the cytotoxic effects and the anticancer activity at the gene level of secondary metabolites which purified and 12 extracts from 6 endemic *Salvia* species.

**Materials and Methods:** The effects on cell viability and apoptosis were investigated on two different cancer cell lines and a healthy cell line (MCF-7, HT-29 and PDF). Cell viability was measured using the MTT cell proliferation kit. The effects of the samples on the expression of apoptosis genes (Bax and Bcl-2) were measured using the Western Blot method.

**Results:** It was determined that 12 extracts which studied showed cytotoxic effects against HT-29 and MCF-7 cell lines only at high concentrations. However, these concentrations were also found to be toxic against healthy fibroblast cell line. In contrast to the extracts, some of the isolated substances were found to have highly cytotoxic potential. It was determined that the compounds which obtained in the diterpene structure (6,7-dehydroroleanone, acetyl royleanone, ferruginol, inuroyleanol, 12-demethylmultikaulin, 12-hydroxy abieta-1,3,5(10),8,11,13-hekzan) and 4 new compounds (21 $\alpha$ -hydroxy-2 $\alpha$ ,3 $\beta$ -diacetoxy-urs-9(11),12-diene, 3 $\beta$ -hydroxy-2 $\alpha$ -acetoxy-urs-9 (11),12-diene, 2 $\alpha$ ,3 $\beta$ ,21 $\alpha$ -trihydroxy-urs-9(11),12-diene and 1 $\alpha$ ,21 $\alpha$ -dihydroxy-2,3-(1,1-dimethyl-dioximethylene)-urs-9(11),12-diene) in the structure of the triterpene were found to have quite high cytotoxic potential.

**Conclusion:** As a result, 6 endemic *Salvia* species were examined for the first time in detail in terms of chemical and biological aspects. The results of this thesis will

contribute significantly to the other chemical and biological activity studies to be carried out with the *Salvia* species which are one of the richness of our country.

**Key words:** Anti-Bax and Bcl-2 genes, Anticancer, Cytotoxic activities, PDF / MCF-7 and HT-29 cell lines, *Salvia*

**This study was supported by TUBITAK (Project No: 114Z801)**





## 1. GİRİŞ VE AMAÇ

Kanser; hücre çoğalması ve hücre ölümü arasındaki dengenin aşırı hücre proliferasyonu ya da azalmış apoptozis nedeniyle bozulması sonucu meydana gelen patolojik bir durumdur. Kanser oluşum sürecinde baskılanmış ya da azalmış apoptozisin önemli rol oynadığı bildirilmektedir (1).

Amerikan Kanser Derneği verilerine bakıldığında, dünyadaki yıllık ölümlerin yaklaşık %2'sinin ve %3'ünün kanserden kaynaklandığı ve yılda yaklaşık 3.5 milyon insanın kanserden öldüğü görülmektedir (2).

Her yıl milyonlarca insana kanser teşhisi konulmaktadır. Son on yıl boyunca, yeni kanser teşhis oranları erkeklerde yılda yaklaşık %2 oranında azalmış ve kadınlarda da aynı kalmıştır. 2018 için her gün 4.700'den fazla yeni kanser tanısı konulduğu tahmin edilmektedir. Yaşam boyu kanser teşhisi olasılığı erkekler için %39.7, kadınlar için %37.6'dır. Erkeklerde teşhis edilecek en yaygın kanserler prostat kanseri olup tüm vakaların %42'sini oluşturan prostat, akciğer ve kolorektal kanserlerdir. Kadınlarda ise teşhis edilecek en yaygın kanserler, tüm olguların yarısını temsil eden göğüs, akciğer ve kolorektal kanserlerdir (3).

Günümüzde kanser tedavisi için sıklıkla kullanılan yöntemlerin başında kemoterapi gelmektedir. Kemoterapötik ilaçların kanser hücrelerinin çoğalmasını önlemesinde temel olarak iki mekanizma önerilmektedir. Bunlar; hücre büyümesinin durdurulması ya da apoptozisin aktiflenmesidir. Hücre döngüsünün durdurulması kanser hücrelerinin yok edilmesinde etkili bir stratejidir. Apoptozis ise intrinsek ve ekstrinsek sinyal yollarındaki faktörlerin etkisi ile düzenlenmektedir (4). Son yıllarda antikanser ilaçlara direnç gelişmesi ve bu ilaçların kronik kullanımının normal hücrelerde de toksisite göstermesi nedeniyle yeni nesil antikanser ajanlar geliştirmek oldukça popüler bir araştırma alanı olmuştur. Bu amaçla hem sentetik, hem de doğal ürünler yeni nesil antikanser ajan araştırmalarında *in vivo* ve *in vitro* çalışmalarda denenmektedirler (5). Bitkiler asırlar boyunca insan ve hayvan hastalıklarıyla mücadelede kullanılmışlardır. Bugün klinikte kanser hücrelerinin çoğalmasını baskılamada kullanılan modern ilaçların yaklaşık %50'si doğal ürünlerden elde edilmektedir (6). Bu yüzden doğal ürünler potansiyel ilaç ham maddeleri olarak görülmektedir (1).

*Salvia* L. (Lamiaceae) türlerinin eski çağlardan günümüze kadar çeşitli amaçlarla halk arasında kullanıldığı bilinmektedir. Özellikle boğaz ağrısı ve soğuk algınlığında, bazı kanserleri tedavi etmede ve bazı kalp hastalıklarını tedavide kullanıldığı bilinmektedir (7, 8).

*Salvia* türlerinin ekstre ve saf bileşikleri bazında çok sayıda sitotoksikite çalışması mevcut iken (9-11) sadece bir kaç *Salvia* türünün ana bileşenlerinin antikanser (gen düzeyinde) etkilerine bakılmıştır. *Salvia* türlerinden elde edilen sekonder metabolitlerin antienflamatuar, hepatotoksik, sitosoksik/antitümör, antikanser, antioksidan gibi pek çok aktiviteye sahip olduğu bilinmektedir (12-15). Son ve arkadaşlarının (16) yaptığı bir çalışmada *Salvia* türlerinden de elde edilen fenol halkası içeren bir diterpen olan ferruginol bileşiğinin meme, kolon ve akciğer kanserine karşı etkili olduğu saptanmıştır. Geleneksel Çin tıbbında çok yaygın kullanılan *S. miltiorrhiza* türünden elde edilen tanshinon bileşiğinin çok sayıda farmakolojik etkiye sahip olduğu bilinmektedir (17). Tanshinon bileşiği yaygın olarak kronik kalp rahatsızlıklarında ve inflammatuar hastalıklarda kullanılmaktadır. Buna ilaveten karaciğeri koruma ve antioksidan etkilere sahiptir (18). *S. miltiorrhiza* türünün ana bileşenlerinden olan tanshinon IIA bileşiğinin de farmakolojik etkileri ile ilgili çok sayıda çalışma yapılmıştır. İlginç bir şekilde bu bileşiğin çeşitli biyolojik aktivitelerinin yanı sıra son bulgular bu bileşiğin aynı zamanda lösemi, karaciğer kanseri ve özellikle meme kanseri (MCF-7, MDA-MB-231, SKBR3 ve MDA-MB-453 meme kanseri hücre serileri) dahil olmak üzere birçok kanser hücresine karşı antikanser etki gösterdiği bulunmuştur (19-21). Yine bu türden elde edilen tanshinon I, tanshinon IIB, dihidrotanshinon ve kriptotanshinon gibi bileşiklerin kardiyovasküler koruyucu etkileri yaygın olarak incelenmiş ve özetlenmiştir (7, 22). Ancak, antikanser potansiyelleri son yıllarda çalışılmaya başlanmış ve birçok kanserli hücreye karşı etkili oldukları bulunmuştur (23, 24). Tayarani-Najaran ve arkadaşlarının (25) yaptığı başka bir çalışmada *S. chorassanica*'dan elde edilen taksodion, ferruginol ve 6-hidroksisalvinolon bileşiklerinin lösemi kanser hücrelerine karşı sitotoksik ve apoptotik etkinliği olduğu bulunmuştur.

Dünya literatüründe birkaç *Salvia* türünden elde edilen saf bileşiklerin gen ekspresyonu düzeyinde antikanser etkileri incelenmiş ve *Salvia* türlerinin antikanser terapötikleri bakımından kaynak olabileceği ortaya konmuştur. Buna karşın endemik

*Salvia* türleri bakımından zengin olan ülkemizde ise ekstre bazında kalan birkaç çalışma dışında bu türlerden elde edilen saf bileşiklerin gen düzeyinde antikanser çalışmaları yoktur. Yukarıdaki literatür verileri ışığında yurt dışı çalışmalarında son yıllarda *Salvia* türlerinin çeşitli iskelet yapısına sahip bileşikleri nedeniyle kansere karşı etkili olabileceği (gen düzeyinde) çalışmalara konu olmakta ve bunun ortaya konmasına çalışılmaktadır. Literatürde Dünyadaki çalışmaların aksine bildiğimiz kadarıyla Türkiye’de *Salvia* türlerinin sekonder metabolitlerinin gen ekspresyonu düzeyinde antikanser etkileri ile ilgili çalışma olmaması bizim bu konu üzerine odaklanmamıza neden olmuştur.

Bitki kimyası çalışmalarında gen ekspresyonu düzeyinde antikanser çalışmaları Türkiye’de az bir yol almış olmakla birlikte, bu daha çok ekstre bazında kalmaktadır. Yani daha çok belli ekstrelerin antikanser aktivitesini taramaktan ibarettir, tabii ki işin bu kısmı da belli bir aktivite için taranan bitkinin aktivite potansiyelini belirlemek bakımından önemlidir, ama aktiviteden sorumlu saf bileşiklerin saptanması ve yapı-aktivite ilişkisinin belirlenmesi çok daha önemlidir. Dolayısıyla bu tez çalışmasındaki amacımız endemik 6 *Salvia* türünden elde edilecek ekstre ve bileşiklerin hücre canlılığı ve apoptozis gen ekspresyonu üzerindeki etkilerini yaygın iki farklı kanserli hücre serisinde (meme MCF-7 ve kolon HT-29 kanseri hücre serisi) araştırmak ve potansiyel kanser terapötiklerini ortaya koymaktır.

Bu tez kapsamında, 6 endemik *Salvia* türünden elde edilen 12 ekstre ile saflaştırılan 52 sekonder metabolitin sitotoksik etkileri ve gen düzeyinde antikanser aktiviteleri incelendi. Hücre canlılığı ve apoptozis üzerindeki etkileri yaygın iki farklı kanserli hücre serisinde (MCF-7 ve HT-29) araştırıldı. Hücre canlılığı MTT hücre proliferasyon kiti kullanılarak ölçüldü. Örneklerin apoptozis genlerinin (Bax ve Bcl-2) ekspresyonu üzerindeki etkileri Western Blot yöntemi kullanılarak ölçüldü. Böylece, *Salvia* türlerinin sekonder metabolitlerinden antikanser etkileri olanların yapılarının belirlenmesiyle potansiyel kanser terapötiklerinin geliştirilmesine olanak sağlanmış olabilecektir.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Botanik Bilgiler

#### 2.1.1. Labiatae (Lamiaceae) familyası

Bu familya ilk olarak 1789 yılında De Jussieu tarafından Labiatae olarak adlandırılmıştır. Sonrasında ise 1836 yılında Lindley tarafından Lamiaceae olarak tekrardan adlandırılmıştır (26, 27). Dünyanın bilinen büyük ve eski familyalarındandır. Familyayla ilgili fosil kayıtları bulunmamasına rağmen, kökeninin Oligosen'e veya 70-90 milyon yıl öncesine kadar dayandığını söylemek mümkündür (28, 29). Lamiaceae (ballıbabagiller), tek veya çok yıllık, otsular, nadiren çalılar veya ağaçları kapsamakta olan genellikle güzel kokulu çiçekli bitkilerin familyası olarak bilinmektedir. Lamiaceae familyasını önemli kılan özellik, tıpta ve parfümeride kullanılmakta olan birçok uçucu yağı bu familyanın içeriyor olmasıdır.

Kokulu yağ salgılayan küçük salgı bezlerinin yapraklarında bulunduğu tespit edilmiştir. Karakteristik olan salgı tüyleri sekiz hücreli pul şeklindedir (30). Gövdelerinin ise genellikle 4 köşesi bulunmaktadır. Yapraklarının dizilişi dekusat şeklindedir. Çiçeklerin durumu vertisillastrumdur. Çoğunlukla korolla iki dudaklı şeklindedir. Stamenler 4 yahut 2 adettir. Meyve 4 nuksa yarılmış şizokarptır (31, 32). Yeryüzünde Lamiaceae familyasının 250 kadar cinsi ve 3200'ü aşkın türü bulunmaktadır. Türkiye'deki en zengin üçüncü familya olan Lamiaceae familyasının ülkemizdeki endemizm oranı %45 olarak tespit edilmiştir. Lamiaceae familyası topraklarımızda 46 cins ve 758 takson ile temsil edilmektedir (33).

#### 2.1.2. *Salvia* L. cinsi

Labiatae familyasında yer almakta olan *Salvia* cinsi Mentheae takımının Nepetoideae alt familyasında bulunmaktadır. *Salvia* cinsi Türkiye de %50 si endemik 100 tür ile temsil edilmektedir (34, 35). Çoğu *Salvia* türü uçucu yağ açısından değerlendirildiğinde az ya da çok etkin kabul edilebilmektedir (%0,1-1,0). *Salvia* cinsi uzun yıllardan bu yana halk arasında tedavi amacıyla kullanılmaktadır (36).

*Salvia* kelimesi Latince'de sağlık anlamına gelir ve 10. yüzyılda Arap toplumuna mensup olan hekimler adaçayının dünya üzerinde meydana gelmekte olan ölümlere

karşı kesin bir çözüm sunacağına inanmışlardır. Çoğu hastalığın tedavisinde örneğin göz problemlerinde, yılan ısırmasında, menstrual dönem dışı kanamalarında, kısırlıkta, zehirlenmede, enfeksiyon hastalıklarında, epilepside, Alzheimer hastalarındaki unutkanlık sorunlarına, bağırsak problemlerine eski çağlardan bu yana halk arasında adaçayı ile çözüm aranmıştır. Eski çağlardan bu yana Yerli Amerikalılar tarafından adaçayına kutsiyet atfedilmiştir. Günümüzde ise çay formunda ve bazı ilaç firmalarının üretmekte olduğu kapsül formunda tıbbi amaçlı olarak kullanılmaktadır (37).

## 2.2. *Salvia* Türlerinin Türkiye’de Etnofarmakognozideki Yeri

*S. aethiopsis* L. (Yünlü adaçayı): Türkiye’de yaygın bir tür olarak bulunmaktadır. Bu bitkinin yaprak ve çiçek durumları ise uyarıcı ve midevi olarak antik çağlardan bu yana bilinmektedir (38). Bolu: Yukarısayık, Dörtdivan yöresinde Kızıllıkadı ile bilinmekte ve merhem olarak yaraları iyileştirici olarak kullanılmaktadır (39-41). *S. aramiensis* Rech fil. (Dağçayı): Çay halinde Hatay yöresinde midevi amaçlı kullanılmaktadır (42).

*S. aucheri* Bentham var. *canescens* Boiss. et Heldr. (Zeytin yapraklı adaçayı): Çay halinde Mersin civarında kullanılmaktadır (8).

*S. chrysophylla* Stapf: Isparta’nın Sütçüler Beydili yöresinde Bozçavla adıyla bilinmekte olup herbası dekoksion halinde romatizma hastalığına karşı kullanılmaktadır. Lapa şekline getirilen herbası ağrı yapan vücudun kısımlarına uygulanmaktadır (40, 41).

*S. tanşinonptantha* Montbert et Aucher ex Bentham (Van’da karaot, diğer isimleri kara şalba, kara şapla, kara şalva): Yurdumuzun doğusunda bitkinin yaprakları tekstilde boyama amacıyla kullanılmaktadır (42). Afyonkarahisar, Şuhut, Karacaören yöresinde yakışalbası adıyla bilinmekte olup infüzyon halinde mide rahatsızlıklarında ve dekoksion halinde yara antiseptiği olarak kullanılmaktadır (43). Yaprakları ve çiçekli dalları Orta Anadolu bölgesinde çay olarak kullanılmaktadır (41, 42).

*S. dichroantha* Stapf: Kayseri, Develi, Büyükkünye yöresinde yağlıkara ve kutnu adlarıyla bilinmekte olup karın ve mide ağrıları için karşı çay şeklinde içilir.

(8). Niğde bölgesinde yaprak kısmı çıbanların ve haricen yaraların tedavisinde kullanılmaktadır (38, 41).

*S. forskahlei* L. (Şalba): Çayı hazırlanarak kullanılmaktadır (8).

*S. fruticosa* Miller (Syn. *S. triloba*): Elma çalbası, adaçayı, Anadolu adaçayı, boz şalba, boz şapla adlarıyla bilinir. Anadolu'nun güneybatısında doğal bir şekilde yetişmektedir. Yapraklarının çayı hazırlanarak tüketilmektedir. Yaprakları sayesinde üretilen uçucu yağına "elmayağı" denmekte olup ve ihraç edilmektedir (8). Gargara ve çay olarak solunum yolları için antiseptik özelliği bulunmasından dolayı kullanılır ve yaralara iyi gelmektedir (42). Bebeklerde kabızlık probleminde karşı emzirilmeden önce meme ucuna sürülerek kullanılabilir. Muğla yöresinde adı 'Almiya Çalbası'dır (41, 43).

*S. grandiflora*: Dişleri kuvvetlendirdiği için kullanılıp Afyonkarahisar'da adı Ada Çayı'dır (43).

*S. multicaulis* Vahl (Kürt reyhanı): Yurdumuzun doğusunda bulunan bölgelerde yaralar için kullanılır (40) koku verdiği için de tütüne konulur (8, 41).

*S. nemorosa* L. (Kara ot, şalba): Erzurum yöresinde gemdaş adıyla bilinip kesiklerde kanı durdurmak amacıyla herba tozu olarak kullanılmakta olup; gemtaş adıyla Artvin yöresinde de bilinmektedir (39, 40).

*S. sclarea* L. (Ayıkulağı, misk adaçayı, tüylü adaçayı): Yaprakları ve çiçekli dalları kabız, midevi, yatıştırıcı ve terlemeyi azaltıcı, infüzyon (%5) şeklinde kullanılmaktadır (8, 38). Parfümeride, elde edilen uçucu yağı kullanılmaktadır (44). Isparta yöresinde özellikle güneş çarpmalarında kullanılmakta olup dişi sığır kuyruğu olarak adlandırılmıştır (45). Mersin'de ise bitkinin çiçekleri infüzyon haline getirilip siğiller için kullanılmakta olup bölgede paskulak adıyla bilinmektedir (45, 46).

*S. tomentosa* Miller (Büyük çiçekli adaçayı): Bitkinin yaprak kısmı tıbbi adaçayı yaprağı yerine alternatif olarak kullanılmaktadır. Aynı zamanda *S. fruticosa* Miller türü gibi kullanılmaktadır (8). Dekoksasyon veya infüzyon halinde çay olarak, aç karnına içilmektedir. Bilecik, Söğüt bölgesinde Şabla adıyla bilinmekte olup romatizma ağrıları için banyo suyuna katılmak suretiyle kullanılmaktadır. Afyon bölgesinde ise çay haline getirilerek karın ağrısı için kullanılır (41, 43, 47).

*S. verbenaca* L. (Yabani adaçayı): Yaprakları Misk adaçayı olarak kullanılmakla birlikte koku ve etkisi zayıftır. Tohumlarından üretilen müsülaj özellikle Doğu ülkelerinde göz hastalıkları için kullanılmaktadır (8).

*S. verticillata* L.: Erzurum bölgesinde dadırak adıyla, İkizdere-Rize'de ise kara ot adıyla bilinmektedir (8). Bitlis, Sibek, Arıdağ coğrafyasında da hart adıyla bilinmekte olup dekoksion şeklinde soğuk algınlığında ve nezle olunması durumunda kullanılmaktadır (40, 41, 48).

*S. virgata* Jacq.: Yılcık adıyla da bilinmektedir (8). Yapraklar özellikle haricen yaralar için iyileştirici olarak kullanılmaktadır (38).

*S. viridis* L. (Syn. *S. horminum* L.) (Yeşil adaçayı, adaçayı): Kullanış şekli misk adaçayına benzerdir (38, 41).

### **2.3. *Salvia* Türlerinin Ekonomik ve Tıbbi Önemi**

Lamiaceae üyeleri içerdikleri aromatik ve uçucu yağlardan dolayı farmakolojide ve parfümeride kullanılmaktadırlar. Bundan kaynaklı olarak tıbbi ve ekonomik açıdan büyük öneme sahiptirler (49).

Biyolojik aktif bileşenlerini belirleyebilmek amacıyla yapılan çok sayıda farmakolojik çalışma bulunmaktadır. İncelenen türlerin biyolojik aktivite bakımından antimikrobiyal, antiviral, antitümör, antioksidan, antiperspiran aktivite içermekte olduğu ve bilhassa zihinsel, sinirsel ve gastrointestinal hastalıkların tedavisi için kullanılmakta olduğu belirlenmiştir (50, 51). Bitki merkezli antimikrobiyal ajanlar önemli ölçüde iyileştirici özelliğe sahip bulunmaktadır. Enfeksiyona bağlı rahatsızlıkların tedavisi için kullanılan bileşikler antimikrobiyal etkiden ötürü kullanıldıklarında, birçok enfekte olmuş alan için eş zamanlı olarak enfeksiyon hafiflemektedir (52).

Antibiyotiklerin keşfedildiği güne değin *Salvia*, bitki çayı içinde sıkça yer almakta olup, tüberküloz hastaları için kronik bronşitin tedavisi için ve terlemeyi önleyici olarak tavsiye edilmiştir. Bunun yanında romatizma, terleme, ateş, seksüel zayıflık, sinirsel ve zihinsel rahatsızlıklar için tedavi etmek amaçlı ve bunların dışında böceklere karşı kullanılırdı (53).

Günümüzde antibiyotik kullanımının artıyor olması ve düzensiz bir şekilde tüketiliyor olması bakterilerin antibiyotiklere karşı direnç geliştirmesine yol açmıştır. Oluşan bu mevcut durum bilim camiasını farklı antibiyotikler geliştirmeye itmiştir (54).

Halk içinde birçok bitki bir araya getirilerek tedavi için kullanılmaktadır. Literatürde etnobotanik araştırmalarda *Salvia* türlerinin bazı enfeksiyonların tedavisi için tesirli olduğu bildirilmiştir (55). Afrika'nın güney kesiminde *S. repens*, *S. stenopylla* ve *S. runcinata* mikropları öldürmek ve genel olarak temizleyici olarak kullanılmaktadır. Yaprak kısmı ise kaynatılmak suretiyle ateş, terleme, hazım zorluğu ve baş ağrısı için kullanılmaktadır. Bitki ekstreleri vücutta oluşan açık yaralar için de kullanılmaktadır. Bunların yanı sıra kadın rahatsızlıkları ve boğaz enfeksiyonlarına karşı kaynatılıp ardından suyu içilirdi. Halk arasındaki kullanımının yaygınlığı bilim insanlarını bu bitkilerin aktif bileşenlerini ve biyolojik aktivitelerini incelemeye yöneltmiştir. Yapılan araştırmalar farklı *Salvia* türlerinin antienflamatuvar, antikolinesteraz, antikanser ve antibakteriyel aktiviteleri olduğunu ortaya çıkarmıştır. Yemekleri tatlandırmak ve çoğunlukla ekstreleri ise besin maddelerinin raf ömürlerini uzatmak amacıyla kullanılmaktadır. Antioksidan aktivitenin yanı sıra (56, 57) antibakteriyel ve antiseptik, antifungal, diüretik, antiviral, sitotoksik (58, 59) özellikleri olduğu; karın ağrısını gidermede, sakinleştirici olarak, hipoglisemide (60) ve yaraların iyileştirilmesinde de kullanıldığı bilinmektedir (61).

#### **2.4. *Salvia* Türlerinde Bulunan Fenolik Asitler**

Polar fenolik asitler *Salvia* sulu ekstrelerinin ana bileşenlerini oluşturmaktadır. Bu fenolik asitlerden pek çoğunun *S. chinensis* ve *S. yunnanensis*, *S. miltiorrhiza*'dan izole edilmiş olup yapıları aydınlatılmıştır. *Salvia* türlerinde keşfedilen fenolik asitlerin başlıcaları kafeik asit türevlerine mensup rozmarinik asit olmakla birlikte 3-metoksi-4-hidroksibenzoik asit (vanillik asit) (62), 3,4-dihidroksibenzoik asit (protokateşik asit), 4-hidroksibenzoik asit (63) ve 2,4-dimetoksibenzoik asit (64), hekzil 4-hidroksibenzoat ve 7-metoksikumarin (herniarin) (65) ve 6,7-dihidroksikumarin (eskuletin) (66) gibi fenolik asitlere de rastlanılmıştır. *Salvia* türlerinde mevcut fenolik asitler kimyasal olarak kategorize edilecek olursa, fenolik glikozitleri ve kafeik asit türevleri olmak üzere iki çeşittir. Kafeik asit türevleri kendi



içinde dimerler, monomerler, oligomerler, trimerler ve tetramerler olmak üzere 5'e ayrılmaktadır. Kafeik asit monomerlerine, kafeik asit ile birlikte izoferulik asit (67), ferulik asit (68), tartarik asit (65) ve klorojenik asit örnek olarak verilebilir. Kafeik asit dimerleri arasında en önemli olanı rozmarinik asittir (65, 68) ve bu bileşik *Salvia* türlerinde antioksidan etkiden sorumlu olan asıl bileşik olarak belirlenmiştir (68). Rozmarinik asit ile ilgili kimyasal sentezi (65), hücre kültürlerinde üretilme çalışmaları (69), sıçanlarda biyolojik aktivitesi (70) gibi birçok çalışma yapılmıştır. Kafeik asit trimerleri grubunda litospermik asitle birlikte salvianolik asitlerin bir bölümüne de rastlanır. Litospermik asitlerin metil esterlerinde yüksek oranda serbest radikal süpürücü etkiye rastlanılmıştır ve bu etkinin askorbik asitten daha fazla olduğu görülmüştür (71). Benzer tesirlerin bu grubun bir diğer önemli mensubu olan salvianolik asitlerden salvanolik asit A'da bulunduğu belirtilmiştir. Aynı zamanda kafeik asit tetramerleri rozmarinik asit dimerleri de olmaktadır. Salvianolik asit L, B, yunnaneik asit ve sagerinik asitler bu grupta bulunmaktadır. Bu asitlerden salvianolik asit B, litospermik asit adıyla da bilinmekte ve *Salvia* türlerinde magnezyum, potasyum, amonyum tuzları halinde oldukça yaygın bir şekilde bulunmaktadır. Salvanolik asit E'ye *Salvia* türlerinden sadece *S. miltiorrhiza*' da rastlanmıştır. Kafeik asit oligomerleri sınıfında yalnızca yunnaneik asit A ve B bulunmaktadır. Bunun yanı sıra *Salvia* türlerinde fenolik asitlerin glikozit formları da bulunmaktadır. En fazla rastlanan fenolik asit glikozitleri rozmarinik asit-3-glikozit ile *cis*- ve *trans*-kumarik asitlerin oluşturmuş olduğu glikozitlerdir (65).

## **2.5. *Salvia* Türlerinde Bulunan Polifenoller**

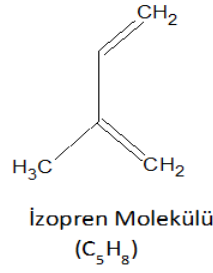
*Salvia* türlerinin içerdiği polifenollerle ilgili yapılan çalışmalar proantosiyanidinler, flavonoidleri ve antosiyaninleri kapsamaktadır. Flavonoidlere *Salvia* türlerinde sık bir şekilde rastlanmaktadır (66). Flavonoidler bitkide flavonoller, flavonlar ve glikozitleri halinde bulunmaktadır. 6-hidroksi flavonoller bu cins için taksonomik bir önem taşırlar ve bu durum *Salvia* türleri için karakteristiktir (72). Flavonoidlerin çoğunluğunu apigenin flavonolleri, luteolin ve bunların 6-hidroksi türevleri oluşturmaktadırlar. *Salvia*'ların yapraklarında flavonollerin metilesterlerine de sık bir şekilde rastlanmaktadır. *S. yosgadensis* de diğer *Salvia* türlerinden farklı bir şekilde luteolin-3-metil eter (chrysoeriol), apigenin-4-metil eter (acacetin) (73) ile 4-metil eter (diosmetin)'e de rastlanmaktadır (64). 6-Hidroksi-apigenin (scutellarein)

*Salvia* ekstrelerinde bulunmaktadır. 6-hidroksi-apigenin-6,7-dimetileter (cirsimaritin), 6-hidroksi-apigenin-6'nin yüksek orandaki antimikrobiyal tesiri, hispidulinin ise antihepatotoksik tesirleri bilinmektedir (65, 74, 75). *Salvia*'larda bulunan flavonollerin çoğunluğunu kersetin ve kemferol flavonolleri oluşturmaktadır. Bu flavonollerden kersetine *S. dorrii*'de rastlanmıştır. Flavon glikozitleri *Salvia*'larda sıklıkla bulunan glikozitlerdir ve apigenin-7-glikozit ve luteolin-7-glikozit bu glikozitlerin başlıcasını oluşturmaktadır. Apigenin ve luteolin glikozitleri de kendi aralarında karşılaştırılacak olursa luteolin glikozitlerinin *Salvia* türlerinde rastlanma oranı apigenin glikozitlerine nazaran daha fazladır. Flavonol ve flavon aglikonlarında olduğu gibi burada da 6-hidroksiflavonglikozitleri *Salvia* türleri için karakteristik bir önem taşımaktadır (65).

*Salvia* çiçeklerinde antosiyaninlere bol miktarda rastlanır. *Salvia*'ların antosiyaninleri ilk olarak Bolton ve Willstater tarafından 1916 tarihinde incelenmiştir ve salvianin pigmenti izole edilmiştir. Sonraki yıllarda yapılan çalışmalarda bu pigmentin yapısı ile ilgili araştırmalar tekrar edilmiş olup yapısı kesin bir şekilde belirlenmiştir. *Salvia*'larda yapılan araştırmalar çiçeklerde bulunan kırmızı ve mavi renklerden delfinidin, pembe renklerden pelargonidin, menekşe ve ara renklerinden ise siyanidin antosiyaninlerinin sorumlu olduğunu göstermiştir. Proantosiyanidinler kondanse tanenler adıyla da bilinmektedir ve *Salvia*'larda salvitanin olarak isimlendirilmiştir. *Salvia* preparatlarında tanen bulunması istenmez bu sebeple kolon kromatografisi kullanarak ortamdan uzaklaştırılmalıdır. *Salvia*'larda salvitaninler olarak adlandırılmış tanenlerin olduğu biliniyor olmasına rağmen bu maddeler üstünde fazla çalışma yapılmamış ve yapıları tam olarak açığa çıkarılmamıştır (65, 76).

## **2.6. Terpenler ve *Salvia* Türlerinde Bulunan Terpenler**

Terpenler, bir diğer adıyla izoprenoidler, bitkilerde oldukça yaygındır. Terpen bileşikleri, bitki dokularında çoğunlukla serbest halde, glikozitli yapıda, organik esterleri halinde veya proteinlerle birleşmiş olarak bulunurlar (77). İzopren molekülünün kondensasyonu ile terpen bileşikleri oluşur. Şekil 1, izoprenoid molekülünün yapısını ve karbon sayısına göre terpenlerin sınıflandırılmasını göstermektedir.



n	Adı
10	Monoterpen
15	Seskiterpen
20	Diterpen
25	Sesterterpen
30	Triterpen
40	Tetraterpen
100-	Politerpen

**Şekil 1.** İzoprenoid molekülünün yapısı ve karbon sayısına göre terpenlerin sınıflandırılması

Terpenleri fiziksel özelliklerine göre iki sınıfa ayırabiliriz:

**Uçucu Terpenler:** Uçucu yağlar olarak da bilinen ve su buharıyla sürüklenebilen küçük molekülü terpenlerdir.

**Uçucu Olmayan Terpenler:** Daha büyük moleküllere sahip olan bu terpenler bazı seskiterpenler, diterpenler, sesterterpenler, triterpenler, tetraterpenler.

*Salvia* türleri abietan başta olmak üzere pimarane, klerodan ve labdan tipli diterpenoitler içermektedirler.

#### Klerodan Diterpenoitler

Amerikan *Salvia* türleri çoğunlukla klerodan tipli diterpenoitler içermekte iken nadiren abietan diterpenoit içermektedirler. Meksika bitkisi olan *S. languiduline* Epl. ve *S. melissodira* Lag.'dan bir klerodan diterpenoit olan melisodorik asit izole edilmiştir (78).

#### Labdan ve Pimarane Diterpenoitler

Bu tip diterpenoitler diğer Lamiaceae familyasına mensup bitkilerde bulunmasına rağmen *Salvia* türlerinde nadiren bulunmaktadırlar. *S. wiedemanni* bitkisinin toprak üstü bölümlerinden 14-oksopimarik asit ve 7β-hidroksisandrakopimarik asit abietan diterpenoitler ile birlikte izole edilmiştir (79, 80).

## Sesterterpenoitler

Sesterterpenoit olarak *S. hypoleuca* Benth. bitkisinden salvilösolid metil ester, salvilösolid- 6,23-lakton elde edilebilmiştir (81, 82). Neredeyse tüm *Salvia* türlerinde yaygın bir şekilde bulunan triterpenoidler; oleanolik asit ve ursolik asit *S. officinalis* L. den izole edilmiştir (83).

## **2.7. *Salvia* Türleri Üzerinde Yapılmış Biyoaktivite Çalışmaları**

İran'ın Fars bölgesinde doğal olarak yetişen endemik bir tür olan *S. lachnocalyx* Hedge'nin kök kısmının fitokimyasal analizi sonucu beş diterpenoit (ferruginol, taksodion, sahandinon, 4-dehidrosalvilimbinol ve labda-7,14-dien-13-ol) elde edilmiştir. Saflaştırılan bileşiklerin sitotoksitesi, üç insan kanser hücre serisine MOLT-4 (akut lenfoblastik lösemi), HT-29 (kolorektal adenokarsinoma) ve MCF-7 (meme adenokarsinoması) karşı önemli sitotoksik aktivite gösterdiği bulunmuştur (85).

*S. fruticosa* Mill. subsp. *thomasi* türünün *in vitro* antioksidan ve antitümör etkilerini araştırmak için yapılan bir çalışmada bitkinin toprak üstü kısımları metanol ile ekstre edilmiştir. Bu ekstre, metanol ve n-hekzan ile fraksiyonlandırılmıştır. Luteolin, luteolin 7-O-glikozit, rutin ve salvigenin metanol fraksiyonundan izole edilmiştir. n-Hekzan fraksiyonu viridiflorol,  $\beta$ -pinen, 1,8-sineol ana bileşenler olarak elde edilmiştir. Metanol ekstresinin meme kanserine (MCF-7 ve MDA-MB-231) ve insan kolorektal karsinoma (RKO ve Caco-2) hücrelerine karşı antitümör etki yaptığı tespit edilmiştir. *S. fruticosa* TUNEL testinde apoptozis ile kanser hücrelerinde ölüme yol açmış ve tümöral olmayan 3T3-L1 hücrelerinde düşük sitotoksik etki göstermiştir. Ayrıca lipit peroksidasyonunun en üst düzeyde korunmasını sağlamış ve 3T3-L1 fare fibroblastlarında menadiyon tedavisi ile indüklenen oksidatif stresini azaltmıştır. Bu biyoaktivite sonuçları açısından *S. fruticosa*'nın yalnızca gıda olarak değil aynı zamanda nutrasötik/farmasötik endüstrisinde kullanımının teşvik edilebileceğini göstermiştir (86).

*S. urmiensis* Bunge ve *S. hydrangea* Pobed türlerinin ekstrelerinin DPPH serbest radikal ve ABTS katyon radikal (2,2-azino-bis (3-etil benzotiyazolin-6-sülfonik asit)) giderim aktiviteleri ile toplam fenolik ve flavonoit içeriklerinin değerlendirildiği bir

çalışmada; *S. urmiensis*'in etil asetat ekstresinin  $10.0 \pm 0.2$  µg/mL IC<sub>50</sub> değeri ile önemli antioksidan özelliği olduğu ve çalışılan tüm ekstrelerin yüksek fenolik-flavonoit içerik gösterdiği belirlenmiştir (87).

*S. buchananii* Hedge'nin toprak üstü kısımlarından elde edilen diklorometan ekstresinin antimikrobiyal özellikleri açısından araştırıldığı çalışmada, ekstre birçok ilaca karşı direnç gelişimi gösteren *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus agalactiae*, *Enterococcus faecium* gibi gram pozitif klinik suşlara karşı belirgin bir inhibisyon aktivitesi göstermiştir. Bu ekstrenin fitokimyasal incelemesi, ursolik (UA) ve oleanolik (OA) asitin yanı sıra bilinen sekiz klerodan diterpenin ve üç yeni klerodan diterpenin izolasyonunu sağlamıştır. Bu bileşiklerin yapıları kapsamlı 1D ile 2D NMR ve HR-MS spektroskopik yöntemlerle aydınlatılmıştır (88).

*S. albocaerulea* Linden türünden izole edilen sugiol bileşiği ve *S. forskahlei* L. türünden izole edilmiş olan forskalinon bileşiğinin gram pozitif bakterilere karşı antibakteriyel aktivitelerinin olduğu belirlenmiştir (89).

*S. syriaca* L. türünün bileşenlerinin, antidiyabetik, anti-Alzheimer, genel toksisite ve antioksidan aktivitelerinin değerlendirildiği bu çalışmada, bitkinin metanol ekstresi ve uçucu yağının fitokimyasal bileşimi, sırasıyla, GC-MS ve ters fazlı yüksek performanslı sıvı kromatografisi teknikleri kullanılarak tanımlanmıştır. *S. syriaca*'nın uçucu yağı, güçlü sitotoksikite, antioksidan, α-amilaz ve α-glukozidaz inhibitör aktivite göstermiştir. HPLC analiz sonuçlarına göre; rutin, kersetin, apigenin, rozmarinik asit ve ferulik asit en çok bulunan fenolik bileşenlerdir (90).

*S. przewalskii* Maxim' in toprak altı kısımlarından, bilinen dört diterpenoit ve beş fenolik asit ile birlikte ganxincastanic asit A adında yeni bir diterpenoit izole edilmiş ve bu bileşiklerin yapıları spektroskopik yöntemlerle belirlenmiştir (91).

*S. brachyantha* (Bordz.) Pobed, *S. aethiopsis* L. ve *S. microstegia* Boiss.&Balansa türlerinin metanol ekstrelerinin fenolik içeriklerinin tanımlanması ve nicelendirilmesi RP-HPLC/MS ile yapılmış, antioksidan aktiviteleri CUPRAC, FRAP ve DPPH yöntemleri ile belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlar toplam 18 fenolik bileşiğin varlığını göstermiştir. Bunların en fazla miktarı, *S. microstegia*'da kemferol

ve *S. brachyantha* ve *S. aethiopsis*'te rozmarinik asit olarak belirlenmiştir. Diğer önemli fenolik bileşiklerin apigenin, luteolin, p-kumarik asit ve klorojenik asit olduğu bulunmuştur. Çalışılan tüm türlerin, BHA, BHT ve askorbik asit gibi standart antioksidanlara kıyasla orta derecede ve daha düşük antioksidan aktivite gösterdiği belirlenmiştir (92).

*Betonica officinalis* L. ve *S. officinalis* L. bitkilerinin ekstrelerinin fenolik profillerini, antioksidan, antimikrobiyal ve antienflamatuar özelliklerini tanımlamak amacıyla yapılan çalışmada elde edilen sonuçlar, ekstrelerin 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) serbest radikalini ve 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolin-6-sülfonik asit) (ABTS) katyon radikalini inhibe ettiğini göstermiştir. *S. officinalis*'in *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* ve *Pseudomonas aeruginosa*'ya karşı etkili antibakteriyel ajan olduğu tespit edilmiştir. Ekstreler, protein denatürasyonunu ve siklooksijenazı (COX-1) inhibe etmiştir; bu da bu türlerin bitki kaynaklı antienflamatuar maddeler için potansiyel bir kaynak olabileceğini düşündürmektedir. İlk defa bu çalışma ile *B. officinalis* bitkisinin antimikrobiyal ve antienflamatuar etkinliği ortaya çıkmıştır. Bu çalışmanın sonuçları, tıbbi preparatların geliştirilmesine ve bu türlerin antimikrobiyal, antienflamatuar ve yara iyileştirici madde olarak kullanılmasına yardımcı olacaktır (93).

*S. trichoclada* Bentham'ın toprak üstü kısımlarının metanol ekstresinin sekonder metabolitler açısından incelendiği çalışmada lupeol, lupenon, glochidon, monoginol A, oleanolik asit, ursolik asit,  $\beta$ -sitosterol, apigenin-7-O-ramnozid ve rozmarinik asit olmak üzere dokuz bileşik izole edilmiştir. İzole edilen bileşiklerin yapıları 1D ve 2D-NMR spektroskopik teknikler kullanılarak aydınlatılmıştır. Bu çalışmayla ilk kez bir *Salvia* türü ve Lamiaceae familyasından lupan triterpen glochidon izole edilmiştir. Ekstrenin ve izole edilen bileşiklerin antioksidan potansiyeli,  $\beta$ -karoten renk giderim yöntemi ve DPPH serbest radikal giderim yöntemleriyle gerçekleştirilmiştir. Antikolinesteraz aktiviteleri hem asetilkolinesteraz (AChE) hem de butirikolinesteraz (BChE) enzimlerine karşı Ellman yöntemi ile araştırılmıştır. Bileşiklerden oleanolik asit, ursolik asit, lupeol, glochidon, apigenin-7-O-ramnozid ve rozmarinik asitin neredeyse tüm konsantrasyonlarda oldukça

yüksek antikolinesteraz aktivite gösterdiği belirlenmiştir. Tüm bileşikler arasında, en yüksek antioksidan ve iyi antikolinesteraz aktiviteyi rozmarinik asit göstermiştir (94).

*S. ceratophylla* L. ile yapılan bir çalışmada; daha önce tanımlanmayan yeniden düzenlenmiş iki abietan ceratol ve ceratodiol, bilinen üç abietan-diterpenoid olan 1-ketoetiyoipinon, ferruginol ve 12-deoksisalvipizon bu bitkinin köklerinden izole edilmiştir. Saflaştırılan bileşiklerin yapıları, 1D ve 2D NMR ve yüksek çözünürlüklü elektrosprey kütle spektrumları dahil olmak üzere, spektroskopik verilerin analizlerine dayanarak karakterize edilmiştir. Analitik veriler daha sonra literatürde bildirilenlerle karşılaştırılmıştır. İzole edilen bileşiklerin sitotoksitesi MTT redüksiyon testi kullanılarak iki insan kanser hücresi serisine, MOLT-4 (insan lenfoblastik lösemi) ve MCF-7'ye (insan göğüs adenokarsinomu) karşı incelenmiştir. Ceratodiol bileşiği her iki kanser hücresine karşı sitotoksite gösterse de, ceratol bileşiği MOLT-4 hücrelerine karşı zayıf toksite göstermiş ve MCF-7 hücrelerine karşı toksite göstermemiştir. Her ikisi de bir  $\alpha$  doymamış karbonil fonksiyonuna sahip olan 1-ketoetiyoipinon ve 12-deoksisalvipizon test edilen bileşikler arasında en yüksek sitotoksik aktiviteyi göstermiştir (95).

*S. amplexicaulis* Lam. türünün su, etanol, metanol, etil asetat ve diklorometan ekstralarının kimyasal bileşimi ve biyolojik aktivitelerini incelemek amacıyla yapılan çalışmada HPLC kullanılarak başta metanol ekstresi olmak üzere etanol ve su ekstralarında, en fazla kemferol glikozitleri (> %40) ve polifenollerin olduğu tespit edilmiştir. Yapılan antioksidan tayin testlerinden DPPH, FRAP ve  $\beta$ -karoten renk açılım yöntemlerinde su ekstresi en yüksek aktiviteyi göstermiştir, etanol ekstresi ise ABTS yönteminde yüksek aktivite göstermiştir. Metanol ve su ekstraları DPPH yönteminde kullanılan BHT standardından daha yüksek aktivite göstermişlerdir (15.1  $\mu\text{g/mL}$ , 15.8  $\mu\text{g/mL}$  ve 17.9  $\mu\text{g/mL}$ ). Bu durum muhtemelen ekstralarda bulunan yüksek miktardaki kamferol glikozitlerinden kaynaklanmaktadır. Etanol ekstresi patojenik bakterilere karşı su ekstresinden daha iyi etki göstermiştir, aynı şekilde antinörodejeneratif etkisi de daha güçlü bulunmuştur özellikle tirozinaz inhibisyonunda, etanol ekstresinin kojik asit ile karşılaştırıldığında oldukça etkili olduğu tespit edilmiştir. Buna karşılık su ekstresi etanol ekstresine göre HCT-116 hücrelerine karşı daha güçlü sitotoksik aktivite göstermiştir. Alimpic ve arkadaşları

yaptıkları bu çalışmada *S. amplexicaulis*'in su ve etanol ekstralarının gösterdiği güçlü antioksidan ve antinörodejeneratif etkileri bakımından ilaç ve gıda endüstrisi için gelecek vaat ettiğini ortaya koymuşlardır (96).

*S. aethiopsis* L. ve *S. ceratophylla* L.'nin metanol ve etil asetat ekstralarının fenolik bileşimlerini, *in vitro* antioksidan ve sitotoksikite etkinliklerini incelemek üzere Poyraz ve arkadaşları bir çalışma yürütmüşlerdir. *S. aethiopsis*'in metanol (SA-ME) ve etil asetat (SA-EA) ekstralarının toplam fenolik içeriği  $94.36 \pm 1.36$  -  $290.62 \pm 1.51$  mg GAE/g, *S. ceratophylla*'nın metanol (SC-ME) ve etil asetat (SC-EA) ekstralarında ise bu değer  $168.35 \pm 1.97$  -  $330.14 \pm 2.28$  mg GAE/g arasında bulunmuştur. Metanol ve etil asetat ekstralarının ana fenolik asiti rozmarinik asit olarak tespit edilmiştir (*S. aethiopsis* için 40.25 ve 140.6  $\mu\text{g}/100$  g bitki; *S. ceratophylla* için 74 ve 234.5  $\mu\text{g}/100$  g bitki). *S. aethiopsis* ve *S. ceratophylla* ekstralarının fenolik asitleri daha çok sinamik asit türevleri, ardından benzoik asit türevleri içerir. HPLC sonuçları, antioksidan kapasite ile bu fenolik asitlerin miktarı arasında bir korelasyon olduğunu ortaya koymuştur. Bu bitki ekstralarının potansiyel antioksidan özelliklerini görebilmek için, hücrelerin çoğalması MTT deneyi ile değerlendirilmiştir. Ekstrelerin canlılık yüzdesi, kontrollere göre belirlendi ve 15.6-1000  $\mu\text{g}/\text{mL}$  ekstre konsantrasyonlarında ölçüldü. SA-ME ekstresinin  $\text{IC}_{50}$  değeri 24 saatte  $230.0 \pm 17.3$  ve 48 saatte  $93.3 \pm 5.8$  SC-ME için  $266.7 \pm 41.6$  (24 saat) ve  $180.0 \pm 20.0$  (48 saat) olarak bulunmuştur. Ekstrelerin sitotoksikite etkileri şu şekilde sıralanabilir, SA-EA > SC-EA > SA-ME > SC-ME. SC-ME en düşük seviyede iken en sitotoksik ekstre yüksek fenolik içeriğe sahip olan SA-EA olarak bulunmuştur (97).

*S. plebeia* R. Brown türünün toprak üstü kısımlarından hazırlanan etanol ekstralarından üç yeni seskiterpenoit izole eden Ma ve arkadaşları buldukları seskiterpenoitlerin yapılarını, NMR ve MS spektrumlarının detaylı analizleri sonucu aydınlatmışlardır. Bulunan bu seskiterpenoitler, salplebeone A, eudesmane lakton iken, salcombe B ve C 12,8-laktam grupları içeren nadir eudesmane seskiterpenoitlerdir (98).

*S. fruticosa* Mill. türü antioksidan, antimikrobiyal ve antiproliferatif etkinlikleriyle bilinir. Faz I ksenobiyotik metabolize edici enzimler olan CYP1A2 ve CYP2E1, faz II enzimlerin, NQO1, GPx ve glutatyon S-transferazların (GST)



hareketi ile elimine edilen reaktif metabolitleri üretir. Bu çalışmada HT-29 hücrelerinde *S. fruticosa* ve onun önemli fenolik bileşiği olan rozmarinik asitin (RA) CYP1A2, CYP2E1, NQO1, GPx ve GSTm1 mRNA ekspresyonları ve enzim aktiviteleri üzerine *in vitro* modülasyon etkileri araştırılmıştır. Bir mRNA ekspresyon analizi CYP1A2 ve CYP2E1 düzeylerinin azaldığı, *S. fruticosa* ve RA tedavilerinin ardından NQO1, GPx ve GSTm1 düzeylerinin arttığını ortaya koymuştur. Gen ekspresyonlarına paralel olarak *S. fruticosa* tarafından GPx ve GST enzim aktiviteleri sırasıyla 1.68 ve 1.48 kat artmıştır. Dahası, RA, GPx ve GST aktivitelerini sırasıyla 1.67 ve 1.94 kat arttırmıştır. Bu ön çalışmanın sonuçları, araştırılan enzimlerin *S. fruticosa* tarafından ekspresyonu ve aktivitesindeki değişiklikler nedeniyle ksenobiyotik metabolizmasının değişebileceğini göstermektedir (99).

*S. officinalis* L.'nin toprak üstü kısmının metanol ekstresinden izole edilmiş olan fenolik diterpenlerin hem asetilkolin esterase enzimini (AChE) hem de B16 melanoma hücrelerinde melanin biyosentezini inhibe etme yeteneklerinin incelenmesi amacıyla bu araştırma yapılmıştır. 12-metilkarnosol, karnosol, 7b-metoksirosmanol, 7a-metoksi rosmanol, sageone, izorosmanol ve epirosmanol olmak üzere yedi fenolik diterpen izole edilmiştir. Ellman metodu kullanılarak izole diterpenlerin AChE'yi inhibe etme yetenekleri test edilmiştir. Ayrıca, izole fenolik diterpenlerin AChE'nin aktif bölgelerindeki amino asit kalıntılarına bağlanma afinitesini araştırmak için bir moleküler yerleştirme deneyi yapılmıştır. Sonuç olarak, izole diterpenlerden izorosmanolün arbutininki kadar güçlü bir melanin inhibe edici aktivite gösterdiği tespit edilmiştir. 7a-metoksi rosmanol ve izorosmanol bileşiklerinin 500 µM konsantrasyonda AChE aktivitesini sırasıyla %50 ve %65 oranında inhibe ettikleri belirlenmiştir. Sonuçlar, izorosmanolün bilişsel fonksiyonların azalması ve hiperpigmentasyon gibi yaşlanma bozukluklarında faydalı olabilecek yeni ilaçların geliştirilmesine yönelik ileri çalışmalar için ümit verici bir doğal bileşik olduğunu göstermiştir (100).

Bu çalışmada, İran'ın 27 yabani *Salvia* türünden 41 popülasyonunda beş biyoaktif fenolik bileşiğin (rozmarinik asit, karnosik asit, kafeik asit, salvianolik asitler A ve B) tanımlanması ve belirlenmesi için basit ve güvenilir bir HPLC-UV yöntemi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Fenolik bileşik profillerine göre türler arasındaki farklılaşmayı incelemek için Temel Bileşen Analizi (PCA) tekniği

kullanılmıştır. Çalışılan *Salvia* türlerinde fenolik bileşiklerin dağılım şekillerinde ve içeriklerinde belirgin intra- ve inter-spesifik değişiklikler gözlenmiştir. Bu çalışma sonucunda, yaprakların köklere kıyasla daha fazla miktarda fenolik bileşik bulundurduğu tespit edilmiştir. *S. verticillata* L.'nin yapraklarında en yüksek miktarda rozmarinik asit ( $41.53 \pm 0.88$  mg/g kuru ağırlık) ve salvianolik asit A ( $8.10 \pm 0.35$  mg/g kuru ağırlık) bulunmuştur. *S. syriaca* L. ve *S. sharifii* Rech.f.&Esfand. türlerinin yaprakları sırasıyla salvianolik asit B ( $54.47 \pm 2.00$  mg/g kuru ağırlık) ve karnosik asit ( $34.05 \pm 1.18$  mg/g kuru ağırlık) bakımından zengin bulunmuştur. PCA sonuçları, farklı bölgelerden toplanan *Salvia* türlerinde kimyasal farklılıklar olduğunu ortaya çıkarmıştır. Bu çalışma, *S. officinalis* L. dışında, *S. verticillata* L., *S. hypoleuca* Benth., *S. leriifolia* Benth. ve *S. virgata* Jack. gibi bazı yabancı türlerin tıbbi ve endüstriyel amaçlar için güçlü doğal kaynaklar olarak tanımlanabileceğini göstermiştir (101).

*S. aegyptiaca* L.'nin toplanma bölgelerine bağlı olarak polifenolik içeriğinde ve antioksidan kapasitesindeki değişiklikler incelenmiştir. Folin-Ciocalteu prosedürü ile değerlendirilen toplam polifenolikler, Enfida ve Chott Meriem'den damıtılmış *S. aegyptiaca*'da  $79.67$  ve  $77.91$  mg GAE/g kuru ağırlık değerlerine ulaşmıştır. HPLC analizi, 14 fenolik bileşenin tanımlanmasına izin vermiştir. Metil karnosat ( $416.29$ – $4052.24$   $\mu\text{g/g}$  kuru ağırlık), rozmarinik asit ( $562.46$ – $1172.24$   $\mu\text{g/g}$  kuru ağırlık) ve apigenin-7-glikozit ( $512.96$ – $774.02$   $\mu\text{g/g}$  kuru ağırlık) ana fenolikler olarak tespit edilmiştir. Chott MERIEM numunelerinin antioksidan aktivitesi DPPH ( $\text{IC}_{50}$ ,  $29.62$   $\mu\text{g/mL}$ ), ABTS ( $198.48$   $\mu\text{M TE/mg}$ ) ve FRAP ( $155.34$  mM Fe(II)/mg) yöntemleriyle değerlendirilmiştir. Ayrıca, tanımlanmış birkaç fenolik ve antioksidan test arasında anlamlı ( $p < 0.05$ ) korelasyon saptanmıştır. *S. aegyptiaca*'nın kalıntılarının değerli doğal antioksidanlar olduğu ve sağlığı artırıcı özelliklere sahip olması bakımından hem farmasötik hem de gıda endüstrisinde faydalı olabileceği görülmüştür (102).

*S. viridis* L.'nin toprak üstü kısımlarının sulu (dekoksasyon ve infüzyon) ve hidroetanolik ekstraktlarının polifenol profilini belirlemek ve antioksidan aktivitelerini değerlendirmek amacıyla yapılan bu çalışmada, polifenol profili UPLC-DAD/ESI-MS ile belirlenmiştir. Test edilen ekstraktlardaki toplam polifenol içeriği, Folin-Ciocalteu testi kullanılarak UV-Vis spektrofotometrisi ile belirlenmiştir. Antioksidan

etki FRAP, DPPH, ABTS, O<sub>2</sub>\* süpürücü ve TBARS yöntemleriyle değerlendirilmiştir. Hidroetanolik ekstrenin en yüksek toplam fenolik bileşik içeriğine sahip olduğu görülmüştür. Ekstrelerin UPLC-DAD/ESI-MS analiziyle flavonoitler (dört bileşik), feniletanoidler (sekiz bileşik) ve fenolik asitler (yedi bileşik) olarak tanımlanan toplam 19 fenolik bileşik belirlenmiştir. Rozmarinik asit baskın fenolik asit, verbascoside baskın feniletanoid iken, numuneye bağlı olarak apigenin glukuronid ya da metil luteolin glukuronid analiz edilen ekstrelerde baskın flavonoitler olarak bulunmuştur. Yüksek polifenol seviyesinin varlığı, hem infüzyon hem de hidroalkolik ekstrenin yüksek bir antioksidan aktiviteye sahip olduğunu göstermiştir. Bu sonuçlar *S. viridis*' in zengin bir fenolik bileşik kaynağı olduğunu ve oksidatif stresi azaltma potansiyeli ile besinsel alanlarda kullanılabileceğini göstermiştir (103).

*S. elegans* Vahl., *S. greggii* A. Gray ve *S. officinalis* L. bitkilerinin dekoksasyonları, özellikle diyabet ve obezitede etkili olan anahtar enzimlere ( $\alpha$ -glukozidaz,  $\alpha$ -amilaz ve pankreatik lipaz) karşı inhibitör etki ve antioksidan aktivite açısından, sağlığa yararlı özellikleri bakımından araştırılmıştır. Ayrıca, bu üç bitkinin dekoksasyon ekstrelerinin fenolik profilleri belirlenmiş ve faydalı özellikleriyle korele edilmiştir. *S. elegans* dekoksasyonu, en etkili  $\alpha$ -glukozidaz ( $EC_{50}=36.0 \pm 2.7 \mu\text{g/mL}$ ,  $EC_{50}=345.3 \pm 6.4 \mu\text{g/mL}$  ve  $71.2 \pm 5.0 \mu\text{g/mL}$ , *S. greggii* ve *S. officinalis* için sırasıyla) inhibitörü olmasının yanı sıra serbest radikalleri temizleme kapasitesi olarak bilinen DPPH•, NO• ve O<sub>2</sub>• ve Fe<sup>3+</sup> 'ı azaltma kabiliyetinde antioksidan etkileri açısından en umut verici ekstre olmuştur. *S. elegans*' in *S. greggii* ve *S. officinalis* dekoksasyonuna göre bu üstün aktivitesi, genel olarak, kafeik asit ve türevlerince zengin olması ile büyük ölçüde ilişkili bulunmuştur. Buna karşılık, *S. officinalis* dekoksasyonu, özellikle apigenin, scutellarein ve luteolinin glikosidik formları ile ilişkili olabilecek yüksek miktarda flavon içeriği ile ksantin oksidaz aktivitesine karşı iyi inhibitör kapasite sergilemiştir (104).

*S. hydrangea* DC. ex Benth. türünün n-hekzan ekstresinin fraksiyonlanmasıyla altı tanesi yeni bileşik olan ve salvadion A ile birlikte yedi izoprenoit elde edilmiştir. Yapıları kapsamlı spektroskopik ve spektrometrik veri analizi (1D ve 2D NMR, HRMS) ile belirlenmiştir. Salvadione A'nın mutlak konfigürasyonu, Cu/K $\alpha$  radyasyonu ile tek kristalli X ışını difraksiyon analizi ile belirlenmiştir. Ayrıca, tüm

bileşiklerin mutlak konfigürasyonu elektronik dairesel dikroizm spektroskopisi ile belirlenmiştir. Bileşiklerin *Leishmania donovani* ve *Plasmodium falciparum*'a karşı antiprotozoal aktivitesi belirlenmiş ve sıçan myoblast L6 hücrelerinde sitotoksiteleri değerlendirilmiştir. Perovskone C bileşiği *P. falciparum*'a karşı iyi aktivite ( $IC_{50}$  0.6  $\mu$ M) sergilemiştir (105).

*S. barrelieri* Etl.'nin toprak üstü kısımlarından elde edilen flavonoitler ve triterpenlerin antioksidan, antibakteriyel ve sitotoksik aktiviteleri çalışılmıştır. 3 $\beta$ -asetoksi-olean-18-en-2 $\alpha$ -ol adında yeni bir triperpen ile birlikte 12 bileşik izole edilmiş olup yapıları, 1D-, 2D-NMR ve HRESIMS' ı içeren spektroskopik analizler ile ve literatürde bildirilen verilerle karşılaştırılarak aydınlatılmıştır. Bu bileşiklerin antibakteriyel aktivitesi, beş bakteri için seri seyreltme tekniği ile MIC değerlerinin belirlenmesinin ardından *Staphylococcus aureus*'ta biyootografi tarafından değerlendirilmiştir. Üç bileşik *Enterococcus faecalis*, *S. aureus*, *S. epidermidis*, *Escherichia coli* ve *Pseudomonas aeruginosa*'ya karşı aktif bulunmuştur (MIC 15.1 ile 125  $\mu$ g/mL). İki bileşik orta derecede DPPH radikal temizleme aktivitesi göstermiştir ( $IC_{50}$  79.1 ve 21.2  $\mu$ g/mL). Bu bileşikler önemli derecede tirozinaz inhibe edici aktivite göstermemişlerdir ( $IC_{50}$  > 1.5 mg/mL). Sitotoksik aktiviteleri, promyelositik lösemi (HL60), insan eritromyeloblastoid lösemi (K562) ve fibrosarkom (HT1080) hücre serilerine karşı değerlendirilmiş ve dört bileşik orta düzeyde bir sitotoksik aktivite ( $IC_{50}$  28.75 ile 85.0  $\mu$ M) göstermiştir (106).

Anti-proliferatif aktivite güdümlü clerodermic asidin *S. nemorosa* L.' den izolasyonu ile geno/sitotoksikite ve hipoksi aracılı etki mekanizması araştırılmıştır. Katı tümörlerin düşük oksijen/besin maddesi ortamına adaptasyonu, hipoksi ile indüklenebilir faktör-1'in (HIF-1) çok önemli transkripsiyon rolüne aracılık eder. Bu nedenle, HIF-1 ve alt birimlerinin umut verici antikanser hedefleri olduğu düşünülmüştür. HIF-1'in hedeflenmesi ve aşağı regülasyonu yoluyla hücre sitotoksitesini ikna ettiği çeşitli doğal bileşikler bildirilmiştir. *Salvia* cinsi, ümit verici antikanser aktivite gösteren zengin bir biyoaktif terpenoid kaynağıdır. Burada, HIF-1'e ekspresyonunu hedef alan doğal antiproliferatif bileşiğin tanımlandığı bildirilmiştir. A549 hücrelerine karşı MTT testi kullanılarak *Salvia* ekstrelerinden doğal antiproliferatif bileşiklerin keşfedilmesi için bir biyotest kılavuzlu izolasyon kullanılmıştır. Bu yönde, güçlü bir sitotoksik bileşik olarak bulunan clerodermic asit

(CDA) *S. nemorosa*'dan saflaştırılmış ve 1D ve 2D NMR analizi kullanılarak tanımlanmıştır. Sonuçlar, CDA'nın, genotoksisite ve apoptozis saptama analizleriyle doğrulanan, proliferasyon önleyici aktiviteye (IC<sub>50</sub> değeri 35µg/mL) sahip olduğunu göstermiştir. Kantitatif qPCR analizi, hipoksiyi tolere eden tedavi edilmemiş hücrelerle karşılaştırıldığında CDA ile tedavi edilen hipoksik hücrelerde HIF-1α ekspresyon seviyesinin güçlü bir şekilde inhibe edildiğini göstermiştir. Bulgular, *S. nemorosa* ve clerodermic asidin, HIF-1α ekspresyonunu azaltmak için önemli bir potansiyele sahip olduğunu ve kanser tedavisi için daha ileri çalışmalar için göz önüne alınabileceğini göstermiştir (107).

Bu çalışma, Libya kaynaklı *S. fruticosa* Mill. ve *S. lanigera* Poir. ekstrelerinin kimyasal bileşimlerini ve biyolojik aktivitelerini analiz etmeyi amaçlamıştır. Yabani yetiştirilen bitkilerden elde edilen diklorometan, etil asetat, metanol, etanol ve su ekstraları, çoğunlukla alkollü ve su ekstralarında olmak üzere fenolik asitlerin ve flavonoidlerin varlığını ortaya çıkaran HPLC-DAD kullanılarak bileşim için analiz edilmiştir. Toplam fenolik ve flavonoid içeriklerinin yanı sıra antioksidan aktiviteleri DPPH, ABTS, FRAP ve β-karoten renk açılım yöntemiyle spektrofotometrik olarak belirlenmiştir. *S. fruticosa*'nın ekstraları uygulanan tüm testlerde, özellikle etanol ekstresinde DPPH (IC<sub>50</sub>, 29.55µg/mL) ve β-karoten (% 85.11) daha güçlü aktivite sergilemiştir. Fitoterapideki geniş kullanımları nedeniyle etanol ve su ekstraları daha fazla araştırma için seçilmiştir. Ekstreler mikrodillüsyon yöntemi kullanılarak 11 bakteriye (6 Gram-negatif ve 5 Gram-pozitif) ve 7 mantara karşı antimikrobiyal aktivite açısından taranmıştır. Etanol ekstraları, özellikle Gram-pozitif bakterilere karşı su ekstralarından daha güçlü aktivite göstermiştir. Sitotoksik aktivite insan karsinoma hücre dizisi HCT-116 üzerinde sadece *S. fruticosa*'nın etanol ekstresinin belirli bir aktivite (IC<sub>50</sub>, 375.96 µg/mL) gösterdiği MTT testi ile belirlenmiştir. Ekstrelerin anti-nörodejeneratif aktivitelerinin test edilmesi, standart kojik asitten (%33.93-51.81) daha iyi bir tirozinaz inhibe edici etki (%55.26-74.66) gösterirken, ekstralar standart galantamine kıyasla asetilkolinesteraza karşı daha az etkili olmuştur. Elde edilen sonuçlara göre, Libya kökenli *S. fruticosa* ve *S. lanigera*'nın bir dizi biyolojik aktiviteye sahip umut verici doğal bileşiklerin kaynağı olduğu kanıtlanmıştır (108).

Bu çalışmada, *S. officinalis* L.'nin yaprak etanol ekstresinin biyolojik özellikleri ve ince tabaka kromatografisiyle izole edilmiş bir noktanın (spot B) murin miyelom hücrelerindeki etkileri araştırılmıştır. Hem yaprak ekstralarının hem de izole edilmiş noktanın EC<sub>50</sub>'sini belirlemek için MTT testi yapılmış, izole edilmiş nokta ayrıca LC-MS ve NMR ile de araştırılmıştır. Elektron mikroskopu ve immünofloresan, tedavi edilen P3X murin miyelom hücrelerinde morfolojik çalışmalar için kullanılmıştır. LC-MS ve NMR sonuçlarına bakılarak spot B'nin ana bileşeni olarak metil karnosat (karnosik asidin metil türevi) tanımlanmıştır. Ayrıca, spot B'nin EC<sub>50</sub> değerleri ve 20 saat boyunca tedavi edilen murin miyelom hücrelerinde gerçekleştirilen elektron mikroskopisi, transmisyon elektron mikroskopisi ve immünofloresans araştırmaları hem hücre morfolojide hem de mikrotübül dizide bazı değişiklikler ortaya çıkarmıştır. Mevcut çalışmalar, *S. officinalis* ekstralarının, murin miyelom hücreleri üzerinde biyolojik etkiye sahip olduğunu ve metil karnosatın insan hücre serilerinde ve muhtemelen kanseri önlemede daha ileri araştırmalar için ilginç bir molekül olarak belirlendiğini göstermiştir (109).

*S. miltiorrhiza* Bunge'nin kökünden izole edilmiş trijuganone C'nin antiproliferatif aktivite ve apoptozis indüksiyonunun incelendiği bir çalışmada, Danshen'in (*S. miltiorrhiza*'nin kurutulmuş kökü) hekzan fraksiyonunun insan lösemi hücreleri üzerinde antiproliferatif etkilere neden olduğu bulunmuştur. Hekzan fraksiyonunun fitokimyasal incelenmesi, tansinon diterpenleri olan dihidrotansinon I, trijuganon C, trijuganon B, kriptomansinon, tansinon IIA ve tansinon I'in izolasyonunu sağlamıştır. Trijuganon C, insan lösemi hücreleri HL-60, Jurkat ve U937'ye karşı önemli antiproliferatif aktiviteler göstermiştir. Trijuganon C'nin normal ve insan kanser hücrelerine karşı antiproliferatif aktiviteleri bu bileşiğin HL-60 ve Jurkat hücrelerine karşı 10 µM'den düşük IC<sub>50</sub> değerlerine sahip güçlü antiproliferatif aktivite sergilediğini göstermiştir. Trijuganon C, kromatin yoğunlaşmasını, DNA fragmantasyonunu, kaspaz -3, -8 ve -9'un aktivasyonunu ve HL-60 hücrelerinde poli (ADP-riboz) polimerazın (PARP) parçalanmasını indüklemiştir. Ayrıca, bu bileşik Bid ve Bax'ı aktive etmiş, mitokondriyal membran potansiyelinin kaybına yol açmış ve mitokondriden sitozole sitokrom C salımını indüklemiştir. Aksine, Bcl-2 ve Bcl-xL Trijuganon C'den etkilenmemiştir. Bu sonuçlar Trijuganon C'nin mitokondriyal disfonksiyon ve kaspaz aktivasyonunun

aracılık ettiği apoptozis indüksiyonu yoluyla antiproliferatif etkileri olduğunu göstermiştir. Trijuganon C'nin insan lösemisi için potansiyel kemoterapötik bir ajan olabileceği görülmüştür (110).

Bu çalışma, *S. suffruticosa* Montbret&Aucher ex Benth. bitki ekstresinin ve uçucu yağının kimyasal bileşenlerini araştırmayı ve biyolojik aktivitelerini değerlendirmeyi amaçlamıştır. Bitkinin toprak üstü kısımlarından elde edilen uçucu yağ, hidrodistilasyon ile elde edilmiş ve gaz kromatografisi/kütle spektroskopisi kullanılarak analiz edilmiştir. Metanol ve petrol eteri fraksiyonlarından bileşiklerin izolasyonu, farklı sabit fazlara sahip kolon kromatografisi kullanılarak elde edilmiştir. İzole edilen bileşiklerin yapıları NMR teknikleri ile aydınlatılmıştır. Sitotoksosite potansiyelleri MTT testi ve akridin oranj/etidyum bromür boyama yöntemi kullanılarak değerlendirilmiştir. Antioksidan aktivite DPPH metodu ile değerlendirilmiştir. Uçucu yağın ana bileşenleri olarak  $\beta$ -karyofilen (%27.35), bisiklo germakren (%22.15), germakren-D (%9.49) ve  $\beta$ -farnesen (%9.08) tanımlanmıştır. Ekstrenin fitokimyasal analizi, lupeol,  $\beta$ -sitosterol, stigmasterol, kafeik asit ve 1-feruloil- $\beta$ -D-glikopiranoz izolasyonu ile sonuçlanmıştır. Test edilen örnekler arasında lupeol, MCF-7, T-47D ve MDA-MB-231 dahil olmak üzere meme kanseri hücre serilerine karşı ( $IC_{50}$  değerleri  $33.38 \pm 2.6$ ,  $36.70 \pm 3.1$  ve  $23.66 \pm 1.4$   $\mu\text{g/mL}$  sırasıyla) en güçlü inhibe edici aktiviteyi göstermiştir; kafeik asit ise  $IC_{50}$   $12.1 \pm 1.2$   $\mu\text{g/mL}$  değerleri ile en güçlü radikal temizleme aktivitesini göstermiştir. Bu çalışmanın sonuçları *S. suffruticosa*'yı kanserin önlenmesinde ve tedavisinde yararlı gelecek vaat eden bir biyoaktif bileşik kaynağı olarak göstermiştir (111).

Üç Güney Afrika *Salvia* türünün biyolojik etkinliklerinin ve uçucu yağ bileşiminin incelendiği bu çalışmada, bitkilerin esansiyel yağ bileşiminin profilini çıkarmak ve geleneksel kullanımlarla ilgili biyoaktivitelerinin araştırılması amaçlanmıştır. *S. repens* Burch. ex Benth., *S. stenophylla* ve *S. runcinata* L.f. türlerinin uçucu yağı hidrodistilasyon ile izole edilmiş ve antimalaryal, antienflamatuar, antimikrobiyal aktiviteleri ve toksisite profilleri hipoksantin birleşme deneyi, 5-lipooksijenaz deneyi, minimum inhibitör konsantrasyon deneyi ve MTT kolorimetrik yöntem kullanılarak değerlendirilmiştir. Uçucu yağ bileşimi, GC-MS ve GC-FID yöntemleri kullanılarak analiz edilmiştir. *S. repens* yağında 1,8-sineol (%12.8), p-simen (%9.5) ve limonen (%9.4) baskın iken, *S. runcinata*'da  $\alpha$ -

bisabolol (%65.0) ve  $\beta$ -karyofilen (%10.5) ana bileşenlerdir. *S. stenophylla*'nın baskın bileşenleri  $\alpha$ -bisabolol (%26.1) ve  $\delta$ -3-karen (%22.6) olarak bulunmuştur. Üç yağın antienflamatuar aktivitesi ( $IC_{50}$  değeri), 22.8 ile 49  $\mu$ g/mL arasında değişmiş ve *S. runcinata* en iyi etkinliği göstermiştir. Esansiyel yağlar zayıf antimikrobiyal aktivite göstermiş (MİK değeri >32 mg/mL) ve ayrıca normal böbrek epitel hücrelerine ( $IC_{50}$  değeri <6.6  $\mu$ g/mL) toksik olduğu görülmüştür. Esansiyel yağlar bir miktar aktivite sergilemişlerdir, ancak böbrek hücrelerine karşı ortaya çıkan toksisite, yağların dikkatli kullanılması gerektiğini göstermiştir (112).

Sicilya'da (İtalya) yetişen *S. officinalis* L.'den elde edilen uçucu yağın *in vitro* antiproliferatif etkisinin ve hormona bağımlı kanser hücre serileri üzerindeki ana bileşenlerinin araştırıldığı bu çalışmada, uçucu yağ hidrodistilasyon ile hazırlanmıştır. Uçucu yağ ve üç temel bileşenin ( $\alpha$ -thujone, 1,8-sineol ve kafur) etkileri LNCaP hücreleri (prostat karsinomu), MCF-7 hücreleri (meme karsinoması) ve HeLa hücrelerinde (servikal karsinom) farklı dozajlarda ve çeşitli zaman noktalarında değerlendirilmiştir. Hücre canlılığı ve proliferasyonu, MTT testi kullanılarak hesaplanmıştır. *S. officinalis* uçucu yağı 100  $\mu$ g/mL ve 200  $\mu$ g/mL'lik dozlarda, 48 saatlik bir inkübasyondan sonra MCF-7, LNCaP ve HeLa hücre serilerinde hücre canlılığının önemli ölçüde azalmasına neden olmuştur. Aynı hücre serileri ayrıca 100  $\mu$ g/mL ve 200  $\mu$ g/mL dozlarında, uçucu yağın üç ana bileşeninin bir karışımı ile muamele edildiklerinde 48 saatlik bir inkübasyondan sonra, hücre canlılığının azaldığı görülmüştür. Bu ilk sonuçlar, antiproliferatif aktiviteye sahip yeni terapötik ajanların formülasyonuna ışık tutması açısından önemli bulunmuştur (113).

*S. miltiorrhiza* ekstresinden elde edilen dihidrotansininin insan glioma SHG-44 hücreleri üzerindeki antikanser etkileri 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazolyum bromür deneyi, Hoechst 33258 nükleer boyama, Annexin V/propidium iyodür çift boyama ve aynı zamanda western blot analizi kullanılarak araştırılmıştır. Sonuçlar, dihidrotansininin SHG-44 hücrelerinin proliferasyonunu etkili bir şekilde bastırdığını ve hem doza hem de zamana bağlı bir şekilde apoptozisi indüklediğini göstermiştir. Ayrıca, dihidrotansininin, kaspazların (kaspaz-3 ve kaspaz-9) aktivasyonunu ve SHG-44 hücrelerinde sitokrom C salınımını arttırdığı görülmüştür. Genel olarak dihidrotansininin, apoptozisi indükleyebildiği ve kaspazlar ve



sitokrom C'yi düzenleyerek gliom hücrelerinin proliferasyonunu inhibe edebildiği görülmüştür. Bu çalışma, dihidrotansinonun, gliomalı hastalar için potansiyel bir tedavi seçeneği olarak hizmet edebileceğini göstermiştir (114).

*S. aurea*, *S. judaica* ve *S. viscosa*'nın uçucu yağlarının insan prostat kanseri hücrelerine karşı biyolojik aktiviteleri incelenmiştir. Hücre canlılığı, 3-(4,5-dimetil-tiyazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazolyum bromür (MTT) testi ile ölçülmüş ve nekroz hücre ölümünü ölçmek için laktat dehidrojenaz (LDH) salımı kullanılmıştır. Apoptotik süreci incelemek amacıyla genomik DNA, kaspaz-3 aktivitesi, bölünmüş kaspaz-9 ekspresyonu, B-hücreli lenfoma 2 (Bcl-2) ve Bcl-2 ile ilişkili X (Bax) proteinleri analiz edilmiştir. Reaktif oksijen türlerinin hücre ölümündeki rolü de araştırılmıştır. Ana bileşen olarak karyofilen oksit içeren üç esansiyel yağın, insan prostat kanseri hücrelerinin büyümesini azaltabildiği, apoptotik bir işlemi aktifleştirdiği ve reaktif oksijen türlerinin oluşumunu arttırabildiği bulunmuştur. Bu sonuçlar, bu esansiyel yağların prostat kanserinde antikanser ajanlar olarak olası kullanımları için, tek başına veya kemoterapi ajanları ile kombinasyon halinde araştırılmasının faydalı olabileceğini göstermiştir (115).

Kriptotanshinon'un yumurtalık kanseri hücreleri üzerindeki önleyici etkisini değerlendirmek ve altta yatan moleküler mekanizmayı incelemek için bir çalışma yapılmıştır. Kriptotanshinon ile tedavi edilen yumurtalık kanseri A2780 hücrelerinin hücre canlılık değerlendirmesi için MTT testi kullanılmıştır. Apoptozis analizi için akım sitometrisi kullanılmıştır. Mekanizmalarda yer alan proteinleri metastaz ve apoptozis açısından araştırmak için Western Blot yöntemi kullanılmıştır.  $\gamma$ H2AX immünohistokimyası, Kriptotanshinon'a maruz kalan A2780 hücrelerinde DNA hasarını tespit etmek için kullanılmıştır. Kriptotanshinon, kaspaz kaskadını aktive ederek yumurtalık kanseri A2780 hücrelerinin apoptozisini önemli ölçüde indüklemiştir. Elde edilen veriler Kriptotanshinon'un yumurtalık kanseri hücreleri üzerindeki anti-tümör etkisini doğrulamış ve yumurtalık kanseri hücrelerini kemoterapiye duyarlı hale getirebileceği konusunda yeni bulgular sağlamıştır (116).

*S. urmiensis* Bunge'nin toprak üstü kısımlarının aseton ekstresinden iki yeni polihidroksile triterpenoid izole edilmiştir. 1D ve 2D NMR ve HR-ESI-MS ile yapıları aydınlatılan bu bileşiklerin olean-12-en-1 $\beta$ ,3 $\beta$ ,11 $\alpha$ ,22 $\alpha$ -tetraol ve urs-12-en-

1 $\beta$ ,3 $\beta$ ,11 $\beta$ ,22 $\alpha$ -tetraol olarak belirlenmiştir. Bu bileşiklerin MCF-7 hücrelerinin hücre canlılığı üzerindeki etkisi MTT testi ile incelenmiştir. Bu bileşiklerin IC<sub>50</sub> değerleri sırasıyla 110.23±0.12 ve 88.35±0.09  $\mu$ M olarak elde edilmiş ve zayıf sitotoksikite gösterdikleri bulunmuştur (117)

*S. officinalis* L. (adaçayı) ekstresinin anti-kanserojen özelliği ve normal hücreler üzerinde toksik etki göstermemesi bu ekstrenin kanser tedavisi için uygun bir aday olabileceğini göstermiştir. Adaçayının antikanser özelliklerinin altında yatan moleküler mekanizmayı değerlendirmek için, adaçayı hidroalkolik ekstrenin etkisi fare meme karsinomu hücre dizisi (4T1) üzerinde araştırılmıştır. Kültür hücreleri 24 saat boyunca farklı konsantrasyonlarda (0-1000  $\mu$ g/mL) *S. officinalis* ekstresi ile muamele edilmiştir. Ekstre ile muamele edildikten sonra doza bağlı bir şekilde hücre canlılığının azalması ve kromatin yoğunlaşmasının artması gözlenmiştir. Hücrelerin çoğunun 100  $\mu$ g/mL'de apoptozisin erken evrelerinde ve 500  $\mu$ g/mL'de apoptozisin geç evrelerinde olduğu görülmüştür. Bax ekspresyonu 500  $\mu$ g/mL konsantrasyonda belirgin bir şekilde artarken, Bcl-2 ekspresyon seviyelerinde ekstrenin farklı konsantrasyonlarında muamele edilmemiş kontrole kıyasla anlamlı bir değişiklik gözlenmemiştir. Ayrıca, bu hücrelerde apoptotik bir indeks olan Bax/Bcl-2 oranını arttırdığı görülmüştür. Sonuç olarak *S. officinalis*'in hidroalkolik ekstresinin, fare meme karsinomu hücrelerinde sitotoksik ve proapoptotik özellikler gösterdiği tespit edilmiştir (118).

Bu çalışmada, *S. dominica* L.'nin yaprakları, *S. lanigera* Desf.'in toprak üstü kısımları, *S. menthaefolia* Ten.'in kökleri, *S. palaestina* Benth.'in toprak üstü kısımları, *S. sclarea* L.'nin kökleri ve *S. spinosa* L.'nin toprak üstü kısımları olmak üzere altı *Salvia* türünün metanol ham ekstrelerinin *in vitro* antiproliferatif aktivitesinin incelenmesi amaçlanmıştır. Ekstreler, glioblastoma (DBTRG-05MG, T98G, U-87MG), kolorektal adenokarsinoma (WiDr ve HT-29), prostat adenokarsinom (MDA Pca2b), koriokarsinoma (JEG-3), endometrium adenokarsinomu (HEC-1A) ve B limfoblast (CIR) olmak üzere dokuz insan kanseri hücre hattında MTT testi ile olası antitümoral aktivite açısından taranmıştır. IC<sub>50</sub> değerleri, sadece beş ekstre için ve yaklaşık 90 ile 400 mg/ml arasında değiştiği belirlenmiştir. *S. spinosa*, *S. sclarea* ve *S. dominica* ekstreleri hücre türüne bağlı olarak bir derece sitotoksik aktivite sergilerken; *S. menthaefolia* ekstresi, tüm tümör

hücre hatlarına karşı düşük IC<sub>50</sub> değerleri ile belirgin bir anti-proliferatif aktivite göstermiştir. *S. palaestina* ekstresi, sadece üç hücre hattına karşı orta düzeyde bir antiproliferatif etki ortaya koymuştur. *S. lanigera* ekstresi, test edilen tüm konsantrasyonlarda toksik aktivite göstermiştir. Sonuçlar, *Salvia* cinsinin, potansiyel bir antitümör ajanların doğal bir kaynağı olarak kabul edilebileceğinin kanıtını güçlendirmiştir (119).

*S. ballotiflora*'nın hekzanla yıkanmış kloroform ekstresinden 19-deoksiisetekson, 7,20-dihidroanastomosin, isetekson ve 19-deoksiizoisetekson olmak üzere dört diterpen izole edilmiştir. Hekzan ile yıkanmış kloroform ekstresinin ve dört diterpeninin sitotoksik aktivitesi; HeLa (rahim ağzı kanseri), A549 (akciğer kanseri) ve MCF-7 (meme kanseri) olmak üzere üç tümör hücre hattına; J774A.1 (epitel kanseri) ve CT26 (kolon kanseri) olmak üzere iki murin hücre hattına karşı MTT testi kullanılarak test edilmiş ve IC<sub>50</sub> değerleri belirlenmiştir. 19-deoksiizoisetekson, HeLa hücreleri üzerinde 3.2 µg/mL (9.36 µM) IC<sub>50</sub> ile en büyük etkiye sahipken; hekzan ile yıkanmış kloroform ekstresi A549 hücreleri üzerinde 2.29 µg/mL IC<sub>50</sub> ile en iyi sitotoksik etkiye sahip bulunmuştur. 19-Deoksiizoistekson ve hekzanla yıkanmış kloroform ekstresinin bu etkileri, sisplatin (HeLa hücrelerinde IC<sub>50</sub>=1.06 µg/mL ve A549 hücrelerinde 4.6 µg/mL (15.21 µM)) kıyasla benzer aktiviteye sahip bulunmuştur (120).

Bu çalışmanın amacı Çin tıbbi bitkisi olan *S. chinensis*'ten elde edilen polifenolce zenginleştirilmiş ekstrenin antikanser potansiyelini değerlendirmektir. Beş kanser hücresi ve bir normal hücre hattının hücre canlılığını değerlendirmek için MTT testi kullanılmıştır. Buna ek olarak, MiapaCa-2 insan pankreas kanseri (PC) hücrelerinde ekstrenin apoptotik indüksiyonu, hücre döngüsü faz dağılımı, DNA hasarı ve mitokondriyal membran potansiyeli kaybı üzerine etkileri değerlendirilmiştir. Ekstrenin hücre döngüsü fazı dağılımı ve mitokondriyal membran potansiyeli kaybı üzerindeki etkileri sırasıyla propidium iyodür ve rodamin-123 DNA bağlayıcı floresan boyalar kullanılarak akış sitometrisi ile değerlendirilmiştir. Bir boyama maddesi olarak 4',6-diamidino-2-fenilindol kullanılan floresan mikroskopisi, MiapaCa-2 kanser hücrelerinin morfolojik değişikliklerini ve ekstre ile tedavi sonrasında apoptotik cisimlerin varlığını saptamak amacıyla yapılmıştır. Bu çalışmanın sonuçları, *S. chinensis*'in polifenol

bakımından zengin ekstresinin MCF-7 insan meme kanseri hücrelerinde, A549 insan akciğer kanseri hücrelerinde, HCT-116 ve COLO 205 insan kolon kanseri hücrelerinde ve MiapaCa-2 insan pankreas kanseri hücrelerinde güçlü sitotoksositeye neden olduğunu göstermiştir. COLO 205 ve MCF-7 kanser hücre serileri büyüme inhibisyon oranı artış sergileyen ekstreyle tedaviye en duyarlı olanlar olarak görülmüştür. Floresan mikroskopisi, apoptozisin karakteristik morfolojik özelliklerini ortaya çıkarmış ve PC hücrelerinde ekstre ile muameleden sonra apoptotik cisimlerin görünümünü tespit etmiştir. Akış sitometrik analizi, ekstrenin G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> hücre döngüsü durmasını doza bağlı bir şekilde tetiklediğini göstermiştir. Buna ek olarak, ekstre ile yapılan muamele, PC hücrelerinin mitokondriyal membran potansiyelinde önemli ve konsantrasyona bağlı bir azalmaya neden olmuştur (121).

*S. multiorrhiza*, suda çözünen bileşenlerden (salvianolik asit A, salvianolik asit B, salvinal) ve yağda çözünen bileşenlerden (tanshinon I, tanshinon IIA, dihidrotanshinon I, miltiron, kriptotanshinon, ailantolid, neo-tanshinlakton ve azot içeren bileşikler) gibi çeşitli anti-tümör aktif bileşenler içermektedir. Bu anti-tümör aktif bileşenleri, tümörün evrimi, ilerlemesi ve metastazının farklı aşamalarında önemli roller oynamaktadır. Klinik tümör tedavisi için *S. multiorrhiza*'nın uygulanması yeni anti-tümör aktif bileşenlerin keşfine fayda sağlayacaktır (122).

Bu çalışmada geleneksel olarak enflamasyonu ve farklı bağırsak hastalıklarını tedavi etmek için kullanılan endemik bir Ekvador bitkisi olan *S. sagittata* Ruiz&Pav'ın etanol ekstresinin (SSEE) domuz aort endotel hücrelerinin (pAEC) birincil kültürleri üzerindeki etkileri incelenmiştir. pAEC'ler 24 saat boyunca SSEE'nin farklı konsantrasyonlarında (1-200 µg/mL) kültürü yapılmış ve sitotoksitesi MTT testi ile değerlendirilmiştir. SSEE, test edilen herhangi bir konsantrasyonda hücre canlılığı olumsuz etkilememiştir. Hücre döngüsü analiz edilmiş ve önemli bir değişiklik gözlenmemiştir. Daha sonra, SSEE'nin pAEC'ler üzerindeki anti-enflamatuar etkileri, enflamatuar uyarıcı olarak bir lipopolisakkarit (LPS) kullanılarak analiz edilmiştir. Enflamatuar sürece dahil olan sitokinler ve koruyucu moleküller gibi farklı belirteçler, gerçek zamanlı kantitatif PCR ve Western Blot ile değerlendirilmiştir. SSEE, interlökin-6'yı azaltıp ve Heme Oksijenaz-1 protein seviyelerini arttırarak pAEC'nin fizyolojik koşullarını onarma yeteneği göstermiştir. SSEE'nin fitokimyasal bileşimi ayrıca HPLC-DAD ve

spektrofotometrik analizler ile değerlendirilmiştir. Farklı fenolik asitlerin ve flavonoidlerin varlığı, en bol bulunan bileşen olarak rozmarinik asit ile ortaya çıkarılmıştır. SSEE, hem Oksijen Radikal Absorbans Kapasitesi (ORAC) hem de 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) analizleriyle değerlendirilmiş ve ilginç bir antioksidan aktiviteye sahip olduğu görülmüştür. Sonuçlar SSEE'nin *in vitro* antiinflamatuvar etkiye sahip olduğunu göstermektedir (123).

## **2.8. Sitotoksik Aktivite**

### **2.8.1. Kanser**

Kanser giderek önemi artan bir sağlık problemi haline gelmiştir. Ölüm nedeni olarak, kalp ve damar hastalıklarından hemen sonra gelmektedir. Dünyada yaklaşık her yıl 7 milyon insan kansere yakalanmakta ve 5 milyon insan kanser nedeniyle yaşamını yitirmektedir. Türkiye'de ise her yıl 150 bin kişi kansere yakalanmakta ve yaklaşık 400 bin insan da kanserle yaşamaktadır. Dünyadaki ölüm nedenleri arasında 2. sırada olan kanserin 2030 yılında hızla artarak ölüm nedenleri arasında 1. sıraya yükseleceği öngörülmektedir (124). Ülkemiz istatistiklerinde ise bu oran %38 kalp damar hastalıkları ve %29 kanser hastalıkları ile ölümler meydana gelmektedir. Kadınlarda en sık görülen kanser hastalıkları başta meme kanseri olmak üzere, akciğer, uterus ve kolon kanseri olarak görülmektedir. Erkeklerde ise en sık görülen kanser türleri başta akciğer kanseri olmak üzere, bunu prostat, mide ve kolon kanserleri takip etmektedir (125). Günümüzde çoğu kanser çeşidinin kesin tedavisi sadece erken teşhis ile sağlanabilmektedir. Cerrahi, kemoterapi ve radyoterapi sıklıkla uygulanan tedavi yöntemleridir.

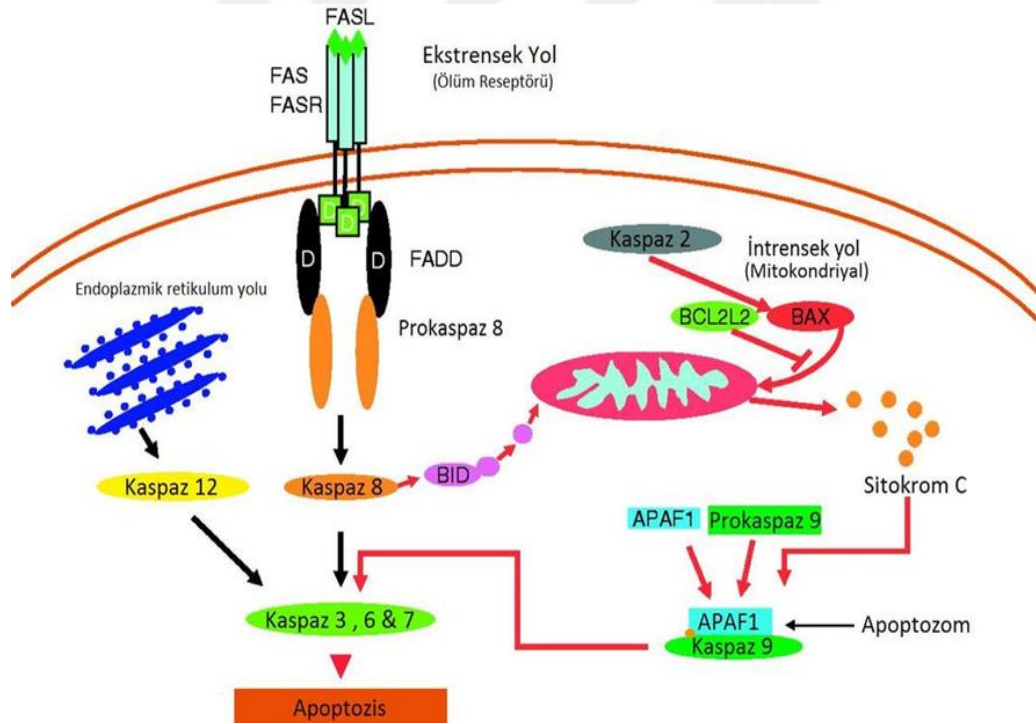
Tüm dünyada bir yandan kanser ve benzeri hastalıkların artması, öte yandan insanların eğitim seviyesinin yükselmesi, internet ve medya sayesinde sağlıklı beslenme ve dolayısıyla antioksidan ve antikanser bileşiklere ve fonksiyonel gıdalara (nutraceuticals) olan ilgi artmıştır. Bu nedenlerle hem koruyucu olarak, hem de hastalıklarla mücadele etmede ve/veya özellikle yaşlı nüfusun yaşam kalitesini arttırabilmek için kullanılacak olan gıda tamamlayıcısı veya hazır gıdalara konan gıda koruyucularının yanı sıra kanser ve yaşlanmayla ilgili rahatsızlıklarda kullanılacak olan ilaçlar için doğal ürünlere olan ilgi çok fazladır. Bu ilgi konuya uzak bilim adamlarının zannetiğinin aksine Amerika, Almanya, Japonya ve Kanada

gibi gelişmiş ülkelerde çok daha da fazladır. Dolayısıyla dünyada bu konularla ilgili araştırmalar hızla sürmektedir (126, 127).

### 2.8.2. Apoptozis

Çok hücreli canlılar, hasarlı hücreler gibi potansiyel tehlike oluşturan ya da gereğinden fazla çoğalmış hücrelerinden kurtulmak zorundadırlar. Böylelikle organizmadaki homeostaziyi, hücre sayısını ve bunun sonucu olarak dokuların boyutlarını belli bir seviyede korumuş olurlar. Bu moleküler mekanizma, programlı hücre ölümü veya apoptozis olarak isimlendirilmektedir (128).

Apoptotik sinyal kaskadı, ekstrinsik ve intrinsik olmak üzere iki farklı yolak ile başlamaktadır (Şekil 2), (129). Ekstrinsik yolak, hücre membranında bulunan reseptörlere çeşitli moleküllerin bağlanmasıyla, intrinsik yolak ise mitokondriyal uyarılar ile başlatılmaktadır (130).



Şekil 2. Apoptoziste intrinsik ve ekstrinsik yolak

### 2.8.3. MTT ve sitotoksik aktivite

Hücre kültürü, laboratuvar ortamında özel tasarlanmış kaplarda çok hücreli organizmalara ait hücrelerin ısı, besin, nem gibi ortam şartlarının kontrol edilerek

kontaminasyondan uzak olarak saf bir şekilde yaşatılmasıdır. Hücre kültürü çalışmalarının tercih edilme sebepleri; insan da dahil olmak üzere herhangi bir canlıdan alınan hücrelerin suni ortamda yaşatılabilmesi, herhangi bir doku ya da organdan alınan hücrelerin kullanılabilmesi ve birçok etik kaygıyı gidermesi olarak bilinmektedir (131). Hücre kültürü; ilaç geliştirilmesi, kanser, aşı ve *in vitro* sitotoksisite çalışmaları alanlarında sıkça tercih edilmektedir (132).

Sitotoksisite terimi, hücre ölümüne sebep olan anlamına gelmektedir. Sitotoksisite araştırmaları, bir maddenin sitotoksik potansiyelinin olup olmadığının belirlenmesi amacıyla yapılmaktadır. Hücre temelli sitotoksisite çalışmaları, hem uygulama kolaylığı, hem de *in vivo* çalışmalardan elde edilen verilerle uyum göstermesi nedeniyle, hayvan deneylerine alternatif olarak doğmuş ve toksikoloji laboratuvarlarında sıkça tercih edilir hale gelmiştir (133).

Sitotoksisite, incelenen maddenin dozuna ve maruziyet süresine bağlı olarak hücrelere değişik derecelerde zarar veren bir olaydır. Hücreler, sitotoksik maddeye maruz kalırsa apoptozis, otofaji ve nekroz gibi olaylar sonucu ölebilir ya da sitostazis nedeniyle proliferasyon özelliklerini kaybedebilirler (134).

Sitotoksisite belirleme metodları genel olarak kolorimetrik, lüminesans ve enzimatik yöntemlerdir. Kolorimetrik metodlarda, 3-(4,5-dimetiltiyazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolyum-bromür (MTT), 3-(4,5-dimetiltiyazol-2-yl)-5-(3-karboksimetoksifenil)-2-(4-sülfofenil)-2H-tetrazolyum (MTS), 2,3-bis-(2-metoksi-4-nitro-5-sülfofenil)-2H-tetrazolyum-5-karboksianilid (XTT), 2-(4-iodofenil)-3-(4-nitrofenil)-5-(2,4-disülfofenil)-2H-tetrazolyum (WST) gibi tetrazolyum tuzları kullanılarak renk değişikliği ya da kristal viyole, nötral kırmızısı gibi boya maddeleri kullanılarak hücrelerin spesifik boyanması esasına dayalı ölçüm yapılmaktadır (135).

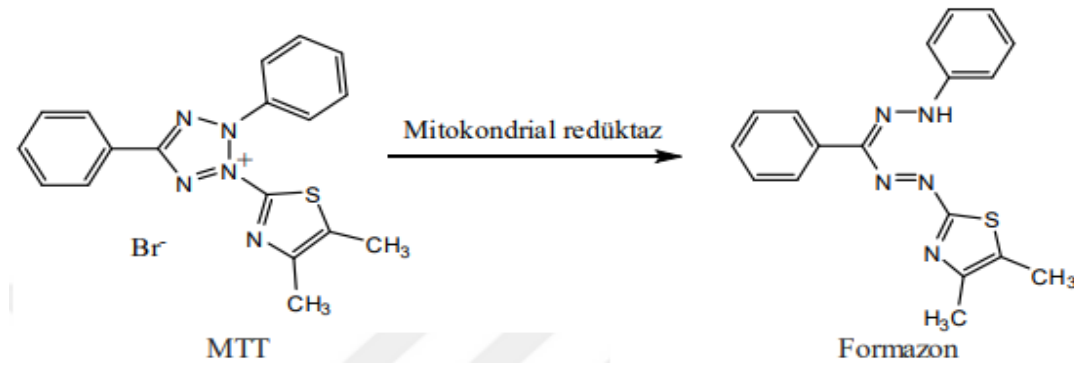
MTT (Metiltiyazoltetrazolium) yöntemi, ilk kez 1983 yılında Mosmann tarafından belirlenmiştir ve hücre kültüründe büyütülen hücrelerdeki mitokondriyal dehidrogenaz enzim aktivitesinin kolorimetrik ölçülmesi esasına dayanmaktadır (134). Tetrazolyum tuzlarının redüksiyonu hücre proliferasyonunu incelemek için güvenilir bir yol olarak kabul edilmektedir. Sarı olan tetrazolyum MTT, metabolik

açından aktif hücreler tarafından dehidrojenaz enzimlerinin etkisiyle kısmen NADH ve NADPH'ye dönüştürülür (137, 138).

Tetrazolyum tuzları, memelilerden mikrobiyal kökenlere kadar değişen hücrelerin metabolik aktivitesini ölçmek için hücre biyolojisinde en yaygın kullanılan araçlardan olmuştur. MTT redüksiyonu yalnızca mitokondri ile ilişkili değildir, aynı zamanda endozom/lizozom bölmesi ve plazma membranı da dahil olmak üzere mitokondriyal membranlarla ve sitoplazma ile de ilişkilidir.

MTT Reaktifi, hücrelerin yokluğunda düşük absorbans değerleri vermektedir. Her bir hücre tipi için hücre sayısı ve üretilen sinyal arasındaki doğrusal ilişki kurulur, böylece hücre çoğalması hızındaki değişikliklerin doğru bir şekilde ölçülmesine izin vermektedir. MTT Reaktifi, kontaminasyon olmaması şartıyla, 18 ay kadar karanlık ortamlarda 4°C'de saklanabilmektedir (136).

MTT redüksiyonu genellikle sitotoksisite testi olarak mitokondriyal dehidrojenaz aktivitesini incelemek için kolorimetrik olarak analiz edilir. Bu enzimatik reaksiyon, hücre refraksiyon oranını arttıran koyu mavi formazan kristalleri üretir (139), (Şekil 3).



**Şekil 3.** MTT'nin Reaksiyon Şeması

Test ölü hücreleri değil yaşayan hücreleri tespit eder ve üretilen sinyal hücrelerin aktivasyon derecesine bağlıdır (136). Daha sonra oluşan bu formazan kristalleri SDS gibi deterjanlar kullanılarak suda çözünür hale getirilerek oluşturdukları renk şiddeti 570 nm dalga boyunda spektrofotometre ile ölçülmektedir (138, 140).

Sonuç olarak; başlangıçta aynı sayıda ekilmiş hiç özüt uygulanmamış kontrol hücrelerindeki renk şiddeti ile reaktife maruz bırakılmış hücrelerdeki renk şiddeti



oranlanarak reaktifte maruz bırakılmış ve hücrelerdeki canlılık oranı (yüzdesi) hesaplanmaktadır (141).

#### **2.8.4. Western blot**

Herhangi bir örnekten elde edilen ve çok sayıda protein içeren bir karışımın içinde istenen tek bir proteini özgün bir şekilde tespit etmek için moleküler biyolojide en yaygın olarak kullanılan yöntemdir. İlgilenilen bir proteinin örnekte bulunup bulunmadığı, bulunuyorsa göreceli olarak farklı gruplar arasındaki miktarı hesaplanabilir. Uygulanan protokol ve kullanılan boyanın çeşidine göre değişmekle birlikte, bu yöntemin kullanılmasıyla membran üzerinde bulunan 5 ng gibi az miktardaki proteinler dahi saptanabilmektedir.

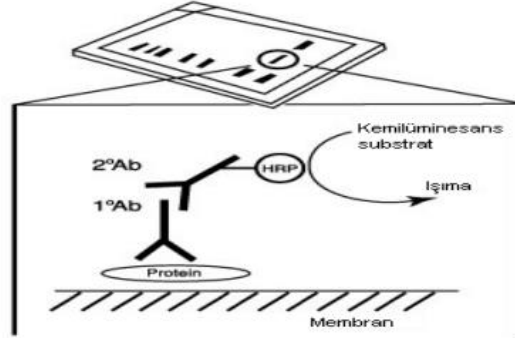
Western blot işleminden önce, örnekte karışım halinde bulunan proteinler genellikle belli oranda bir ön ayırma tabii tutulur. Bu sayede elde edilen parametreler aranan proteinin tespitinde kullanılır. Bu ayırım moleküler ağırlıklarına (SDS-PAGE, elektroforez), büyüklüklerine ve yüklerine (doğal PAGE), izoelektrik noktasına veya moleküler ağırlık ve izoelektrik noktasının her ikisine (2D-PAGE) göre olabilir. Ayrıca istenirse ve çalışma için gerekliyse kromatografik yöntemlerle ön ayırım sağlanıp daha sonra jele yüklenebilir.

Western blot işlemi birbirini takip edecek şekilde; proteinlerin membrana aktarımı, bloklama, birincil antikor uygulanması, ikincil antikor uygulanması ve görüntüleme olmak üzere temelde beş basamaktan oluşmaktadır.

İlk basamakta, jelde ayrılan proteinler membrana aktarılır ve sonrasındaki bütün işlemler bu membran üzerinde gerçekleştirilir. Jel yerine membran kullanılmasının önemli avantajları vardır:

- Kullanılan antikorlar (veya diğer maddeler) membran yüzeyindeki proteinlerle çok daha kolay etkileşime girerler. Bu şekilde, jelin içine gömülü olduğu için saptanamayacak az miktardaki proteinler de, membrana aktarıldığında ince bir yüzeyin üzerinde toplanacaklarından tespit edilebilir hale gelirler.
- Yapılan işlemler jelle karşılaştırıldığında çok daha kısa sürede ve daha az madde harcanarak gerçekleştirilir.

- Membranlar jele göre daha dayanıklıdır ve uzun süre rahatlıkla saklanabilirler.



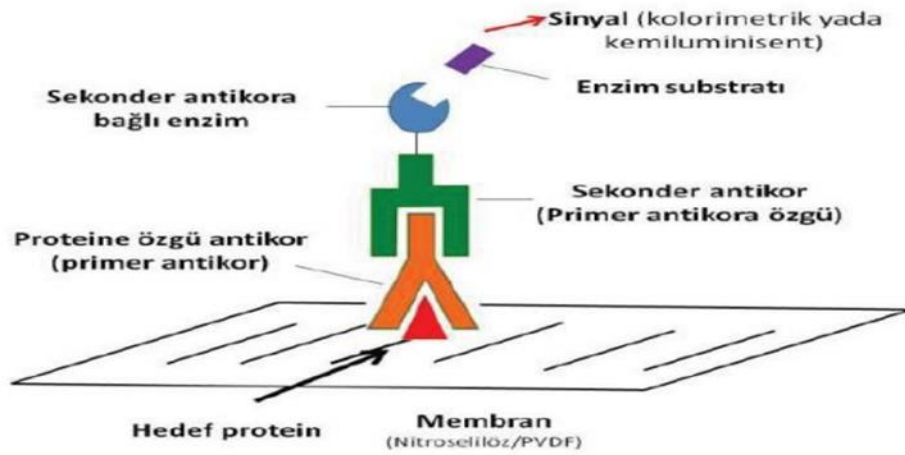
**Şekil 4.** Western blot yönteminin temelini oluşturan antikor etkileşimlerinin şematik gösterimi

Aktarımda, farklı yük ve bağlama özelliklerinde çeşitli tipte membranlar kullanılabilir. Bunlar arasında en çok kullanılan ikisi, negatif yüklü olan nitroselüloz ve polivinilidinden diflorür (PVDF) membrandır. Nitroselüloz membranda proteinlerin bağlanmasında hidrofobik ve elektrostatik etkileşimler rol oynar. Kapasitesi yüksek ve maliyeti düşüktür, ancak kırılabilirliği fazladır. PVDF membranda proteinlerin bağlanmasında hidrofobik etkileşimler rol oynar. Kapasitesi ve maliyeti yüksektir ancak asitlere ve organik çözücülere daha dayanıklıdır ve dizileme ve amino asit analizleri için daha uygundur. Ayrıca membran üzerindeki antikorlar temizlenip farklı antikorlarla muamele edilerek aynı membranın birden fazla kullanılabilmesi de söz konusudur. Proteinlerin membrana aktarımı pasif (kapiler) emdirim ve elektro-emdirim (electro-blotting) olmak üzere temelde iki yöntemden biriyle yapılabilir.

İkinci basamak olan bloklama işleminde amaç membrana aktarılan proteinlerin dışındaki boşlukların kapatılmasıdır. Bu sayede yine protein yapısında olan antikorların membranın boş kısımlarına bağlanması en aza indirgenmiş olur ve proteinlere bağlanma oranı da en üst seviyeye çıkarılır. Bu amaçla, kullanılan membranın özelliğine ve uygulanan protokole göre çeşitli bloklama tamponları/çözeltileri kullanılabilir. Bloklama için genellikle protein ajanlar tercih edilir. Bunlardan en çok kullanılanlar sığır serum albümini (BSA), yağsız süt tozu, Tween-20 ve genellikle tercih edilmemekle birlikte jelatindir.

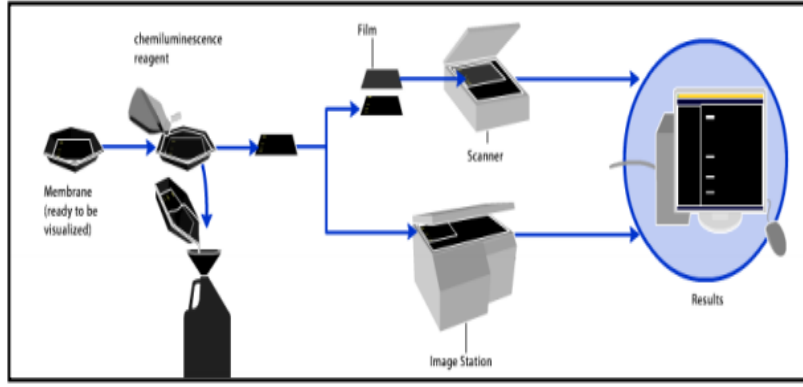
Bu aşamadan sonra membran ilgilenilen proteine özgü birincil antikor (IgG) ile muamele edilip, membrandaki proteinlerin antikor ile reaksiyona girmesi sağlanmış olur. Birincil antikor seçilirken hedeflenen proteine karşı üretilmiş ve üzerinde çalışılan organizmaya uygun olmasına dikkat edilmelidir. Ancak herhangi bir organizmada üretilen bir antikor diğer canlılarda da çapraz reaksiyon göstererek çalışabilir. Bu bilgi firmaların bilgi kağıtlarında yer almaktadır.

Daha sonra da, renkli bir ürün oluşturabilen bir enzim [alkalin fosfataz ya da yabancu peroksidazı (HRP)] bağlı veya radyoaktif işaretli ikincil antikor (anti-IgG) ile muamele ederek ikincil antikorun, hedef proteine bağlanmış olan birincil antikorlarla etkileşime girmesi sağlanır (Şekil 5). İkincil antikor seçilirken kullanılan birincil antikor ile uyumlu olmasına dikkat edilmelidir. Örneğin kullanılan birincil antikor tavşanda (rabbit) üretilip elde edilmişse, ikincil antikor anti-tavşan (anti-rabbit) olmalıdır. İkincilin hangi organizmada üretildiği önemli değildir, önemli olan birincil antikorun elde edildiği organizmanın IgG'leri için anti-özelliğe olmasıdır (Örneğin goat anti-rabbit olabilir. Yani keçide üretilmiştir ve antijen olarak tavşan IgG'si kullanılmıştır).



**Şekil 5.** Western blot yönteminin bloklama, birincil ve ikincil antikor basamakları

Son olarak da membran görüntülenir ve ardından bilgisayar ortamında kaydedilir veya film olarak basılır (Şekil 6). İkincil antikora bağlanmış enzimler için geliştirilen kemilüminesans özellikteki substratlar (luminol gibi) duyarlılığı önemli ölçüde arttırmaktadır. Saptama radyoaktif işaretleme ile de sağlanabilmektedir (142, 143).



Şekil 6. Membranın görüntülenmesi



### 3. GEREÇ VE YÖNTEM

#### 3.1. Bitkisel Materyallerin Toplanması ve Teşhis Edilmesi

Çalışılan bitkilerin ilk arazisine 12-17 Mayıs 2015 tarihinde Elazığ ve Malatya yöresine yapılan arazi çalışması ile başlandı. Yapılan floristik arazi çalışmasında *S. cerino-pruinosa* Rech var. *cerino-pruinosa*, *S. cerino-pruinosa* Rech var. *elazigensis* A. Kahraman, F.Celep ve Dogan, *S. pseudeuphratica* Rech., türlerine ait lokalitelere gidildi. İlk etapta *S. cerino-pruinosa* Rech var. *cerino-pruinosa*, türünün yeri "B7 Elazığ: 12. km Elazığ' dan Pertek' e, Kireçtaşlı yamaçlar, 991 m, 38°46'26" N, 39°12'29" E" lokasyonunda tespit edildi. Aynı arazi çalışmasında *S. cerino-pruinosa* Rech var. *elazigensis* A. Kahraman, F.Celep ve Dogan türü" B7 Elazığ: 20. km Elazığ'dan Pertek'e, Kireçtaşlı yamaçlar, 1010 m, 38°49'12" N, 39°13'02" E" adresinde tespit edildi ve çiçek açmadığı için örnek toplanmadı. *S. pseudeuphratica* Rech. türü ise bütün lokalitelerinde yapılan aramalara rağmen bulunamadı.

Çalışılan bitkilerin ikinci arazisine 02-07 Temmuz 2015 tarihinde Elazığ, Malatya, yöresine yapılan arazi çalışması ile devam edildi. *S. cerino-pruinosa* Rech var. *cerino-pruinosa*, *S. cerino-pruinosa* Rech var. *elazigensis* A. Kahraman, F.Celep & Dogan, *S. pseudeuphratica* Rech., türlerine ait lokaliteler gezildi, çiçek örnekleri alındı ve arazi gözlemi yapıldı.

Çalışılan bitkilerin üçüncü arazisine 13-23 Temmuz 2015 tarihinde Elazığ, Malatya, Erzurum ve Kars yöresine yapılan arazi çalışması ile başlandı. İlk olarak *S. cerino-pruinosa* Rech var. *cerino-pruinosa* yapılan arazi taramalarında " B7 Elazığ: 12. km Elazığ'dan Pertek'e, Kireçtaşlı yamaçlar, 991 m, 38°46'26" N, 39°12'29" E, 16 Temmuz 2015, M. Fırat 32538 (VANF)" lokasyonunda, bitkiden 5 kg alınarak sağlıklı bir şekilde kurutuldu ve Herbarium örnekleri M.Fırat dubletleri ile Yüzüncü Yıl Üniversitesi Fen Fakültesi Herbariumuna (VANF) konuldu. İkinci arazide ise *S. cerino-pruinosa* Rech var. *elazigensis* A. Kahraman, F.Celep & Dogan, yapılan arazi taramalarında" B7 Elazığ: 20. km Elazığ'dan Pertek'e, Kireçtaşlı yamaçlar, 1010 m, 38°49'12" N, 39°13'02" E, 16 Temmuz 2015, M. Fırat 32539 (VANF)" lokasyonunda, bitkiden 5 kg alınarak sağlıklı bir şekilde kurutuldu ve Herbarium örnekleri M. Fırat dubletleri ile Yüzüncü Yıl Üniversitesi Fen Fakültesi Herbariumuna (VANF) konuldu. Üçüncü olarak *S. pseudeuphratica* Rech., yapılan

arazi taramalarında" B7 Elazığ: Kaban ile Maden arası, Keban'a 5 km kala, Kayalık-taşlık kalkerli yamaçlar, 890 m, 38°46'57" N, 38°46'15" E, 14 Temmuz 2015, M. Fırat 32584 (VANF)" lokasyonunda, bitkiden 5 kg alınarak sağlıklı bir şekilde kurutuldu ve herbaryum örnekleri M. Fırat dubletleri ile Yüzüncü Yıl Üniversitesi Fen Fakültesi Herbaryumuna (VANF) konuldu. *S. rosifolia* Sm. yapılan arazi taramalarında " A9 Kars, Kağızman, Arpaça ile Cumaçay arası, Kayalık kireçtaşı ve volkanik yamaçlar, 1587 m, 40°05'28" N, 43°16'55" E, 13 Temmuz 2015, M. Fırat 32536 (VANF)" lokasyonunda, bitkiden 5 kg alınarak sağlıklı bir şekilde kurutuldu ve Herbaryum örnekleri M.Fırat dubletleri ile Yüzüncü Yıl Üniversitesi Fen Fakültesi Herbaryumuna (VANF) konuldu.

Çalışılan bitkilerin dördüncü arazisine 20-26 Temmuz 2015 tarihinde Hakkari yöresine yapılan arazi çalışması ile başlandı. *S. siirtica* Kahraman, Celep & Doğan bitki örnekleri "C9 Hakkari, Meskan dağı, Ağaçlık meşelik alanlar, 1456 m, 37°29'47" N, 43°31'36" E, 23 Temmuz 2015, M. Fırat 32599 (VANF)" lokasyonunda, bitkiden 5 kg alınarak sağlıklı bir şekilde kurutuldu ve herbaryum örnekleri M.Fırat dubletleri ile Yüzüncü Yıl Üniversitesi Fen Fakültesi Herbaryumuna (VANF) konuldu.

Çalışılan bitkilerin beşinci arazisine 18-28 Eylül 2015 tarihinde Şırnak-Siirt, Elazığ yöresine yapılan arazi çalışması ile başlandı. İlk olarak *S. kurdica* Boiss. & Hohen. ex Bentham, yapılan arazi taramalarında "C9 Şırnak, Silopi: Cudi Dağı' nın güney eteklerindeki Hessana bölgesi, Kireçtaşı uçurumlar ve taşlık tepelerin kenarları, 999 m, 37°20'56" N, 42°25'38" E, 19 Eylül 2015, M. Fırat 32614 (VANF)" lokasyonunda, bitkiden 5 kg alınarak sağlıklı bir şekilde kurutuldu ve Herbaryum örnekleri M. Fırat dubletleri ile Yüzüncü Yıl Üniversitesi Fen Fakültesi Herbaryumuna (VANF) konuldu. Sonuç olarak 6 tür toplandı (Tablo 1 ve Resim 1).

- 1-*S. cerino-pruinosa* Rech var. *cerino-pruinosa*,
- 2-*S. cerino-pruinosa* Rech var. *elazigensis* A. Kahraman, F.Celep & Dogan,
- 3- *S. pseudeuphratica* Rech.,
- 4- *S. siirtica* Kahraman, Celep & Doğan
- 5- *S. rosifolia* Sm.
- 6-*S. kurdica* Boiss. & Hohen. ex Bentham

**Tablo 1.** Çalışılan *Salvia* Türleri, Toplanma Yerleri ve Herbarium Numaraları

Türü	Toplanma Yeri	Toplanma Zamanı	Herbarium Numarası
<i>S. cerino-pruinosa</i> Rech var. <i>cerino-pruinosa</i>	B7 Elazığ: 12. km Elazığ dan Pertek e, Kireçtaşı yamaçlar, 991 m, 38°46'26" N, 39°12'29" E	16 Mayıs 2015	M. Fırat 32538 (VANF)
<i>S. cerino-pruinosa</i> Rech var. <i>elazigensis</i> A. Kahraman, F.Celep & Dogan	B7 Elazığ: 20. km Elazığ dan Pertek e, Kireçtaşı yamaçlar, 1010 m, 38°49'12" N, 39°13'02" E	16 Mayıs 2015	M. Fırat 32539 (VANF)
<i>S. pseudeuphratica</i> Rech.	B7 Elazığ: Keban ile Maden arası, Keban' a 5 km kala, Kayalık-taşlık kalkerli yamaçlar, 890 m, 38°46'57" N, 38°46'15" E	14 Temmuz 2015	M. Fırat 32584 (VANF)
<i>S. siirtica</i> Kahraman, Celep & Doğan	C9 Hakkâri, Meskan dağı, Ağaçlık meşelik alanlar, 1456 m, 37°29'47" N, 43°31'36" E	15 Temmuz 2015	M. Fırat 32599 (VANF)
<i>S. rosifolia</i> Sm.	A9 Kars, Kağızman, Arpaça ile Cumaçay arası, Kayalık kireçtaşı ve volkanik yamaçlar, 1587 m, 40°05'28" N, 43°16'55" E	13 Temmuz 2015	M. Fırat 32536 (VANF)
<i>S. kurdica</i> Boiss. & Hohen. ex Bentham	C9 Şırnak, Silopi: Cudi Dağı'nın güney eteklerindeki Hessana bölgesi, Kireçtaşı uçurumlar ve taşlık tepelerin kenarları, 999 m, 37°20'56" N, 42°25'38" E	19 Eylül 2015	M. Fırat 32614 (VANF)



*Salvia cerino-pruinosa* Rech var. *cerino-pruinosa*



*Salvia cerino-pruinosa* Rech var. *elazigensis* A. Kahraman, F.Celep & Dogan



*Salvia pseudeuphratica* Rech.





*Salvia siirtica* Kahraman, Celep & Doğan



*Salvia rosifolia* Sm.



*Salvia kurdica* Boiss. & Hohen. ex Bentham

**Resim 1.** Toplanan *Salvia* türlerinin fotoğrafları

## 3.2. Sitotoksosite Deneyleri

### 3.2.1. Hücre seçimi ve kültürü

Bu çalışmada insan kaynaklı kanserli hücre serileri ve Primary Dermal Fibroblasts (PDF) serisi kullanıldı. Bu amaçla meme kanseri hücre serisi (MCF-7/HTB-22), kolon kanseri serisi (HT-29/HTB-38) ve Primary Dermal Fibroblasts serisi (PCS-201-012) ATCC' den temin edildi. Hücre serilerinin moleküler ve biyokimyasal analizleri yapabilecek yeterli sayıya ulaşabilmeleri ve daha sonraki çalışmalarda kullanılmak amacıyla dondurulabilmeleri için kültürleri yapıldı. Hücre serileri %10' luk FBS, 2mM L-Glutamin ve 100 birim/mL penisilin/streptomisin içeren tam medium DMEM içinde hücre kültürü ortamında çoğaltıldı. MCF-7 hücreleri için DMEM'e ayrıca 0,01 mg/mL insan rekombinant insülini ilave edildi. Hücre kültürleri, 37 °C, %5' lik CO<sub>2</sub>' li nemli ortamda (Thermo Steri-Cycle 371) tutuldu. MCF-7 ve HT-29 haftada üç kez, Primary Dermal Fibroblasts haftada 2 kez 130 g'de 7 dakika santrifüj edilerek hücreler steril kabin içerisinde 3x10<sup>6</sup> hücre/mL miktarda seyreltilerek pasajları yapıldı. Ayrıca, hücre serilerinin ileride yapılacak olası çalışmalar sebebiyle saklanması için 2x10<sup>6</sup> hücre, %70 DMEM, %20 FBS ve %10 Dimetil sülfoksit' ten (DMSO) (Sigma-Aldrich) oluşan soğutulmuş solüsyon içerisinde 1 gün -80 °C' bekletildikten sonra sıvı azotta muhafaza edildi.

### 3.2.2. Örneklerin hücre proliferasyonu üzerindeki etkilerinin araştırılması

*Salvia* türlerinden elde edilen aktif ekstreler, kültürleri yapılan Primary Dermal Fibroblasts ve kanser hücrelerinin (MCF-7 ve HT-29) proliferasyonu üzerindeki etkileri MTT Hücre Proliferasyon Kiti (Sigma) kullanılarak ve firmanın kullanım talimatlarına uyularak yapıldı (144). Ön çalışma yapılarak her hücre serisi için plakalara yerleştirilecek hücre sayısının optimizasyonu sağlandı. MCF-7 için 22.000, HT-29 için 20.000, Primary Dermal Fibroblasts için 12.000 hücre 96-kuyucuklu plakalara yerleştirildi ve 37 °C, %5' lik CO<sub>2</sub>' li nemli ortamda (Thermo Steri-Cycle 371) hücrelerin plakaya yapışması için 24 saat bekletildi. 24 saat sonra, hücreler 10 µL farklı konsantrasyonlarda hazırlanan ekstreler ile 48 ve 72 saat muamele edildi. 48 ve 72 saatlik muameleden sonra, hücreler 10 µL MTT solüsyonu ile 4 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında koyu mavi renkte formazan boyası oluştu. Hücrelere kitle birlikte gelen çözünme tamponundan 100 µL ekleyip 37 °C, %5' lik CO<sub>2</sub>' li

nemli ortamda (Thermo Steri-Cycle 371) 24 saat beklettikten sonra formazan boyasının 570 ve 690 (referans) nm de absorbansları plate okuyucu (Thermo/MultiscanGo) ile ölçüldü. 690 nm deki ölçümler referans absorbanslar olarak kullanıldı. MTT testi her bir konsantrasyon için 2 paralel olarak gerçekleştirildi ve her bir MTT testi 3 defa tekrarlandı. Bu çalışmada farklı konsantrasyonlarda kullanılan ekstralar etanolde çözüldüğünden (-) kontrol olarak %1'lik etanol çözeltisi, hücreleri öldürdüğü için (+) kontrol olarak %10'luk DMSO kullanıldı.

### **3.3. Gen Ekspresyonu Çalışmaları**

#### **3.3.1. Western blot için hücrelerin ekimi**

$2 \times 10^6$  hücre (HT-29, MCF-7 ve PDF) 3 mL tam besiyeri DMEM içerisinde doku kültürü için uygun olan 6 kuyucuklu plakalara yerleştirildi. Hücre ekiminden sonra 6 kuyucuklu plakalar 37 °C de, %5' lik CO<sub>2</sub>' li nemli ortamda 24 saat bekletildi. Hücreler majör bileşen olma veya antioksidan ve MTT yönteminde sitotoksik yönden aktif olduğu belirlenen 8 saf madde (25 ppm konsantrasyonda) ile muamele edildi ve kontrol grubu olarak hücrelere saf maddeler etanolde çözüldüğü için %1 oranında etanol uygulaması yapıldı. Hücreler 48 saat 37 °C de, %5' lik CO<sub>2</sub>' li nemli ortamda inkübasyona bırakıldı ve inkübasyon süresi tamamlandıktan sonra hücre lizatları hazırlandı.

#### **3.3.2. Western blot için hücre lizatlarının hazırlanması**

Hücre lizatları aşağıdaki protokol takip edilerek yapıldı.

1. 6 kuyucuklu plakalar buz üzerine taşındı.
2. Kuyucuklara yapışık bir şekilde bulunan hücreler 5 mL soğuk PBS ile yıkandıktan sonra hücreler 5 mL soğuk PBS içerisinde hücre kazıyıcı ile kazılarak ve pipetleyerek kuyucuklardan kaldırıldı. Sonrasında 15 mL falkon içerisine aktarıldı.
3. Tüpler 3000 rpm' de 3 dk santrifüj edilip hücrelerin çöktürülmesi sağlandı ve hücre peletine zarar vermeden sıvı kısım uzaklaştırıldı.
4. İçinde hücre peleti bulunan tüpler buz üzerine taşındı ve bundan sonraki işlemler buz üzerinde gerçekleştirildi.

5. Sıvı uzaklaştırıldıktan sonra pelet üzerine proteaz-fosfat inhibitör kokteyli (Thermo Fischer) ve nükleaz (Millipore) içeren soğuk RIPA buffer (160 µL) (Sigma Aldrich) eklendi.

6. Önce pipet ile sonra vortekslenerek karıştırılan örnekler buzun üzerinde 1 saat bekletilerek liziz edildi.

7. Protein karışımı içindeki toplam protein miktarı BCA protein assay kiti (Thermo Scientific Pierce) kullanılarak ölçüldü. Kitin kullanma talimatına uyularak BSA (Bovine Serum Albumine) standartları kullanıldı ve 562 nm' de ölçüm yapılarak µg/mL deki total protein konsantrasyonu belirlendi.

### **3.3.3. Western blot için protein örneklerinin jelde ayrımı ve membrana transferi**

1. Bütün protein örneklerinin ayrımı %10' luk TGX stain-free fast cast atanşinonlamid jel (Bio-Rad) üzerinde Mini Protean Tetra Cell apparatus sistemi (Bio-Rad) kullanılarak yapıldı.

2. Protein örnekleri 1×SDS yükleme tamponu [%2 (w/v) SDS, % 5(v/v) gliserol, %0.01 (w/v) bromfenol mavisi, %8 (w/v) DTT] içinde hazırlandı ve 95 °C de 5 dk ısıtıldı.

3. İlgili eşit miktardaki (20 µg) ve eşit hacimdeki (30 µL) proteinler %10' luk TGX stain-free fast cast atanşinonlamid jel üzerine yüklendi ve 300 V' da 20 dk SDS yürütme tamponu (2.4 mM Tris, 19.2 mM glisin, %0.01 (w/v) SDS) içerisinde elektroforez edildi.

4. Ayrılmış proteinler jelden PVDF membrana transfer edildi (Bio-Rad, Transfer pack).

5. Membranlar %5' lik yağsız süt tozu (PBS-Tween içerisinde hazırlanmış) içerisinde çalkalayıcı üzerinde 1 saat oda sıcaklığında bloke edildi.

6. Bloke edilen membranlar %5'lik süt tozu PBS-Tween içerisinde 1/1000 oranında hazırlanan primer antikorlar (anti B-actin, anti-Bax ve anti-Bcl-2) ile çalkalayıcı üzerinde oda sıcaklığında 2 saat inkübe edildi.

**7.** Membranlar 3 kez 10 dk PBS-Tween ile yıkandıktan sonra sekonder antikorlar (HRP-conjugated anti-mouse ve anti-rabit, 1/10000 oranında PBS-Tween içinde hazırlanmış) ile bir saat oda sıcaklığında çalkalayıcı üzerinde inkübe edildi.

**8.** Membranlar 3 kez 10 dk PBS-Tween ile yıkandıktan sonra, proteinler, ECL (enhanced chemiluminiscent) (Bio-Rad) metoduna göre görüntüleme cihazı (Bio-Rad ChemiDoc MP) kullanılarak görüntülendi.

**9.** İnternal kontrol olarak GAPDH antikoru kullanıldı.



## 4. BULGULAR

### 4.1. Sitotoksosite Deneyleri

#### 4.1.1. Ekstrelerin sitotoksosite sonuçları

Çalışılan 6 *Salvia* türünün kloroform ve etanol ekstralarının sitotoksik aktivitesi MTT metoduna göre belirlendi (Şekil 7-78). Tüm örneklerde genel olarak artan konsantrasyonla hücre canlılığının azaldığı izlenmektedir. *S. cerino-pruinosa* var. *cerino-pruinosa* türünün kloroform ve etanol ekstralarının fibroblast, HT-29 ve MCF-7 hücre serilerine karşı sitotoksik aktivitesi şekil 7-18’de verilmiştir. *S. cerino-pruinosa* var. *cerino-pruinosa* türünün kloroform ekstresi canlı fibroblast hücrelerini belli bir konsantrasyonun üstünde öldürdüğü görülmektedir (Şekil 7-8). *S. cerino-pruinosa* var. *cerino-pruinosa* türünün kloroform ekstresi (SCC-KK) 100 µg/mL konsantrasyonun üstünde HT-29 hücre serilerine karşı sitotoksik aktivite gösterdiği tespit edildi. 72 saat sonuçlarının 48 saat sonuçlarına göre daha iyi olduğu görülmektedir. Bu türün etanol ekstresinin ise HT-29 hücrelerine karşı 48 saatte hiç aktivite göstermediği 72 saatte ise ancak 500 µg/mL konsantrasyonda orta derecede aktif olduğu tespit edildi. Bu türün kloroform ekstresinin MCF-7 hücrelerine karşı 48 saatte 500 µg/mL ve 72 saatte 250 µg/mL konsantrasyonda sitotoksik aktiviteye sahip olduğu tespit edildi. Bu türün etanol ekstresinin hiçbir konsantrasyonda MCF-7 hücrelerine karşı sitotoksik aktivite göstermediği belirlendi.

*S. cerino-pruinosa* var. *elazigensis* türünün kloroform ve etanol ekstralarının fibroblast, HT-29 ve MCF-7 hücre serilerine karşı sitotoksik aktivitesi Şekil 19-30’da verilmiştir. *S. cerino-pruinosa* var. *elazigensis* türünün kloroform ekstresinin 100 µg/mL’den daha yüksek konsantrasyonlarda fibroblast, HT-29 ve MCF-7 hücreleri üzerine sitotoksik etki gösterdiği belirlendi. Sadece 100 µg/mL konsantrasyonda 72 saatte sağlıklı fibroblast hücreleri canlılık oranında hiç azalma olmazken, HT-29 hücrelerinde ise canlılığın %37.08’e kadar düştüğü görülmektedir. Etanol ekstresinin ise sağlıklı fibroblast hücreleri üzerinde toksik etki göstermemesinin yanı sıra hücre canlılığını arttırdığı tespit edildi. Etanol ekstresinin 48 ve 72 saatte sadece 500 µg/mL konsantrasyonda sağlıklı fibroblast hücrelerine çok zarar vermediği, HT-29 ve MCF-7 hücrelerine ise sitotoksik etki gösterdiği belirlendi.

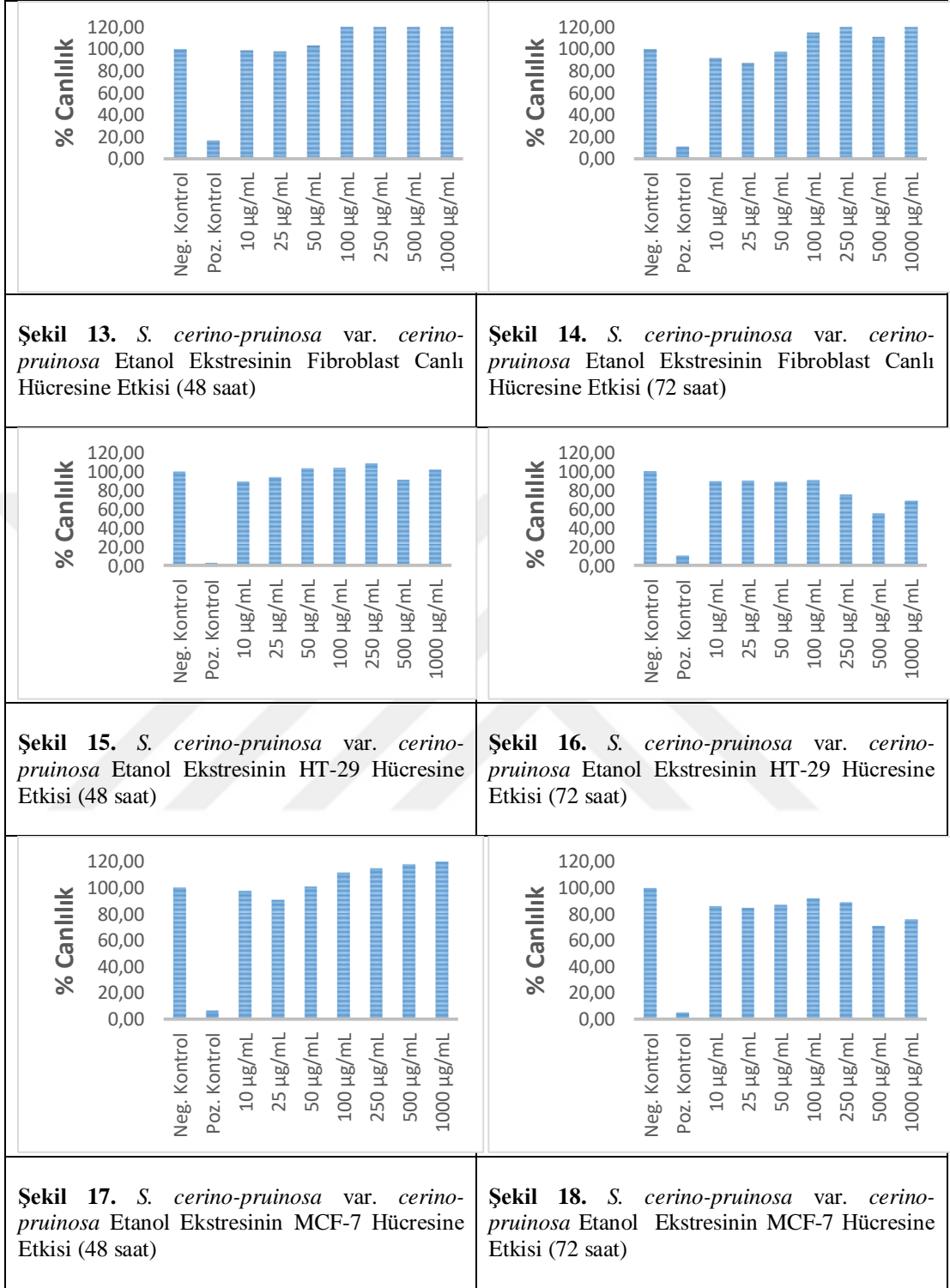
*S. pseudeuphratica* türünün kloroform ve etanol ekstralarının fibroblast, HT-29 ve MCF-7 hücre serilerine karşı sitotoksik aktivitesi Şekil 31-42'de verilmiştir. *S. pseudeuphratica* türünün kloroform ekstresinin 100 µg/mL'den daha yüksek konsantrasyonlarda fibroblast, HT-29 ve MCF-7 hücreleri üzerine sitotoksik etki gösterdiği belirlendi. Sadece 100 µg/mL konsantrasyonda 72 saatte sağlıklı fibroblast hücreleri canlılık oranında çok az azalma olurken, HT-29 hücrelerinde ise canlılığın %36.58'e kadar düştüğü görülmektedir. Etanol ekstresinin ise 72 saatte 100 µg/mL konsantrasyonda sağlıklı fibroblast hücrelerinde hiç toksik etki göstermediği belirlenirken, HT-29 hücrelerinin canlılık yüzdesini %56.35'e ve MCF-7 hücrelerinde ise canlılığı %64.48'e düşürdüğü tespit edildi.

*S. siirtica*, *S. rosifolia* ve *S. kurdica* türlerinin kloroform ve etanol ekstralarının fibroblast, HT-29 ve MCF-7 hücre serilerine karşı sitotoksik aktivitesi Şekil 43-78'de verilmiştir. Yine bu türlerin de kloroform ve etanol ekstralarının ancak yüksek konsantrasyonlarda HT-29 ve MCF-7 hücre serilerine karşı sitotoksik etki gösterdiği tespit edildi. Fakat ekstraların bu konsantrasyonlarda sağlıklı fibroblast hücre serisi üzerinde de sitotoksik etki gösterdiği belirlendi.

Çalışılan 12 ekstrenin sonuçlarına genel olarak bakıldığında ancak yüksek konsantrasyonlarda HT-29 ve MCF-7 hücre serilerine karşı sitotoksik etki gösterdiği belirlendi. Ancak bu konsantrasyonlarda sağlıklı fibroblast hücre serisine karşı da toksik etki gösterdiği belirlendi. Ayrıca etanol ekstresinin kloroform ekstresine göre hem sağlıklı fibroblast hem de HT-29 ve MCF-7 hücre serilerine karşı düşük sitotoksik etki gösterdiği belirlendi (Şekil 7-78).

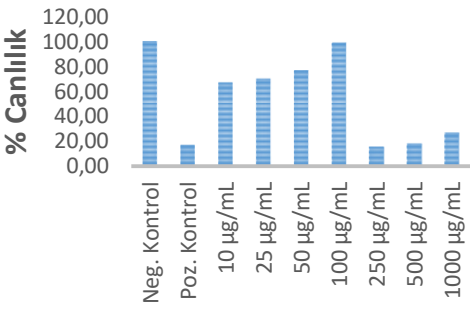
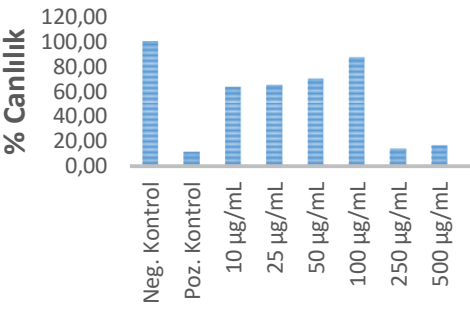
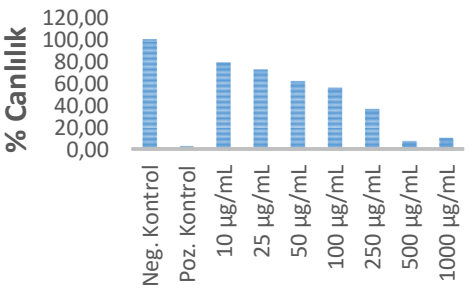
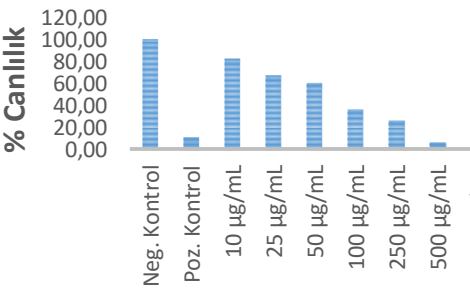
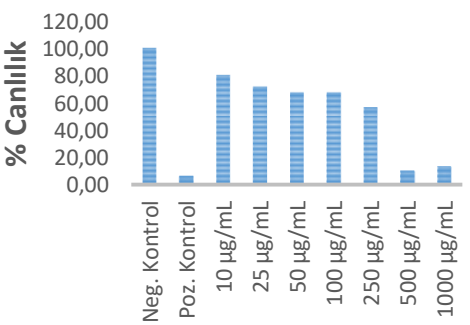
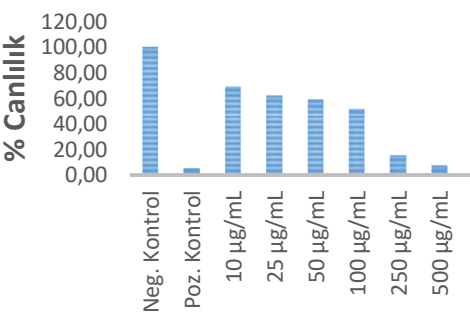
<p><b>Şekil 7.</b> <i>S. cerino-pruinosa</i> var. <i>cerino-pruinosa</i> Kloroform Ekstresinin Fibroblast Canlı Hüresine Etkisi (48 saat)</p>	<p><b>Şekil 8.</b> <i>S. cerino-pruinosa</i> var. <i>cerino-pruinosa</i> Kloroform Ekstresinin Fibroblast Canlı Hüresine Etkisi (72 saat)</p>
<p><b>Şekil 9.</b> <i>S. cerino-pruinosa</i> var. <i>cerino-pruinosa</i> Kloroform Ekstresinin HT-29 Hüresine Etkisi (48 saat)</p>	<p><b>Şekil 10.</b> <i>S. cerino-pruinosa</i> var. <i>cerino-pruinosa</i> Kloroform Ekstresinin HT-29 Hüresine Etkisi (72 saat)</p>
<p><b>Şekil 11.</b> <i>S. cerino-pruinosa</i> var. <i>cerino-pruinosa</i> Kloroform Ekstresinin MCF-7 Hüresine Etkisi (48 saat)</p>	<p><b>Şekil 12.</b> <i>S. cerino-pruinosa</i> var. <i>cerino-pruinosa</i> Kloroform Ekstresinin MCF-7 Hüresine Etkisi (72 saat)</p>

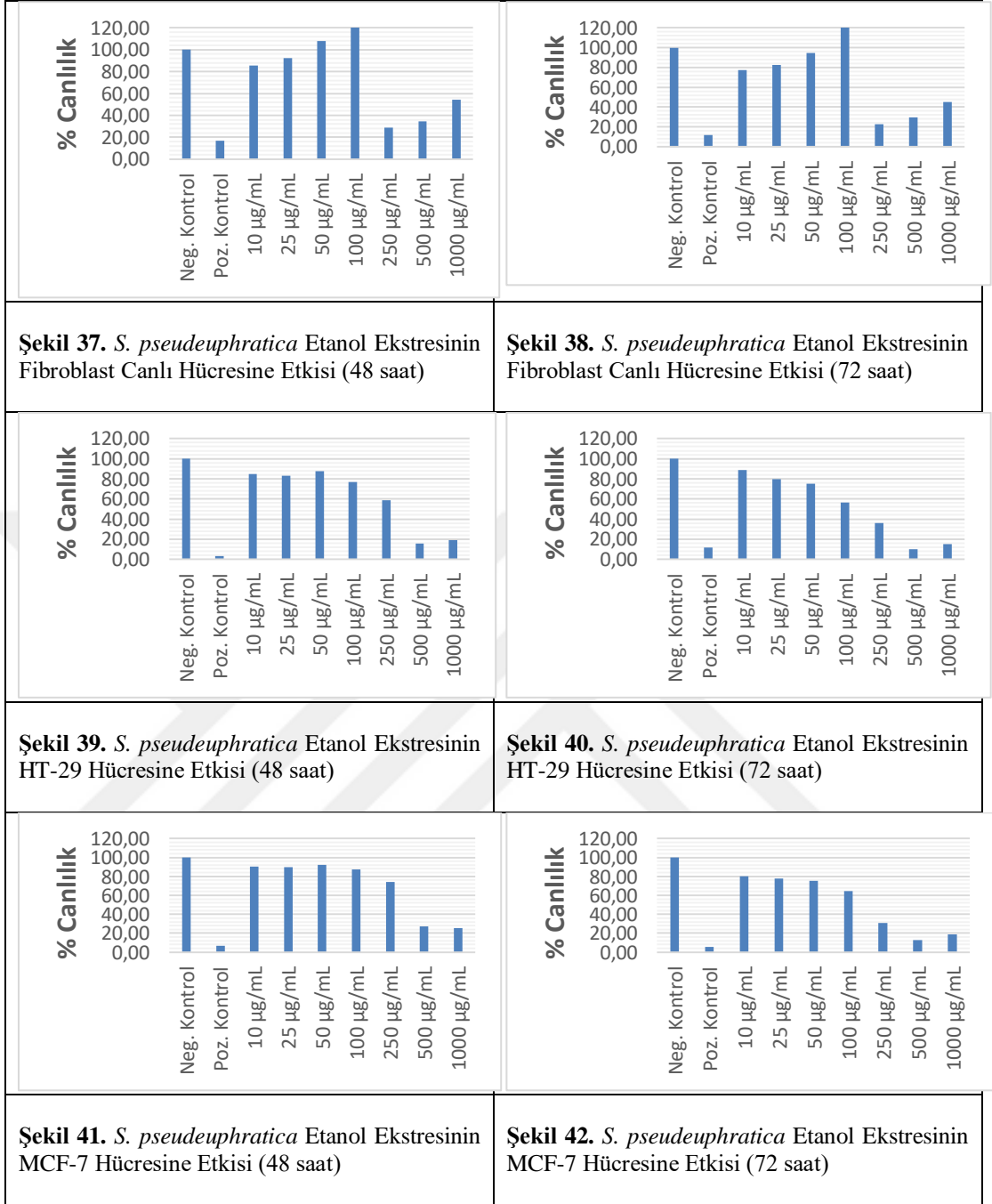




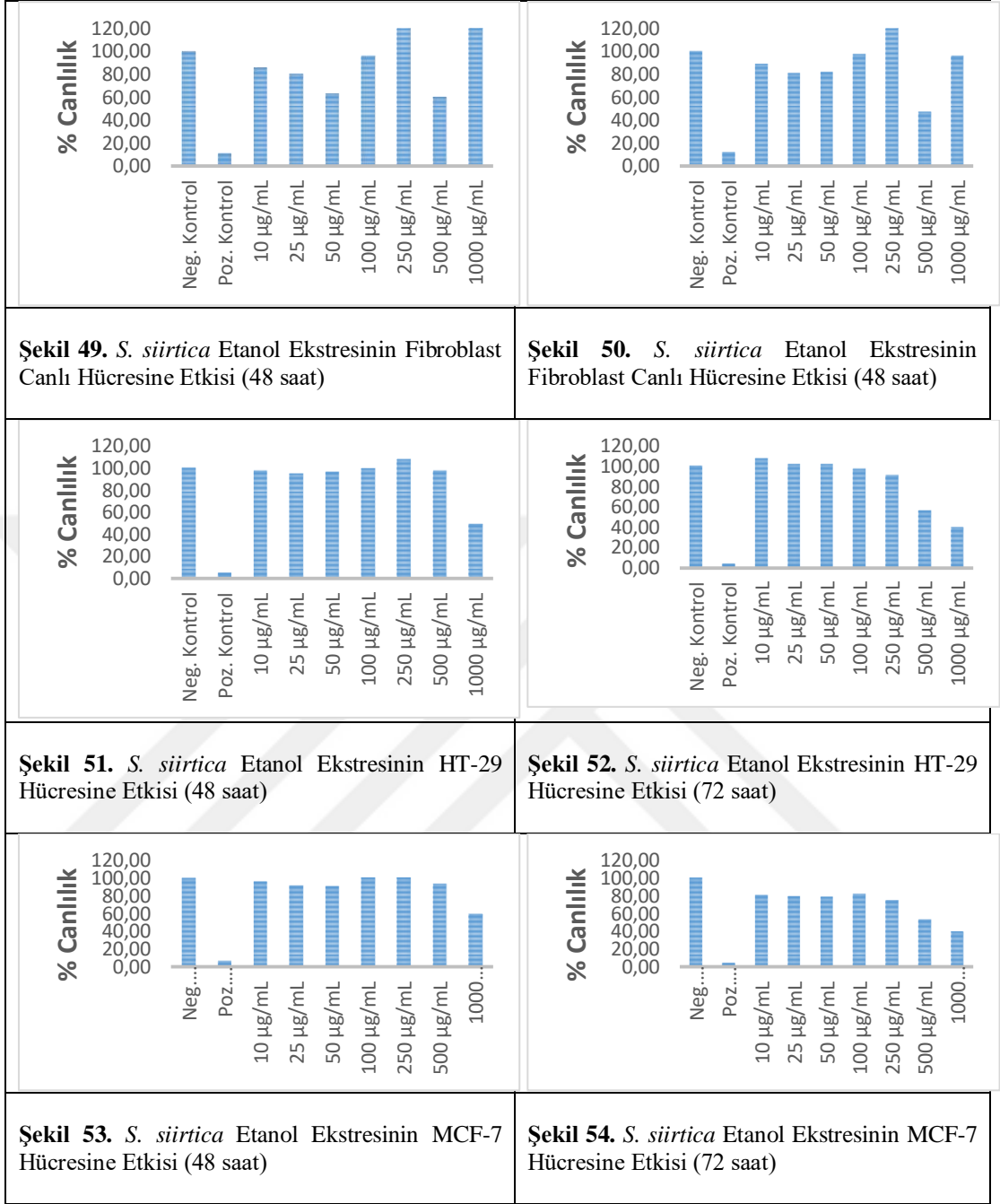
<p><b>Şekil 19.</b> <i>S. cerino-pruinosa</i> var. <i>elazigensis</i> Kloroform Ekstresinin Fibroblast Canlı Hüresine Etkisi (48 saat)</p>	<p><b>Şekil 20.</b> <i>S. cerino-pruinosa</i> var. <i>elazigensis</i> Kloroform Ekstresinin Fibroblast Canlı Hüresine Etkisi (72 saat)</p>
<p><b>Şekil 21.</b> <i>S. cerino-pruinosa</i> var. <i>elazigensis</i> Kloroform Ekstresinin HT-29 Hüresine Etkisi (48 saat)</p>	<p><b>Şekil 22.</b> <i>S. cerino-pruinosa</i> var. <i>elazigensis</i> Kloroform Ekstresinin HT-29 Hüresine Etkisi (72 saat)</p>
<p><b>Şekil 23.</b> <i>S. cerino-pruinosa</i> var. <i>elazigensis</i> Kloroform Ekstresinin MCF-7 Hüresine Etkisi (48 saat)</p>	<p><b>Şekil 24.</b> <i>S. cerino-pruinosa</i> var. <i>elazigensis</i> Kloroform Ekstresinin MCF-7 Hüresine Etkisi (72 saat)</p>

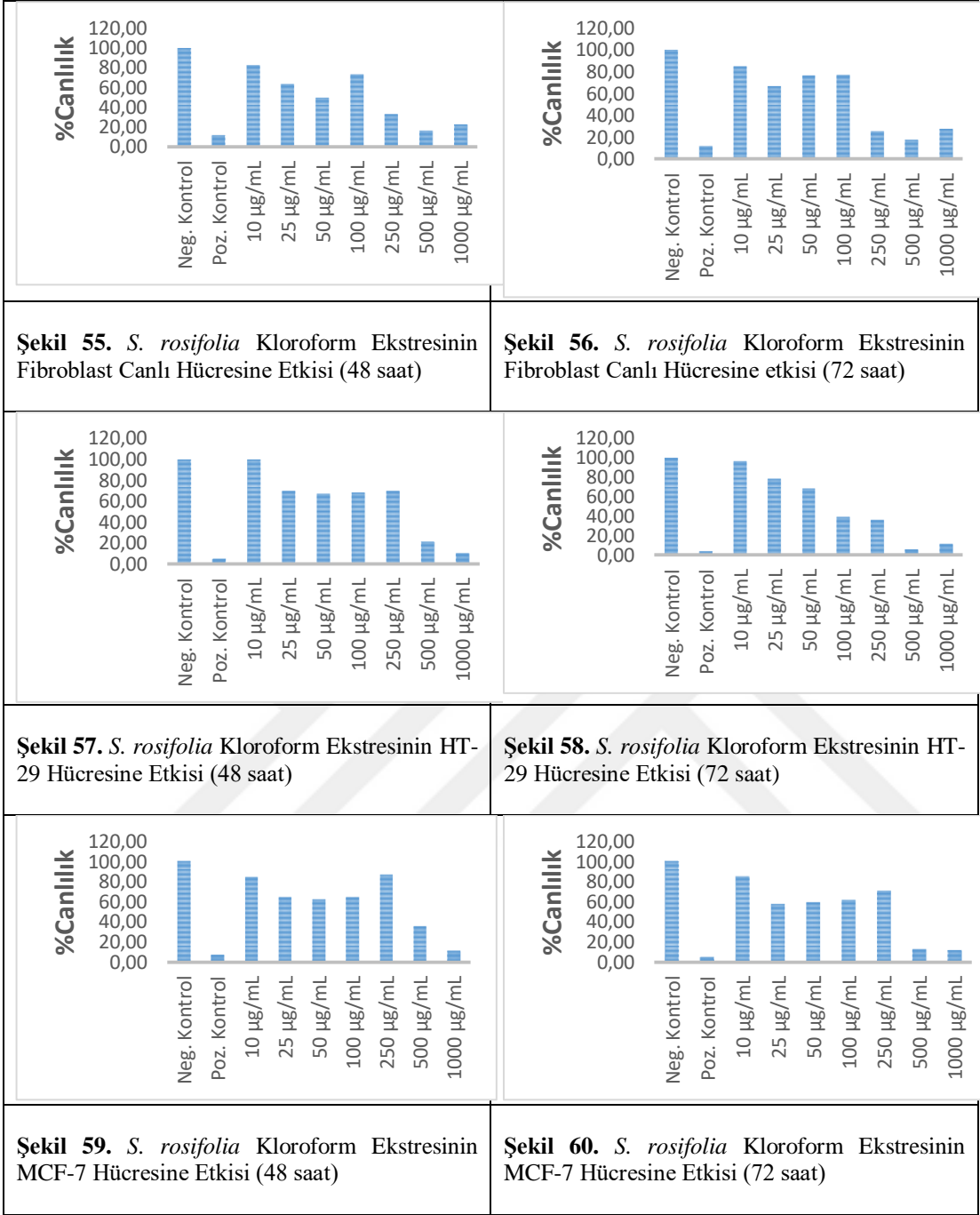
<p><b>Şekil 25.</b> <i>S. cerino-pruinosa</i> var. <i>elazigensis</i> Etanol Ekstresinin Fibroblast Canlı Hüresine Etkisi (48 saat)</p>	<p><b>Şekil 26.</b> <i>S. cerino-pruinosa</i> var. <i>elazigensis</i> Etanol Ekstresinin Fibroblast Canlı Hüresine Etkisi (72 saat)</p>
<p><b>Şekil 27.</b> <i>S. cerino-pruinosa</i> var. <i>elazigensis</i> Etanol Ekstresinin HT-29 Hüresine Etkisi (48 saat)</p>	<p><b>Şekil 28.</b> <i>S. cerino-pruinosa</i> var. <i>elazigensis</i> Etanol Ekstresinin HT-29 Hüresine Etkisi (72 saat)</p>
<p><b>Şekil 29.</b> <i>S. cerino-pruinosa</i> var. <i>elazigensis</i> Etanol Ekstresinin MCF-7 Hüresine Etkisi (48 saat)</p>	<p><b>Şekil 30.</b> <i>S. cerino-pruinosa</i> var. <i>elazigensis</i> Etanol Ekstresinin MCF-7 Hüresine Etkisi (72 saat)</p>

	
<p><b>Şekil 31.</b> <i>S. pseudoeuphratica</i> Kloroform Ekstresinin Fibroblast Canlı Hücrelerine Etkisi (48 saat)</p>	<p><b>Şekil 32.</b> <i>S. pseudoeuphratica</i> Kloroform Ekstresinin Fibroblast Canlı Hücrelerine Etkisi (72 saat)</p>
	
<p><b>Şekil 33.</b> <i>S. pseudoeuphratica</i> Kloroform Ekstresinin HT-29 Hücrelerine Etkisi (48 saat)</p>	<p><b>Şekil 34.</b> <i>S. pseudoeuphratica</i> Kloroform Ekstresinin HT-29 Hücrelerine Etkisi (72 saat)</p>
	
<p><b>Şekil 35.</b> <i>S. pseudoeuphratica</i> Kloroform Ekstresinin MCF-7 Hücrelerine Etkisi (48 saat)</p>	<p><b>Şekil 36.</b> <i>S. pseudoeuphratica</i> Kloroform Ekstresinin MCF-7 Hücrelerine Etkisi (72 saat)</p>

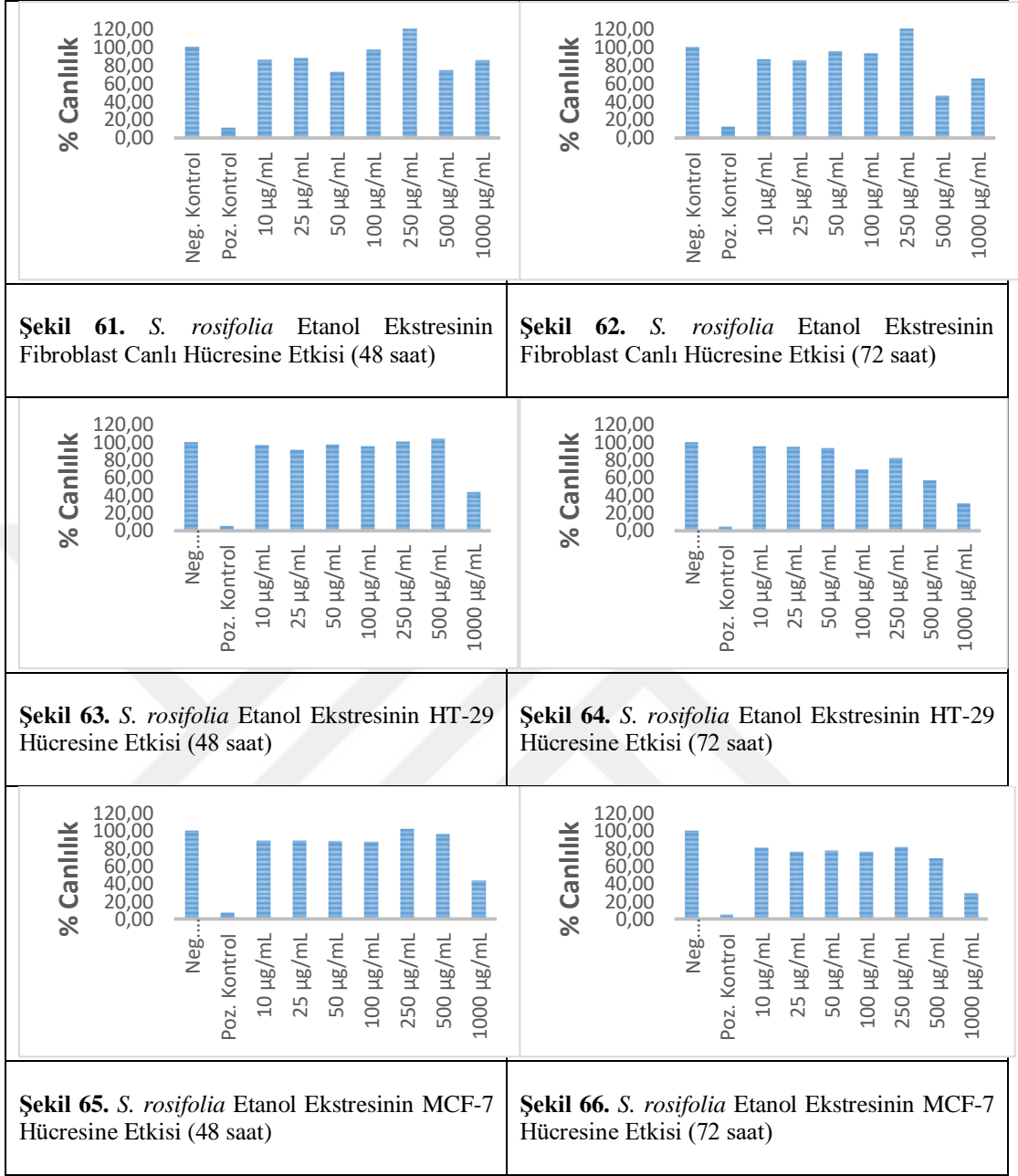


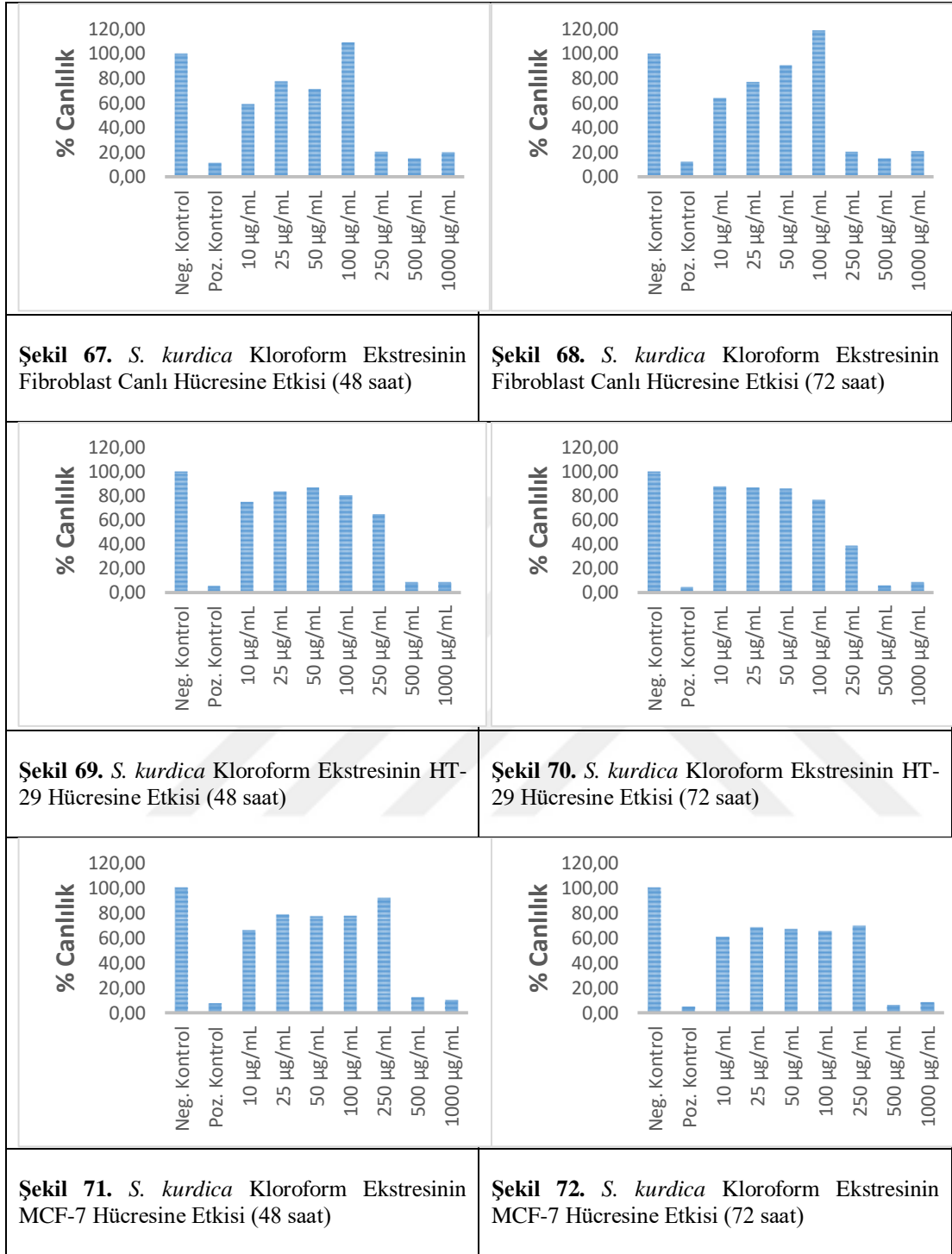
<p><b>Şekil 43.</b> <i>S. siirtica</i> Kloroform Ekstresinin Fibroblast Canlı Hüresine Etkisi (48 saat)</p>	<p><b>Şekil 44.</b> <i>S. siirtica</i> Kloroform Ekstresinin Fibroblast Canlı Hüresine Etkisi (72 saat)</p>
<p><b>Şekil 45.</b> <i>S. siirtica</i> Kloroform Ekstresinin HT-29 Hüresine Etkisi (48 saat)</p>	<p><b>Şekil 46.</b> <i>S. siirtica</i> Kloroform Ekstresinin HT-29 Hüresine Etkisi (72 saat)</p>
<p><b>Şekil 47.</b> <i>S. siirtica</i> Kloroform Ekstresinin MCF-7 Hüresine Etkisi (48 saat)</p>	<p><b>Şekil 48.</b> <i>S. siirtica</i> Kloroform Ekstresinin MCF-7 Hüresine Etkisi (72 saat)</p>











<p><b>Şekil 73.</b> <i>S. kurdica</i> Etanol Ekstresinin Fibroblast Canlı Hücrelerine Etkisi (48 saat)</p>	<p><b>Şekil 74.</b> <i>S. kurdica</i> Etanol Ekstresinin Fibroblast Canlı Hücrelerine Etkisi (72 saat)</p>
<p><b>Şekil 75.</b> <i>S. kurdica</i> Etanol Ekstresinin HT-29 Hücrelerine Etkisi (48 saat)</p>	<p><b>Şekil 76.</b> <i>S. kurdica</i> Etanol Ekstresinin HT-29 Hücrelerine Etkisi (72 saat)</p>
<p><b>Şekil 77.</b> <i>S. kurdica</i> Etanol Ekstresinin MCF-7 Hücrelerine Etkisi (48 saat)</p>	<p><b>Şekil 78.</b> <i>S. kurdica</i> Etanol Ekstresinin MCF-7 Hücrelerine Etkisi (72 saat)</p>

#### 4.2. Saf Maddelerin Antioksidan Aktivite Deneyleri

Elde edilen saf maddelerin antioksidan aktivitesi 3 yöntemle (DPPH Serbest Radikal, ABTS Katyon Radikal, CUPRAC) belirlendi. Bu maddelerin genel olarak çok aktif oldukları tespit edildi (Tablo 2). Elde edilen fenolik bileşiklerin oldukça aktif oldukları görülmektedir. *S. cerino-pruinosa var. cerino-pruinosa* ve *S. pseudeuphratica* türlerinden gram seviyesinde elde edilen 6,7-dehidroroyleanon bileşiği ve türevi olan Asetil royleanon bileşiklerinin oldukça yüksek bir antioksidan potansiyele sahip olduğu tespit edildi. Ayrıca bu türlerin çok güçlü bir antioksidan özelliğe sahip rozmarinik asit içeriği de düşünüldüğünde bu türlerin zenginleştirilmiş ekstralarının gıda koruyucu olma potansiyellerinin olduğu görülmektedir.

**Tablo 2.** Elde Edilen ve Yapısı Aydınlatılan Bileşiklerin Antioksidan Aktiviteleri

İsim	Antioksidan Aktivitesi		
	IC <sub>50</sub> (µg/mL)		A <sub>0.5</sub>
	DPPH Serbest Radikal	ABTS Serbest Katyon	CUPRAC
Rozmarinik Asit	1,21±0,06	1,70±0,07	1,21±0,01
Klorojenik Asit	6,32±0,08	3,38±0,08	13,48±0,10
Apigenin	45,87±1,43	2,57±0,05	124,70±4,23
Hesperidin	157,30±88,03	161,51±9,76	40,16±1,01
Fumarik Asit	273,74	150,47	105,35±3,03
p-Kumarik Asit	176,38±8,66	1,03±2,47	14,42±0,12
Kafeik Asit	3,56±0,03	1,65±0,06	7,41±0,02
Vanilin	>1000	7,25±0,62	11,11±0,21
4-Hidroksibenzoik Asit	29,73±4,32	354,63±58,58	18,13±0,15
Asetil royleanon	12,17±0,16	27,64±1,05	35,55±1,02
β-Sitosterol	72,11±1,94	154,34±2,12	22,17±0,98
Ferruginol	33,80±2,20	6,61±0,27	49,83±2,02
Kriptanol	87,19±9,90	55,25±2,02	70,05±3,03
Inuroyleanol	2,21±0,06	5,11±1,13	7,12±0,02
6,7-dehidroroyleanon	16,84±0,18	55,73±6,33	28,56±1,04
Taraksasterol	18,93±0,11	75,26±2,19	173,55±5,43
Salvigenin	62,05±26,49	19,13±2,78	49,83±1,54
Ursolik Asit	20,04±1,04	104,44±8,06	178,09±5,02

**Tablo 2.** Elde Edilen ve Yapısı Aydınlatılan Bileşiklerin Antioksidan Aktiviteleri (devam)

Oleanolik Asit	45,02±1,31	275,73±67,11	11,72±0,06
Lupenon	19,64±10,03	75,98±1,84	40,66±1,20
Salvianolik Asit B	4,31±0,03	3,51±0,03	13,90±0,07
Luteolin 7-Glikozit	5,58±0,06	3,85±0,09	3,75±0,01
Salvianolik Asit A	4,06±0,04	2,66±0,07	4,76±0,01
Benzoik Asit	72,40±0,29	12,48±0,02	34,50±1,17
Lupeol	>1000	276,69±4,21	118,30±0,93
Asetovanilon	>1000	15,73±0,37	118,40±1,11
3-asetil lupeol	>1000	422,63±12,69	98,63±2,16
Bis-(2-etilhekzil) benzen-1,2 dikarboksilat	>1000	280,50±3,81	213,80±5,70
4-hidroksi benzaldehit	>1000	15,30±0,19	48,65±1,13
Stigmasterol	>1000	312,75±4,92	172,48±1,15
Skoparon	186,39±0,50	65,09±0,61	164±1,09
Abieta-8,11,13-trien	>1000	290,43±0,91	230,70±3,04
Lup-(20)29-en-2 $\alpha$ -hidroksi-3 $\beta$ asetat	>1000	78,42±1,50	114,06±1,03
Bis-(2-etilhekzil) ftalat	>1000	248,04±3,50	136,57±1,32
Pisiferal	>1000	44,93±0,12	172,30±3,10
Sugiol	150,09±2,05	69,61±0,29	54,50±1,10
7 $\alpha$ -hidroksi- $\beta$ sitosterol	>1000	176,59±3,70	180,30±1,50
12-hidroksi abieta-1,3,5(10),8,11,13-hekzan	86,39±0,59	2,11±0,03	11,2±0,30
12-demetilmultikaulin	76,20±0,90	6,70±0,09	17,04±1,03
21 $\alpha$ -hidroksi-2 $\alpha$ ,3 $\beta$ -diasetoksi urs-9(11),12-dien	>1000	256,49±0,19	136,53±2,11
3 $\beta$ -hidroksi-2 $\alpha$ -asetoksi urs-9(11),12-dien	>1000	189,49±1,52	117,50±2,29
2 $\alpha$ ,3 $\beta$ ,21 $\alpha$ -trihidroksi urs-9(11),12-dien	>1000	131,51±2,58	221,66±9,43
1 $\alpha$ ,21 $\alpha$ -dihidroksi-2,3-(1',1'-dimetil-dioksümetilen) urs-9(11),12-dien	>1000	236,69±0,93	189,30±2,37
12-Hidroksi-6,7-seco abieta-8,11,13-trien-6,7-dial	>1000	54,94±0,27	72,40±1,10
4-Hidroksi sapriparakinon	>1000	121,47±2,36	172,40±1,18

**Tablo 2.** Elde Edilen ve Yapısı Aydınlatılan Bileşiklerin Antioksidan Aktiviteleri (devam)

Heksadekanoik Asit, n-oktil ester	>1000	112,52±1,18	113,60±2,19
Heksadekanoik Asit, 3-hidroksi-metil ester	340,92±4,79	231,54±2,68	152,60±2,72
Protokateşik Asit	2,11±0,07	1,42±0,05	2,20±0,12
Salvipison	>1000	80,30±0,93	82,46±1,16
Dokasonoik Asit	>1000	>1000	461,50±11,25
Heksadekanoik Asit	>1000	>1000	392,20±5,71
Olean-18-ene (Germanicen)	>1000	399,48±6,60	187,50±2,50

Sonuçlar üç paralel ölçümün ortalaması ve standart sapması şeklinde verilmiştir.

### 4.3. Saf maddelerin antikanser çalışmaları

Elde edilen saf maddelerin biri sağlıklı hücre serisi olmak üzere üç hücre serisinde sitotoksik aktivitelerine bakıldı. Yine diğer yöntemlerde olduğu gibi diterpen yapısında olan bileşiklerin aktif oldukları tespit edildi (Tablo 3). Ayrıca elde edilen yeni triterpenlerin de oldukça aktif olduğu tespit edildi. Fakat bu bileşiklerin sağlıklı canlı hücre üzerinde de oldukça yüksek toksik etki gösterdiği görüldü. Bunların yanı sıra elde edilen çoğu bileşiğin de sağlıklı canlı hücre serisi üzerinde toksik etki gösterdiği belirlendi. Dolayısıyla bu türlerin kullanımında dozun (miktarın) çok önemli olduğu ortaya çıkmaktadır.

**Tablo 3.** Elde Edilen ve Yapısı Aydınlatılan Bileşiklerin 3 Hücre Serisine Karşı Sitotoksik Aktiviteleri

İsim	Sitotoksik Aktivite		
		IC <sub>50</sub> (µg/mL)	
	PDF	HT-29	MCF-7
Rozmarinik Asit	>250	>250	>250
Klorojenik Asit	>250	>250	>250
Apigenin	32,54±1,05	>250	>250
Hesperidin	81,14±2,04	>250	84,10±2,56
Fumarik Asit	>250	>250	>250
p-Kumarik Asit	>250	>250	>250
Kafeik Asit	>250	>250	>250
Vanilin	>250	>250	>250
4-Hidroksibenzoik Asit	>250	>250	>250

**Tablo 3.** Elde Edilen ve Yapısı Aydınlatılan Bileşiklerin 3 Hücre Serisine Karşı Sitotoksik

Aktiviteleri (devam)

Asetil royleanon	33,41±0,99	33,61±1,23	30,01±0,87
β-Sitosterol	>250	65,36±3,32	77,98±3,09
Ferruginol	32,28±1,03	54,91±2,67	29,77±0,85
Kriptanol	38,73±1,76	48,90±2,06	211,83±5,54
Inuroyleanol	>250	125,91±3,78	54,23±2,07
6,7-dehidroroyleanon	57,97±2,76	48,76±1,21	50,56±2,01
Taraksasterol	>250	>250	>250
Salvigenin	>250	>250	37,58±1,05
Ursolik Asit	16,63±0,06	25,06±0,45	36,80±0,98
Oleanolik Asit	>250	96,33±3,05	>250
Lupenon	>250	187,60±4,54	>250
Salvianolik Asit B	>250	>250	>250
Luteolin 7-Glikozit	>250	>250	161,41±3,54
Salvianolik Asit A	50,38±2,04	>250	55,42±2,01
Benzoik Asit	92,17±2,42	65,72±2,23	63,41±0,51
Lupeol	4,15±0,12	53,35±0,18	36,19±0,17
Asetovanilon	94,11±2,47	>250	80,05±2,84
3-asetil lupeol	>250	1,76±0,09	>250
Bis-(2-etilhekzil) benzen-1,2 dikarboksilat	76,49±2,48	68,89±2,76	>250
4-hidroksi benzaldehit	38,83±0,76	27,62±0,18	64,56±0,23
Stigmasterol	62,38±1,95	42,76±0,68	97,76±2,65
Skoparon	47,66±0,63	>250	>250
Abieta-8,11,13-trien	16,66±0,79	>250	>250
Lup-(20)29-ene-2α-hidroksi-3β asetat	5,38±0,29	11,12±0,04	54,69±0,39
Bis-(2-etilhekzil) ftalat	54,23±1,93	71,34±1,07	>250
Pisiferal	23,06±1,53	>250	>250
Sugiol	46,78±1,12	>250	72,16±1,94
7α-hidroksi-β sitosterol	25,35±0,54	51,37±0,46	>250
12-hidroksi abieta-1,3,5(10),8,11,13-hekzan	31,44±2,11	21,75±1,74	11,22±0,56
12-demetilmultikaulin	27,01±1,25	23,95±0,94	40,80±1,23
21α-hidroksi-2α,3β-diasetoksi urs-9(11),12-dien	2,38±0,05	30,15±0,54	88,37±0,67

**Tablo 3.** Elde Edilen ve Yapısı Aydınlatılan Bileşiklerin 3 Hücre Serisine Karşı Sitotoksik

Aktiviteleri (devam)

3β-hidroksi-2α-asetoksi urs-9(11),12-dien	1,59±0,05	71,58±0,74	41,70±0,09
2α,3β,21α-trihidroksi urs-9(11),12-dien	31,59±0,27	68,98±2,14	>250
1α,21α-dihidroksi-2,3-(1',1'-dimetil-dioksimetilen) urs-9(11),12-dien	8,49±0,09	29,04±0,35	24,39±1,18
12-Hidroksi-6,7-secoabieta-8,11,13-trien-6,7-dial	30,21±1,04	79,62±1,91	34,23±0,19
4-Hidroksi sapriparakinon	87,88±2,49	1,12±0,02	80,08±1,20
Heksidekanoik Asit, n-oktil ester	75,46±1,34	>250	86,75±2,11
Heksidekanoik Asit, 3-hidroksi-metil ester	20,46±0,07	>250	84,06±2,32
Protokateşik Asit	>250	>250	>250
Salvipison	26,25±1,53	>250	>250
Dokasonoik Asit	>250	>250	>250
Heksidekanoik Asit	35,45±1,04	>250	>250
Olean-18-ene (Germanicen)	52,85±0,80	>250	>250

Sonuçlar üç paralel ölçümün ortalaması ve standart sapması şeklinde verilmiştir.

#### 4.3.1. Detaylı antikanser çalışmalarda denenen maddelerin seçilme nedenleri

**C-2 Rozmarinik asit:** MTT yönteminde aktif çıkmamasına rağmen literatürdeki antikanser potansiyeli olduğuna dair çok sayıda çalışma mevcuttur. Ayrıca bu maddenin çok ciddi antioksidan potansiyeli olduğu tespit edildi. Bunlara ilaveten çalışılan türlerde majör bileşen olduğu için gen ekspresiyonuna bakılmasına karar verildi.

**C-29 Asetilroyleanon:** Hem majör bileşen hem antioksidan potansiyeli olan hem de sitotoksik yönden aktif olduğu için seçildi.

**C-31 β-Sitosterol:** Tüm türlerde majör bileşen olarak elde edildiği ve orta düzeyde sitotoksik aktivite gösterdiğinden seçildi.

**C-32 Ferruginol:** Antioksidan ve sitotoksik aktivite açısından aktif olduğundan seçildi.

**C-36 6-7 dehidroroyleanon:** Çalışılan bazı türlerde gram seviyesinde elde edildiğinden ve sitotoksik olarak aktif olduğundan seçildi.



**C-45 Ursolik asit:** Tüm türlerde majör bileşen olup sitotoksik yönden aktif olduğundan seçildi. Çalışılan bazı fraksiyonlarda gram seviyesinde elde edildi.

**C-57 Karnosik asit, C-59 Karnosol ve C-61 Kriptotansinon:** Genel olarak *Salvia* türlerinde olup literatürde ve ön denemelerimizde sitotoksik aktiviteleri yüksek olan standart maddelerdir. Bunlar izole edilmemiş olup LC-MS/MS'te metot oluşturmak için alınan saf standart maddelerdir.

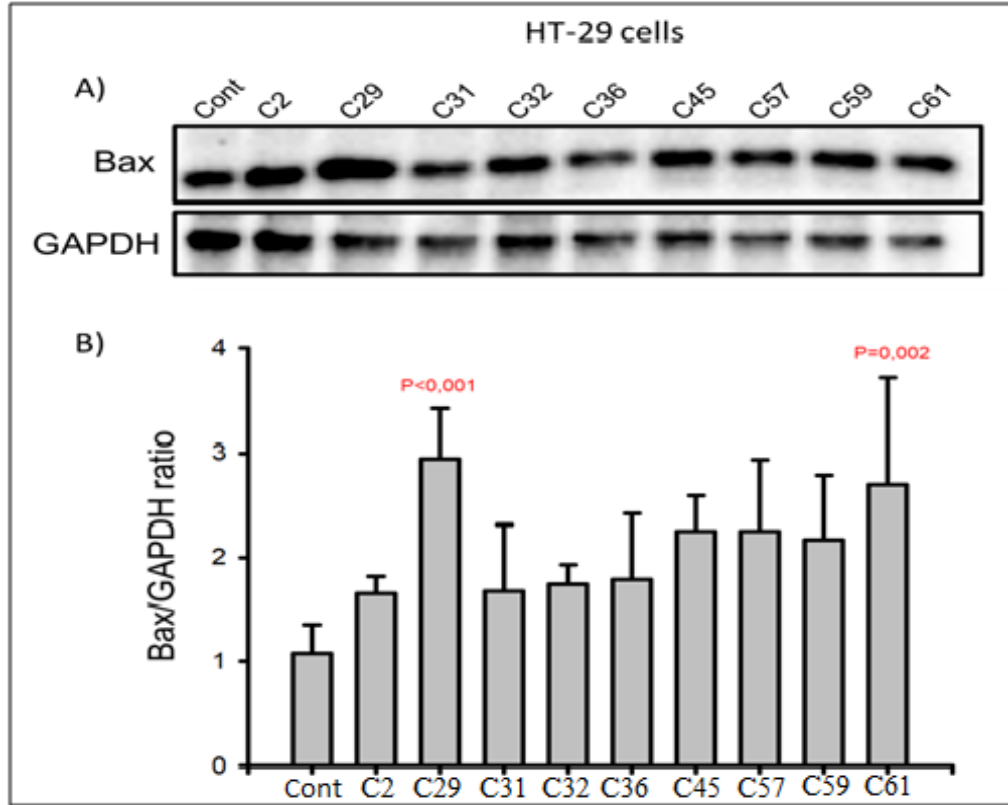
#### **4.4. Western Blot için Protein Örneklerinin Jelde Ayrımı ve Membrana Transferi**

1. Bütün protein örneklerinin ayrımı %10' luk TGX stain-free fast cast atansinonlamid jel (Bio-Rad) üzerinde Mini Protean Tetra Cell apparatus sistemi (Bio-Rad) kullanılarak yapıldı.
2. Protein örnekleri 1×SDS yükleme tamponu [%2 (w/v) SDS, %5 (v/v) gliserol, %0.01 (w/v) bromfenol mavisi, %8 (w/v) DTT] içinde hazırlandı ve 95 °C de 5 dk ısıtıldı.
3. İlgili eşit miktardaki (20 µg) ve eşit hacimdeki (30 µl) proteinler %10' luk TGX stain-free fast cast atansinonlamid jel üzerine yüklendi ve 300 V' da 20 dk SDS yürütme tamponu (2.4 mM Tris, 19.2 mM glisin, %0,01 (w/v) SDS) içerisinde elektroforez edildi.
4. Ayrılmış proteinler jelden PVDF membrana transfer edildi (Bio-Rad, Transfer pack).
5. Membranlar %5' lik yağsız süt tozu (PBS-Tween içerisinde hazırlanmış) içerisinde çalkalayıcı üzerinde 1 saat oda sıcaklığında bloke edildi.
6. Bloke edilen membranlar %5 'lik süt tozu PBS-Tween içerisinde 1/1000 oranında hazırlanan primer antikorlar (anti B-actin, anti-Bax ve anti-Bcl-2) ile çalkalayıcı üzerinde oda sıcaklığında 2 saat inkübe edildi.
7. Membranlar 3 kez 10 dk PBS-Tween ile yıkandıktan sonra sekonder antikorlar (HRP-conjugated anti-mouse ve anti-rabit, 1/10000 oranında PBS-Tween içerisinde hazırlanmış) ile bir saat oda sıcaklığında çalkalayıcı üzerinde inkübe edildi.

8. Membranlar 3 kez 10 dk PBS-Tween ile yıkandıktan sonra, proteinler, ECL (enhanced chemiluminiscent) (Bio-Rad) metoduna göre görüntüleme cihazı (Bio-Rad ChemiDoc MP) kullanılarak görüntülendi.

9. İnternal kontrol olarak GAPDH antikoru kullanıldı.

10. Representatif Western Blot sonuçları Şekil 79-81’de görülmektedir.

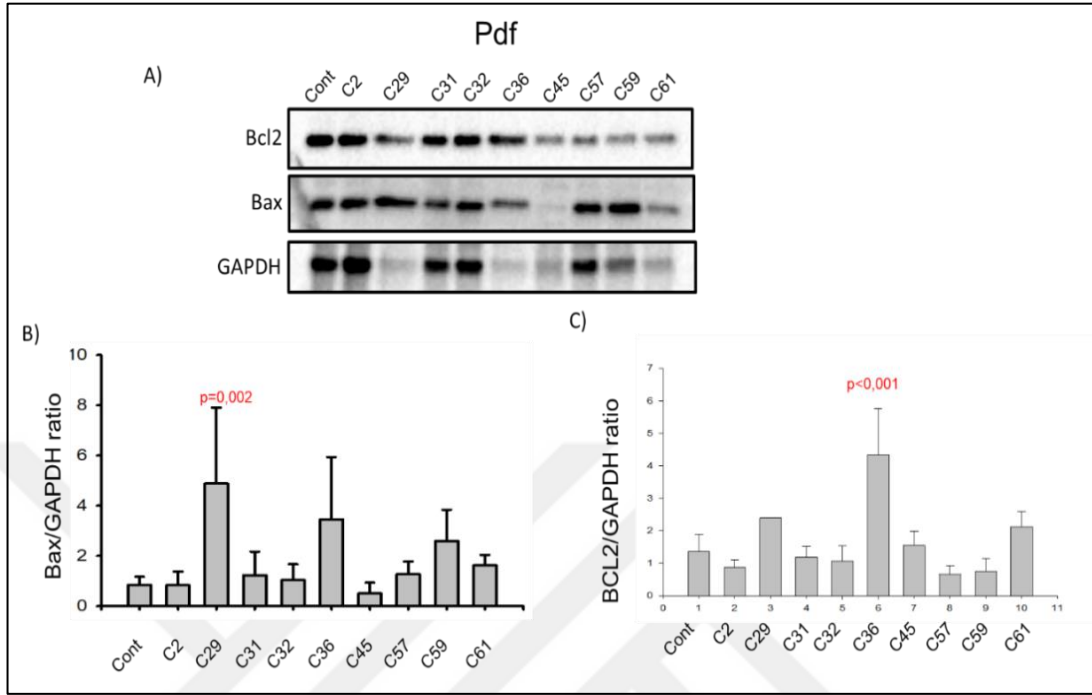


Şekil 79. Bazı Saf Maddelerin HT-29 Hücrelerinde Bax Ekspresyonu

A)  $3 \times 10^6$  HT-29 hücreleri 24 kuyucuklu plakalara kültüre edildi. Hücreler yukarıdaki saf maddelerle muamele edildikten sonra 48 saat inkübasyona bırakıldı. Hücre lizatı Bax ekspresyonu için anti-Bax antikoru kullanılarak Western Blot yöntemi ile analiz edildi. Yükleme kontrolü olarak GAPDH kullanıldı. B) Densitometrik ölçümler Bax ekspresyonunun GAPDH ekspresyonuna oranını yansıtmaktadır (n=3). Hata çubukları standart hata (SEM). Bcl-2 ekspresyonu HT-29 hücrelerinde deteksiyon düzeyinde saptanmadı.

Bax ekspresyonundaki artış apoptozisteki artışı ifade etmektedir. C29 ve C61 saf maddeleri HT-29 hücrelerinde Bax ekspresyonunun artışı induklemektedir. Kanserli hücrelerde apoptozis regülasyonu bozulduğu için hücreler gereğinden fazla

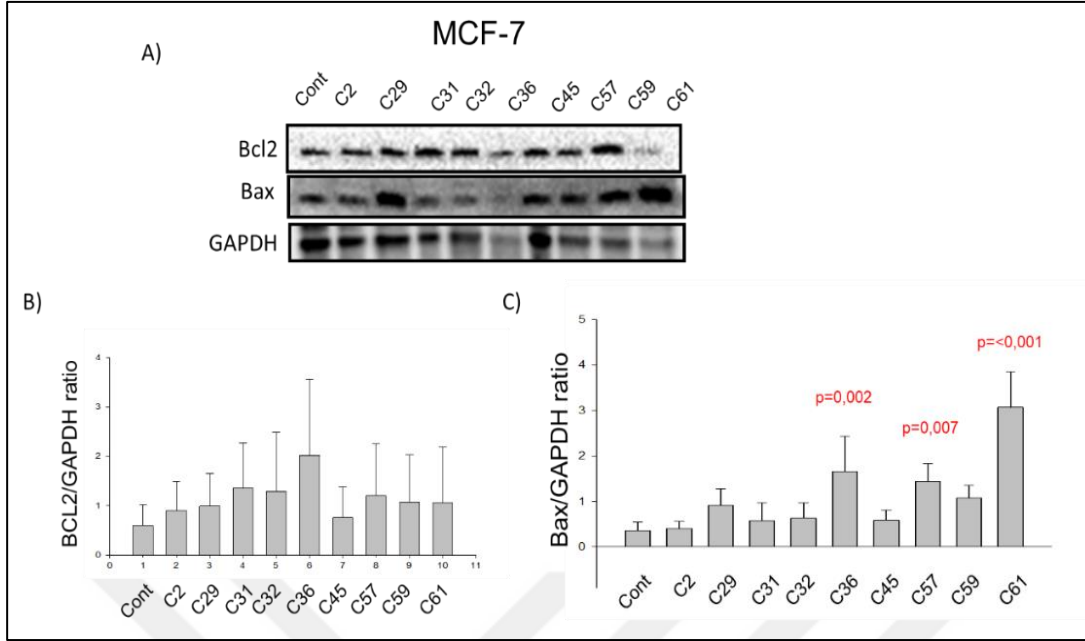
çoğalmaktadır. Bax ekspresyonundaki artış C29 ve C61 maddelerinin anti kanser özelliklerinin olduğunu göstermektedir.



Şekil 80. Bazı Saf Maddelerin PDF Hücrelerinde Bax ve Bcl-2 Ekspresyonu

A)  $3 \times 10^6$  PDF hücreleri 24 kuyucuklu plakalara kültüre edildi. Hücreler yukarıdaki saf maddelerle muamele edildikten sonra 48 saat inkübasyona bırakıldı. Hücre lizatı Bax ve Bcl-2 ekspresyonu için anti-Bax ve anti-Bcl-2 antikorları kullanılarak Western Blot yöntemi ile analiz edildi. Yükleme kontrolü olarak GAPDH kullanıldı. B, C) Densitometrik ölçümler Bax ve Bcl-2 ekspresyonunun GAPDH ekspresyonuna oranını yansıtmaktadır (n=3). Hata çubukları standart hata (SEM).

Bax ekspresyonundaki artış apoptozisteki artışı ifade etmektedir. C29 maddesi PDF hücrelerinde Bax ekspresyonunun artışı dolayısıyla apoptozisi indüklemektedir. Bcl-2 ekspresyonundaki artış ise apoptozisin azaldığını ifade etmektedir. C36 saf maddesi PDF hücrelerinde Bcl-2 ekspresyonunun artışına neden olduğu için, C36 maddesinin apoptozisi bu hücre serisinde azalttığı düşünülmektedir.



**Şekil 81.** Bazı Saf Maddelerin MCF-7 Hücrelerinde Bax ve Bcl-2 Ekspresyonu

**A)**  $3 \times 10^6$  MCF-7 hücreleri 24 kuyucuklu plakalara kültüre edildi. Hücreler yukarıdaki saf maddelerle muamele edildikten sonra 48 saat inkübasyona bırakıldı. Hücre lizatı Bax ve Bcl-2 ekspresyonu için anti-Bax ve anti-Bcl-2 antikorları kullanılarak Western Blot yöntemi ile analiz edildi. Yükleme kontrolü olarak GAPDH kullanıldı. **B, C)** Densitometrik ölçümler Bax ve Bcl-2 ekspresyonunun GAPDH ekspresyonuna oranını yansıtmaktadır (n=3). Hata çubukları standart hata (SEM).

Bax ekspresyonundaki artış apoptozisteki artışı ifade etmektedir. C36, C57 ve C61 saf maddelerinin MCF-7 hücrelerinde Bax ekspresyonunun artışı indüklemesi bu saf maddelerin anti kanser özelliklerinin olduğunu göstermektedir. Uygulanan saf maddelerin Bcl-2 ekspresyonu üzerinde herhangi bir etkileri yoktur.

## 5. TARTIŞMA

Çalışılan türlerin toprak altı ve toprak üstü kısımlarından hazırlanan aktif etanol ekstrelerinden 52 sekonder metabolit elde edildi. Bu bileşiklerden triterpen yapısında olanların ursolik, oleanolik asit, lupeol ve türevleri, elde edilen 4 yeni triterpen ( $21\alpha$ -hidroksi- $2\alpha,3\beta$ -diasetoksi urs-9(11),12-dien,  $3\beta$ -hidroksi- $2\alpha$ -asetoksi urs-9(11),12-dien,  $2\alpha,3\beta,21\alpha$ -trihidroksi urs-9(11),12-dien,  $1\alpha,21\alpha$ -dihidroksi-2,3-(1',1'-dimetil-dioksümetilen) urs-9(11),12-dien) ve diğer triterpen yapısındaki bileşiklerin daha çok çalışılan türlerin toprak üstü ekstrelerinden, diterpen yapısında olan ferruginol, sugiol, 7-asetil royleanon, kriptanol, 6,7-dehidroroyleanon, 12-hidroksi abieta-1,3,5(10),8,11,13-hekzan ve 12-demetilmultikaulin ve diğer diterpenlerin ise daha çok çalışılan türlerin kök ekstrelerinden elde edildiği görülmektedir. Yine fenolik-flavonoit yapıda olanların ise salvigenin, apigenin, luteolin 7-glikozit, rozmarinik asit, fumarik asit, kafeik asit, salvianolik asit A ve B, benzoik asit, protokateşik asit, 4-hidroksibenzoik asit, 4-hidroksibenzaldehit, scoparon ve bis-(2-etil hekzil) benzen-1,2 dikarboksilat, bis(2-etil hekzil) terftalat ve diğer fenolik bileşiklerin ise daha çok çalışılan türlerin toprak üstü ekstrelerinden elde edildiği görülmektedir. Literatürde bu türlerin izolasyonu ile ilgili çalışma mevcut değildir. Fakat bu türlerin ait olduğu *Salvia* cinsi ile ilgili çok sayıda çalışma mevcuttur.

Literatürde *Salvia* cinsi ile ilgili izolasyon çalışmalarına baktığımızda; *S. albocaerulea* Linden türünden sugiol bileşiği ve *S. forskahlei* L. türünden forskalinon bileşiği izole edilmiştir (89). *S. chrysophylla* Stapf türünün toprak üstü diklorometan ekstresiyle yapılan bir çalışmada bitkiden izole edilen salvigenin, sitosterol, oleanoik asit ve ursolik asit bileşiklerinin yapıları aydınlatılmıştır (145). *S. pocolata* Nab. türünün toprak üstü kısmıyla yapılan çalışmada 2 triterpenoit (2a, 3a-dihidroksi-24-nor- 4 (23), 12-oleanadien-28-oik asit ve ursolik asit), 1 diterpenoit (sklareol), 4 flavonoit (5-hidroksi-7,4'-dimetoksiflavon, cirsimaritin, eupatilin, salvigenin) ve 1 steroid ( $\beta$ -sitosterol) izole edilmiştir (146). *S. trichoclada* Bentham'ın toprak üstü kısımlarının metanol ekstresinin sekonder metabolitler açısından incelendiği çalışmada lupeol, lupenon, glochidon, monoginol A, oleanolik asit, ursolik asit,  $\beta$ -sitosterol, apigenin-7-O-ramnozid ve rozmarinik asit olmak üzere dokuz bileşik izole

edilmiş olup bu bileşiklerin yapıları 1D ve 2D-NMR spektroskopik teknikler kullanılarak aydınlatılmıştır (94).

Genel olarak elde ettiğimiz bileşiklerin daha önce özellikle Türk *Salvia* 'larından elde edildiği görülmektedir. Fakat *S. Siirtica* Kahraman, Celep & Doğan türünden elde edilen dört bileşiğin ise ilk defa tarafımızdan elde edildiği tespit edilmiştir.

İzole edilen tüm bileşiklerin antioksidan aktiviteleri DPPH Serbest Radikal, ABTS Katyon Radikal ve CUPRAC yöntemleri ile belirlendi. Elde edilen fenolik bileşiklerin (özellikle rozmarinik asit, klorojenik asit, kafeik asit, salvianolik asit A ve B), abietan diterpen yapısındaki bileşiklerin (özellikle 6,7-dehidroroyleanon, asetil royleanon, ferruginol, inuroyleanol, 12-demetilmultikaulin, 12-hidroksi abieta-1,3,5(10),8,11,13-hekzan) ve yeni bileşik olarak tanımlanan 4 triterpen bileşiğinin oldukça yüksek bir antioksidan kapasiteye sahip olduğu belirlendi. Elde edilen yeni bileşiklerin yanı sıra salvipision, pisiferal, 6,7-dehidroroyleanon, asetil royleanon vb. bileşiklerin antioksidan aktiviteleri ilk defa incelendi. Literatürde çalıştığımız türlerin fenolik içeriği ve antioksidan aktiviteleri ile ilgili çalışma mevcut değildir.

Diğer *Salvia* türleri ile ilgili yapılan çalışmalara baktığımızda genel olarak *Salvia* türlerinin çok yüksek bir antioksidan potansiyele sahip olduğu söylenebilir. Bu antioksidan aktivitenin fenolik içerik (özellikle rozmarinik asit) ve diterpenik bileşiklerden kaynaklandığı vurgulanmıştır (147).

Çalışılan 6 *Salvia* türünün kloroform ve etanol ekstralarının sitotoksik aktivitesi kanserli HT-29 ve MCF-7 hücre serileri ile sağlıklı PDF hücre serisine karşı MTT metoduna göre tespit edildi. Çalışılan 12 ekstrenin sonuçlarına genel olarak baktığımızda ancak yüksek konsantrasyonlarda HT-29 ve MCF-7 hücre serilerine karşı sitotoksik etki gösterdiği belirlendi. Ancak bu konsantrasyonlarda sağlıklı fibroblast hücre serisine karşı da toksik etki gösterdiği belirlendi. Ayrıca etanol ekstresinin kloroform ekstresine göre hem sağlıklı fibroblast hem de HT-29 ve MCF-7 hücre serilerine karşı düşük sitotoksik etki gösterdiği belirlendi. Ekstrelerin aksine izole edilen bazı maddelerin oldukça sitotoksik potansiyele sahip olduğu belirlendi. Elde edilen diterpen yapısındaki 6,7-dehidroroyleanon, asetil royleanon, ferruginol, inuroyleanol, 12-demetilmultikaulin, 12-hidroksi abieta-1,3,5(10),8,11,13-hekzan ve triterpen yapısındaki 4 yeni bileşiğin oldukça yüksek bir sitotoksik potansiyele sahip

olduğu tespit edildi. Çalıştığımız türlerin ekstre düzeyinde sitotoksik aktiviteleri daha önce çalışılmamış olup ilk defa tarafımızdan bakılmıştır. Fakat farklı türlerin ve elde edilen çeşitli bileşiklerin sitotoksik aktiveleri ile ilgili çok sayıda çalışma mevcuttur.

Literatürdeki bu çalışmalara baktığımızda; *S. officinalis* L. (adaçayı) ekstresinin antikanser özelliklerinin altında yatan moleküler mekanizmayı değerlendirmek için, adaçayı hidroalkolik ekstrenin etkisi fare meme karsinomu hücre dizisi (4T1) üzerinde araştırılmıştır. Kültür hücreleri 24 saat boyunca farklı konsantrasyonlarda (0-1000 µg/mL) *S. officinalis* ekstresi ile muamele edilmiştir. Ekstre ile muamele edildikten sonra doza bağlı bir şekilde hücre canlılığının azalması ve kromatin yoğunlaşmasının artması gözlenmiştir. Hücrelerin çoğunun 100 µg/mL'de apoptozisin erken evrelerinde ve 500 µg/mL'de apoptozisin geç evrelerinde olduğu görülmüştür. Bax ekspresyonu 500 µg/mL konsantrasyonda belirgin bir şekilde artarken, Bcl-2 ekspresyon seviyelerinde ekstrenin farklı konsantrasyonlarında muamele edilmemiş kontrole kıyasla anlamlı bir değişiklik gözlenmemiştir. Ayrıca, bu hücrelerde apoptotik bir indeks olan Bax/Bcl-2 oranını arttırdığı görülmüştür. Sonuç olarak *S. officinalis*'in hidroalkolik ekstresinin, fare meme karsinomu hücrelerinde sitotoksik ve proapoptotik özellikler gösterdiği tespit edilmiştir (118).

*S. lachnocalyx* Hedge'nin kök kısmından saflaştırılan beş diterpenoitin (ferruginol, taksodion, sahandinon, 4-dehidrosalvilimbinol ve labda-7,14-dien-13-ol) üç insan kanser hücre serisine MOLT-4 (akut lenfoblastik lösemi), HT-29 (kolorektal adenokarsinoma) ve MCF-7 (meme adenokarsinoması) karşı sitotoksitesini incelenmiştir. İzole edilen bileşiklerin tümü, bu hücre serilerine karşı önemli sitotoksik aktivite göstermiştir (85). *S. ceratophylla* L. ile yapılan bir çalışmada; ceratol, ceratodiol, 1-ketoetiyoopinon, ferruginol ve 12-deoksisalvipizon bu bitkinin köklerinden izole edilmiştir. İzole edilen bileşiklerin sitotoksitesini MTT redüksiyon testi kullanılarak iki insan kanser hücresi serisine, MOLT-4 ve MCF-7'ye karşı incelenmiştir. Ceratodiol bileşiği her iki kanser hücresine karşı sitotoksikite gösterse de, ceratol bileşiği MOLT-4 hücrelerine karşı zayıf toksisite göstermiş ve MCF-7 hücrelerine karşı toksisite göstermemiştir. Her ikisi de bir  $\alpha$  doymamış karbonil fonksiyonuna sahip olan 1-ketoetiyoopinon ve 12-deoksisalvipizon test edilen bileşikler arasında en yüksek sitotoksik aktiviteyi göstermiştir (95).

*S. barrelieri* Etl.'nin toprak üstü kısımlarından 12 bileşik izole edilmiş ve sitotoksik aktiviteleri, promyelositik lösemi (HL60), insan eritromyeloblastoid lösemi (K562) ve fibrosarkom (HT1080) hücre serilerine karşı değerlendirilmiştir. Dört bileşik orta düzeyde bir sitotoksik aktivite ( $IC_{50}$  28.75 ile 85.0  $\mu$ M) göstermiştir (106). *S. suffruticosa* Montbret&Aucher ex Benth. bitki ekstresinin fitokimyasal analizi, lupeol,  $\beta$ -sitosterol, stigmasterol, kafeik asit ve 1-feruloil- $\beta$ -D-glikopiranoz izolasyonu ile sonuçlanmıştır. Test edilen örnekler arasında lupeol, MCF-7, T-47D ve MDA-MB-231 meme kanseri hücre serilerine karşı ( $IC_{50}$  değerleri  $33.38 \pm 2.6$ ,  $36.70 \pm 3.1$  ve  $23.66 \pm 1.4$   $\mu$ g/mL sırasıyla) en güçlü inhibe edici aktiviteyi göstermiştir (111).

Genel olarak türe ve elde edilen bileşiklere bağlı olarak bu cinse ait türlerin iyi derecede sitotoksik aktivite gösterdiği görülmektedir. Fakat bizim çalıştığımız 6 türün ekstrelerinin düşük sitotoksik aktivite gösterdiği görülmektedir. Buna karşın bu türlerden elde edilen bazı bileşiklerin (6,7-dehidroroyleanon, asetil royleanon, ferruginol, inuroyleanol, 12-demetilmultikaulin, 12-hidroksi abieta-1,3,5(10),8,11,13-hekzan ve triterpen yapısındaki 4 yeni bileşiğin) iyi derecede sitotoksik aktivite gösterdiği söylenebilir.

Western Blot sonuçlarına baktığımızda özellikle asetilroyleanon (C-29) ve 6,7 dehidroroyleanon (C-36) maddelerinin HT-29, MCF-7 kanserli hücre serisi ve PDF sağlıklı hücre serisi üzerinde umut verici sonuçlar verdiği görülmektedir. Aynı şekilde kriptotansinon (C-61) maddesinin kanserli HT-29 ve MCF-7 hücre serisi üzerinde umut verici sonuçlar verdiği görülmektedir. Literatüre baktığımızda elde ettiğimiz ve detaylı antikanser çalışmalarını yaptığımız bileşikler ile ilgili antikanser çalışmaların mevcut olmadığı görülmektedir.

Çalıştığımız cinse ait türlerden elde edilen diğer bileşikler ile ilgili detaylı antikanser çalışmalara baktığımızda; *S. miltiorrhiza* Bunge'nin kökünden izole edilmiş trijuganon C'nin antiproliferatif aktivite ve apoptozis indüksiyonunun incelendiği bir çalışmada, Trijuganon C, insan lösemi hücreleri HL-60, Jurkat ve U937'ye karşı önemli antiproliferatif aktiviteler göstermiştir. Trijuganon C, kromatin yoğunlaşmasını, DNA fragmantasyonunu, kaspaz -3, -8 ve -9' un aktivasyonunu ve HL-60 hücrelerinde poli (ADP-riboz) polimerazın (PARP) parçalanmasını



indüklemiştir. Ayrıca, bu bileşik Bid ve Bax'ı aktifleştirmiş, mitokondriyal membran potansiyelinin kaybına yol açmış ve mitokondriden sitozole sitokrom C salınımını indüklemiştir. Aksine, Bcl-2 ve Bcl-xL Trijuganon C'den etkilenmemiştir. Bu sonuçlar Trijuganon C'nin mitokondriyal disfonksiyon ve kaspaz aktivasyonunun aracılık ettiği apoptozis indüksiyonu yoluyla antiproliferatif etkileri olduğunu göstermiştir (110).

*S. multiorrhiza* ekstresinden elde edilen dihidrotanshinonun insan glioma SHG-44 hücreleri üzerindeki antikanser etkileri 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazolyum bromür deneyi, Hoechst 33258 nükleer boyama, Annexin V/propidium iyodür çift boyama ve aynı zamanda Western Blot analizi kullanılarak araştırılmıştır. Sonuçlar, dihidrotanshinonun SHG-44 hücrelerinin proliferasyonunu etkili bir şekilde bastırdığını ve hem doza hem de zamana bağlı bir şekilde apoptozisi indüklediğini göstermiştir. Ayrıca, dihidrotanshinonun, kaspazların (kaspaz-3 ve kaspaz-9) aktivasyonunu ve SHG-44 hücrelerinde sitokrom C salınımını arttırdığı görülmüştür. Genel olarak dihidrotanshinonun, apoptozisi indükleyebildiği ve kaspazlar ve sitokrom C'yi düzenleyerek gliom hücrelerinin proliferasyonunu inhibe edebildiği görülmüştür (114).

Kriptotanshinon'un yumurtalık kanseri hücreleri üzerindeki önleyici etkisini değerlendirmek ve altta yatan moleküler mekanizmayı incelemek için bir çalışma yapılmıştır. Mekanizmalarda yer alan proteinleri metastaz ve apoptozis açısından araştırmak için Western Blot yöntemi kullanılmıştır. Kriptotanshinon, kaspaz kaskadını aktive ederek yumurtalık kanseri A2780 hücrelerinin apoptozisini önemli ölçüde indüklemiştir. Elde edilen veriler Kriptotanshinon'un yumurtalık kanseri hücreleri üzerindeki anti-tümör etkisini doğrulamış ve yumurtalık kanseri hücrelerini kemoterapiye duyarlı hale getirebileceği konusunda yeni bulgular sağlamıştır (116).

## 6. SONUÇ

Bu tez çalışmasında 6 *Salvia* türünün ekstre ve izole edilen bileşikler düzeyinde sitotoksik etkileri ile bazı bileşiklerin detaylı antikanser çalışmaları ilk defa tarafımızdan çalışıldı.

Genel olarak sonuçlara bakıldığında özellikle asetilroyleanon ve 6,7 dehidroroyleanon bileşiklerinin özellikle kanserli hücre serileri üzerinde umut verici sonuçlar verdiği görülmektedir. Bu nedenle çalışılan türlerden elde edilen bu maddelerin sanayi ölçekli üretim yollarının ortaya konulması önem kazanmaktadır. Üretim yollarının ortaya konulmasının yanı sıra bu maddelerin daha ileri faz çalışmalarının yapılması gerektiğini düşünmekteyiz.

Sonuç olarak 6 endemik *Salvia* türü ilk defa tarafımızdan detaylı bir şekilde kimyasal ve biyolojik yönden incelendi. Ülkemizin zenginliklerinden olan *Salvia* türleri ile yapılacak diğer kimyasal ve biyolojik aktivite çalışmalarına bu tez sonuçları önemli katkı sağlayacaktır.

## 7. KAYNAKLAR

1. Demir S, Aliyazicioglu Y, Turan I, Misir S, Mentese A, Ozer Yaman S, Akbulut K, Kilinc K, Deger O. Antiproliferative and proapoptotic activity of Turkish propolis on human lung cancer cell line. *Nutrition and Cancer*. 2016; 68(1):165-172.
2. Kathiresan K, Boopathy NS, Kavitha S. Coastal vegetation-an underexplored source of anticancer drugs. *Natural Product Radiance*. 2006; 5:115-119.
3. Yılmaz HH, Yazıhan N, Tunca D, Sevinç A, Olcayto EÖ, Özgül N, Tuncer M. Cancer trends and incidence and mortality patterns in Turkey. *Japanese journal of clinical oncology*. 2010; 41(1):10-16.
4. Liang CH, Wang GH, Chou TH, Wang SH, Lin RJ, Chan LP, So EC, Sheu JH. 5-epi-Sinuleptolide induces cell cycle arrest and apoptosis through tumor necrosis factor/mitochondria-mediated caspase signaling pathway in human skin cancer cells. *Biochim Biophys Acta*. 2012; 1820(7):1149-57.
5. Cenic-Milosevic D, Tambur Z, Bokonjic D, Ivancajic S, Stanojkovic T, Grozdanic N, Juranic Z. Antiproliferative effects of some medicinal plants on HeLa cells. *Archives of Biological Sciences*. 2013; 65(1):65-70.
6. Rosangkima G, Prasad SB. Antitumour activity of some plants from Meghalaya and Mizoram against murine ascites Dolton's lymphoma. *Indian Journal of Experimental Biology*. 2004; 42:981-988.
7. Zhou L, Zuo Z, Chow MSS. Danshen: an overview of its chemistry, pharmacology, pharmacokinetics, and clinical use. *Journal of Clinical Pharmacology*. 2005; 45(12):1345-1359.
8. Baytop, T. Türkçe Bitki Adları Sözlüğü. Türk Dil Kurumu Yayınları. Ankara. 1994, p:578.
9. Topçu G, Turkmen G, Kiliç Z, Kingston DGI, Şener B. Bioactive Turkish Plant Extracts and Their Constituents. *Innovations in Chemical Biology*. 2009; 10:61-81.
10. Topçu G, Turkmen Z, Schilling JK, Kingston DGI, Pezzuto JM, Ulubelen A. Cytotoxic activity of some Anatolians *Salvia* extracts and isolated abietane diterpenoids. *Pharmaceutical Biology*. 2008; 46(3):180-184.
11. Özek G, Demirci F, Özek T, Tabanca N, Wedge DE, Khan SI, Başer KHC, Duran A, Hamzaoglu E. Gas chromatographic-mass spectrometric analysis of volatiles obtained by four different techniques from *Salvia rosifolia* Sm., and evaluation for biological activity. *Journal of Chromatography A*. 2010; 1217(5):741-748.

12. Li H, Zhang Q, Chu T, Shi HY, Fu HM, Song XR, Meng WT, Mao SJ, Jia YQ. Growth-inhibitory and apoptosis-inducing effects of tanshinones on hematological malignancy cells and their structure-activity relationship. *Anti-Cancer Drugs*. 2012; 23(8):846-855.
13. Lee AR, Chang WL, Lin HC, King ML. Isolation and bioactivity of newtanshinones. *Journal of Natural Products*. 1987; 50:157–161.
14. Hao YB, Xie TP, Korotcov A, Zhou YF, Pang XV, Shan L, Ji HG, Sridhar R, Wang P, Califano J, Giu XB. Salvianolic acid B inhibits growth of head and neck squamous cell carcinoma in vitro and in vivo via cyclooxygenase-2 and apoptotic pathways. *International Journal of Cancer*. 2009; 124(9):2200-2209.
15. Johnson JJ. Carnasol: A promising anti-cancer and anti-inflammatory agent. *Cancer Letters*. 2011; 305(1):1-7.
16. Son KH, Oh HM, Choi SK, Han DC, Kwon BM. Anti-tumor abietane diterpenes from the cones of *Sequoia sempervirens*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 2005; 15:2019–2021.
17. Dong Y, Morris-Natschke SL, Lee KH. Biosynthesis, total syntheses, and antitumor activity of tanshinones and their analogs as potential therapeutic agents. *Natural Products Reports*. 2011; 28:529-542.
18. Wang X, Morris-Natschke SL, Lee KH. New developments in the chemistry and biology of the bioactive constituents of Tanshen. *Medicinal Research Reviews*. 2007; 27:133-148.
19. Yoon Y, Kim YO, Jeon WK, Park HJ, Sung HJ. Tanshinone IIA isolated from *Salvia miltiorrhiza* BUNGE induced apoptosis in HL60 human premyelocytic leukemia cell line. *Journal of Ethnopharmacology*. 1999; 68:121-127.
20. Yuxian X, Feng T, Ren L, Zhengcai L. Tanshinone II-A inhibits invasion and metastasis of human hepatocellular carcinoma cells in vitro and in vivo. *Tumori*. 2009; 95:789-795.
21. Tang C, Xue HL, Huang HB, Wang XG. Tanshinone IIA inhibits constitutive STAT3 activation, suppresses proliferation, and induces apoptosis in rat C6 glioma cells. *Neuroscience Letters*. 2010; 470:126-129.
22. Cheng TO. Cardiovascular effects of danshen. *International Journal of Cardiology*. 2007; 121(1):9-22.
23. Chen L, Kang YH. Antioxidant and enzyme inhibitory activities of Plebeian Herba (*Salvia plebeia* R. Br.) under different cultivation conditions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2014; 62(10):2190-2197.

24. Ni WM, Qian WB, Tong XM. Tanşinonptotanshinone induces apoptosis of HL-60 cells via mitochondrial pathway. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*. 2014; 13(4):545-551.
25. Tayarani-Najaran Z, Mousavi SH, Tajfard F, Asili J, Soltani S, Hatamipour M, Emami SA. Cytotoxic and apoptogenic properties of three isolated diterpenoids from *Salvia chorassanica* through bioassay-guided fractionation. *Food and Chemical Toxicology*. 2013; 57:346-351.
26. Greuter W. *International Code of Botanical Nomenclature*. Koetz Scientific Books. Konigstein, Germany. 1988.
27. Hedge IC. A global survey of the Lamiaceae. *Advencis in Labiatea Science*. 1992; 7-18.
28. Hedge IC. Lamiaceae of South-West Asia: diversity, distribution and endemism. 89B. *Proceeding of the Royal society, Edingburgh*. 1986; 23-25.
29. Chadeaud M, Emberger L. *Traite De Botanique (Systematique)*. Tome II, 1960; 832-833.
30. Baytop A. *Farmasötik Botanik Ders Kitabı*. İstanbul Üniversitesi Yayınları, İstanbul. 1996.
31. Davis PH. *Flora of Turkey an The East Eagen Islands*. Edinburg University Pres, Edinburg. 1982; 7:335-346.
32. Hatipoğlu S. *Salvia adenophylla* ve *Salvia verticillata* subsp. *amasiaca* Bitkilerindeki Sekonder Metabolitlerin Aktivite Odaklı İzolasyonu ve Yarı Sentetik Türevlerinin Antioksidan ve Antikolinesteraz aktivitelerinin İncelenmesi. İstanbul Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 2010, İstanbul, Türkiye.
33. Başer KHC, Kırmir N. Essential Oils of Lamiaceae Plants of Turkey. *Acta Horticulturae*. 2006; 723:163-171.
34. Başer KHC. Aromatic Biodiversity among the Flowering Plant Taxa of Turkey. *Pure Appl. Chem*. 2002; 74:527-545.
35. Celep F, Dirmenci T, Güner Ö. *Salvia hasankeyfense* (Lamiaceae), a new species from Hasankeyf (Batman, South-eastern Turkey). *Phytotaxa*. 2015; 227:289–294.
36. Delamare APL, Moschen-Pistorello IT, Artico L, Atti-Serafini L, Echeverrigaray S. Antibacterial activity of the essential oils of *Salvia officinalis* L. and *Salvia triloba* L. cultivated in South Brazil. *Food Chemistry*. 2005; 100:603–608.

37. Onlooker. Sage against Age. The Pharmaceutical Journal Vol. 1995; 255:708.
38. Baytop T. Türkiye’de Bitkiler ile Tedavi. Nobel Tıp Kitapevleri, İkinci Baskı. 1999.
39. Sezik E, Yeşilada E, Tabata M, Honda G, Takaishi Y, Fujita T, Tanaka T, Takeda Y. Traditional Medicine in Turkey VIII Folk Medicine in East Anatolia; Erzurum, Erzincan, Ağrı, Kars, Iğdır, Provinces. Economic Botany. 1997; 51:195-211.
40. Sezik E, Yeşilada E, Kırmıner N. Uçucu Yağ Taşıyan Türk Halk İlaçları, Essential Oils, Mat, A. (Eds.) Anadolu Üniversitesi Basımevi, Eskişehir. 1999; 98-131.
41. Eröz İ. Eskişehir Çevresinde Yetişen Bazı *Salvia* Türleri Üzerinde Morfolojik ve Anatomik Araştırmalar. Anadolu Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Farmasötik Botanik Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, 2001, Eskişehir.
42. Baytop A. Türkiye’de Kullanılan Yabani ve Yetiştirilmiş Aromatik Bitkiler. Doğa TU Eczacılık D. 1991; 1:76-88.
43. Honda G, Yeşilada E, Tabata M, Sezik E, Fujita T, Takeda Y, Takaishi Y, Tanaka T. Traditional Medicine in Turkey VI Folk Medicine in West Anatolia, Afyon, Kütahya, Denizli, Muğla, Aydın, Provinces. Journal of Ethnopharmacology. 1996; 53:75-87.
44. Akgül A. Baharat Bilimi ve Teknolojisi, Gıda Teknolojisi Derneği Yayınları, 1993. No: 15, Ankara.
45. Yeşilada E, Honda G, Sezik E, Tabata M, Fujita T, Tanaka T, Takaishi Y. Traditional Medicine in Turkey V Folk Medicine in the Inner Taurus Mountains. Journal of Ethnopharmacology. 1995; 46:133-152.
46. Yeşilada E, Honda G, Sezik E, Tabata M, Goto K, Ikeshiro Y. Traditional Medicine in Turkey IV. Folk Medicine in the Mediterranean Subdivision. Journal of Ethnopharmacology. 1993; 39:31-38.
47. Fujita T, Sezik E, Tabata M, Yeşilada E, Honda G, Takeda Y, Tanaka T, Takaishi Y. Traditional Medicine in Turkey VII Folk Medicine in Middle and West Black Sea Regions. Economic Botany. 1995; 49:406-422.
48. Tabata M, Sezik E, Honda G, Yeşilada E, Fukui H, Goto K, Ikeshiro Y. Traditional Medicine in Turkey III. Folk Medicine in East Anatolia, Van and Bitlis Provinces. International Journal of Pharmacognosy. 1994; 32:3-12.

49. Tümen G, Sezik E, Baser KHC. The Essential Oils of *Saturja Parmassica* Hedr. And Sart, Ex Boiss Subsp. Siplea P.H Davis. *Flav.Frag.J.*, 1992; 7(1):43-46.
50. Parekh J, Jadeja D, Chanda S. Efficacy of aqueous and methanol extracts of some medicinal plants for potential antibacterial activity. *Turk J.Bio.* 2005; 29:203-210.
51. Digrak M, İlçim A, Alma MH, Şen S. Antimicrobial activities of the extracts of various plants (Valex, Mimosa Bark, Gallnut Powders, *Salvia* Sp. and *Phlomis* Sp.). *Tr. J. Of Biology.* 1999; 23:241-248.
52. Verastegui MA, Sanchez CA, Heredia NL, Garcia-Alvadaro JS. Antimicrobial activity of extracts three major plants from the chihuahuan desert. *Ethnopharmacol.* 1996; 52:175-177.
53. Kamatoua GPP, Viljoen AM, Gono-Bwalya AB, Van Zyl RF, Van Vuuren RL, Lourens ACU, Baser KHC, Demirci B, Lindsey KL, Van Staden J, Steenkamp. The in vitro pharmacological activities and a chemical investigation of three south african *Salvia* species. *Journal of Ethnopharmacology.* 2005; 102:382-390.
54. Nostro A, Germano MP, Angelo VD, Marino A, Cannatelli MA. Extraction methods and bioautography for evaluation of medicinal plant antimicrobial activity. *Letters in Applied Microbiology.* 2000; 30:379-384.
55. Kamatoua GPP, Viljoen AM, Van Vuuren SF, Van Zyl RL. In vitro evidence of antimicrobial synergy between *Salvia chamelaeagnea* and *Leonotis leonurus*. *South African Journal of Botany.* 2006; 72:634-636.
56. Kabouchea A, Kabouchea Z, Öztürk M, Kolak U, Topçu G. Antioxidant abietane diterpenoids from *Salvia barrelieri*. *Food Chemistry.* 2006; 102(4):1281-1287.
57. Tepe B. Antioxidant potentials and rosmarinic acid levels of the methanolic extracts of *Salvia virgata* (Jacq), *Salvia staminea* (Montbret & Aucher Ex Benth) and *Salvia verbenaca* (L.) from Turkey. *Bioresource Tecnology.* 2007.
58. Lin LZ, Wang XM, Huang XL, Huang Y, Cordell GA. Sapriolactone, a cytotoxic norditerpene from *Salvia prionitis*. *Phytochemistry.* 1989; 28:3542-3543.
59. Ulubelen A, Topçu G, Chai HB, Pezzuto JM. Cytotoxic activity of diterpenoids isolated from *Salvia hypargeia*. *Pharmaceutical Biology.* 1999; 37:148-151.

60. Jimenez J, Risco S, Ruiz T, Zarzuelo A. Hypoglycemic activity of *Salvia lavandulifolia*. *Planta Medica*. 1986; 52:260-262.
61. Orhan İ, Kartal M, Naz Q, Ejaz A, Yılmaz G, Kan Y, Konuklugil B, Şener B, Choudhary MI. Antioxidant and anticholinesterase evaluation of selected Turkish *Salvia* species. *Food Chemistry*. 2007; 103:1247-1254.
62. Lu Y, Foo LY. Flavonoid and phenolic glycosides from *Salvia officinalis*. *Phytochemistry*. 2000; 55(3):263-267.
63. Wang ZY, Huang MT, Lou YR, Xie JG, Reuhl KR. Inhibitory effects of black tea, green tea, decaffeinated black tea and decaffeinated green tea on ultraviolet B light-induced skin carcinogenesis in 7,12-dimethylbenz(a)anthracene-initiated SKH-1 mice. *Cancer Research*. 1994; 54:3428-3435.
64. Topçu G, Tan N, Ulubelen A, Sun D, Watson WH. Terpenoids and flavonoids from the aerial parts of *Salvia candidissima*. *Phytochemistry*. 1995; 40:501-504.
65. Lu Y, Foo LY. Polyphenolics of *Salvia*. *Phytochemistry*. 2002; 59:117–140.
66. Ulubelen A, Tuzlacı E. Flavonoids and triterpenoids from *Salvia euphratica* and *S. longipedicellata*. *Fitoterapia*. 1990; 61:185.
67. Ai CB, Li LN. Salvianolic acids D and E: Two new depsides from *Salvia miltiorrhiza*. *Planta Medica*. 1992; 58:197–199.
68. Cuvelier ME, Berset C, Richard H. Antioxidant constituents in sage (*Salvia officinalis*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 1994; 42:665- 669.
69. Morimoto S, Goto Y, Shoyama Y. Production of lithospermic acid B and rosmarinic acid in callus tissue and regenerated plantlets of *Salvia miltiorrhiza*. *Journal of Natural Products*. 1994; 57:817–823.
70. Nakazawa T, Ohsawa K. Metabolism of rosmarinic acid in rats. *Journal of Natural Products*. 1998; 61:993–996.
71. Kang HS, Chung HY, Jung JH, Kang SS, Choi JS. Antioxidant effect of *Salvia miltiorrhiza*. *Archives of Pharmacal Research*. 1997; 20:496–500.
72. Thomas-Barberan FA, Wollenweber E. Flavonoid aglycons from the leaf surfaces of some labiatae species. *Plant Systematics and Evolution*. 1990; 173:109-118.
73. Topçu G, Ulubelen A, Timothy C, Tao-Che C. Sesterterpenes and other constituents of *Salvia yosgadensis*. *Phytochemistry*. 1996; 42:1089-1092.



74. Adzet T, Canigueral S, Iglesias J. A chromatographic survey of polyphenols from *Salvia* species. *Biochemical Systematic Ecology*. 1988; 16:29-32.
75. Santos-Gomes PC, Seabra RM, Andrade PB, Fernandesferreira M. Phenolic antioxidant compounds produced by in vitro shoots of sage (*Salvia officinalis* L.). *Plant Science*. 2002; 162:981-987.
76. Lu Y, Foo LY. Antioxidant activity of polyphenols from sage (*Salvia officinalis*). *Food Chemistry*. 2001; 75:197-202.
77. Sönmez U. *Salvia napifolia* Jacq. bitkisinden elde edilen yeni diterpenoit bileşiklerinin yapı araştırması İstanbul Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, 1995, İstanbul.
78. Rodriguez-Hahn L, Martinez G, Romo J. Estructura del acido melisodorico, un diterpeno aislado de *Salvia melissofora* Lag. *Rev. Latinoamer.Quim*. 1973; 4:93-100.
79. Topçu G, Ulubelen A. Diterpenoids from *Salvia wiedemannii*. *Phytochemistry*. 1990; 29:2346-2348.
80. Topçu G, Ulubelen A. Diterpenoids from *Salvia wiedemannii*. *Phytochemistry*. 1991; 30:2412-2413.
81. Rustaiyan A, Niknejad A, Nazarians L, Jakupovic J, Bohlman F. Sesterterpenes from *Salvia hypoleuca*. *Phytochemistry*. 1982; 21:1812-1813.
82. Rustaiyan A, Koussari S. Further sesterterpenes from *Salvia hypoleuca*. *Phytochemistry*. 1988; 27:1767-1769.
83. Brieskorn CH, Schlumprecht I. Constituents of *Salvia officinalis*, VIII. Isolation of ursolic acid. *Arch, der Pharm*. 1951; 284:239-242.
84. Pedresos, S., Rodriguez, B., de la Torre, M.C., Bruno, M., Savona, G., Perales, A., Torres, M. 1990. Dammarane triterpenes of *Salvia hierosolymitana*. *Phytochemistry*. 29, 919-922.
85. Mirzaei HH, Firuzi O, Schneider B, Baldwin IT, Jassbi AR. Cytotoxic diterpenoids from the roots of *Salvia lachnocalyx*. *Revista Brasileira de Farmacognosia* 2017; 27(4):475-479.
86. Tundis R, Iacopetta D, Sinicropi MS, Bonesi M, Leporini M, Passalacqua NG, Ceramella J, Menichini F, Loizzo MR. Assessment of antioxidant, antitumor and pro-apoptotic effects of *Salvia fruticosa* Mill. subsp *thomasi* (Lacaita) Brullo, Guglielmo, Pavone & Terrasi (Lamiaceae). *Food and Chemical Toxicology*. 2017; 106:155-164.

87. Bahadori MB, Mirzaei M. Cytotoxicity, antioxidant activity, total flavonoid and phenolic contents of *Salvia urmiensis* Bunge and *Salvia hydrangea* DC. ex Benth Research. Journal of Pharmacognosy. 2015; 2 (2):27–32.
88. Bisio A, Schito AM, Parricchi A, Mele G, Romussi G, Malafronte N, Oliva P. Antibacterial activity of constituents from *Salvia buchananii* Hedge (Lamiaceae). Nunziatina De Tommasi Phytochemistry Letters. 2015; 14:170-177.
89. Ulubelen A, Sönmez U, Topcu G, Johansson CB. An abietane diterpene and two phenolics from *Salvia forskahlei*. Phytochemistry. 1996; 42(1):145–147.
90. Bahadori M.B, Dinparast L, Zengin G, Sarıkürkçü C, Bahadori S, Asghari B, Movahhedini N. Functional components, antidiabetic, anti-Alzheimer's disease, and antioxidant activities of *Salvia syriaca* L. International Journal Of Food Properties. 2017; 20:1761-1772.
91. Yang Y, Lu WQ, Wu ZJ, Chen WS. A new Diterpenoid from *Salvia przewalskii*. Records Of Natural Products. 2017; 11(4):416-420.
92. Tohma H, Köksal E, Kılıç Ö, Alan Y, Yılmaz MA, Gülçin İ, Bursal E, Alwasel SH. RP-HPLC/MS/MS analysis of the phenolic compounds, antioxidant and antimicrobial activities of *Salvia* L. species. Antioxidants. 2016; 5(4):38.
93. Paun G, Neagu E, Moroeanu V, Ungureanu O, Cretu R, Ionescu E, Tebrencu CE, Ionescu R, Stoica I, Radu GL. Phytochemical analysis and in vitro biological activity of *Betonica officinalis* and *Salvia officinalis* extracts. Romanian Biotechnological Letters. 2017; 22(4):12751-12761.
94. Çulhaoğlu B, Hatipoğlu SD, Dönmez AA, Topçu G. Antioxidant and anticholinesterase activities of lupane triterpenoids and other constituents of *Salvia trichoclada*. Medicinal Chemistry Research. 2015; 24 (11):3831-3837.
95. Mirzaei HH, Firuzi O, Chandran JN, Schneider B, Jassbi AR. Two antiproliferative seco-4,5-abietane diterpenoids from roots of *Salvia ceratophylla* L. Phytochemistry Letters. 2019; 29:129-133.
96. Alimpic A, Knezevic A, Milutinovic M, Stevic T, Savikin K, Stajic M, Markovic S, Marin PD, Matevski V, Duletic-Lausevic S. Biological activities and chemical composition of *Salvia amplexicaulis* Lam. extracts. Industrial Crops and Products. 2017; 105:1-9.
97. Poyraz IE, Çiftçi GA, Öztürk N. Phenolic contents, in vitro antioxidant and cytotoxicity activities of *Salvia aethiopsis* L. and *S. ceratophylla* L. (Lamiaceae). Rec. Nat. Prod. 2017; 11(4):345-355.

98. Ma LF, Wang PF, Wang JD, Tong XM, Shan WG, Zhang H, Zhan ZJ. New eudesmane sesquiterpenoids from *Salvia plebeia* R. Br. *Chemistry & Biodiversity* 2017; 14(8).
99. Altay A, Bozoglu F. *Salvia fruticosa* modulates mrna expressions and activity levels of xenobiotic metabolizing CYP1A2, CYP2E1, NQO1, GPx, and GST enzymes in human colorectal adenocarcinoma HT-29 cells. *Nutrition and Cancer*. 2017; 69(61):892-903.
100. Sallam A, Mira A, Ashour A, Shimizu K. Acetylcholine esterase inhibitors and melanin synthesis inhibitors from *Salvia officinalis*. *Phytomedicine*. 2016. 23(10):1005-1011.
101. Fotovvat M, Radjabian T, Saboora A. HPLC fingerprint of important phenolic compounds in some *Salvia* L. species from Iran. *Rec. Nat. Prod.* 2019; 13(1):37-49.
102. Farhat MB, Sotomayor JA, Jordán MJ. Antioxidants of *Salvia aegyptiaca* L. residues depending on geographical origin. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology* 2019; 17:486-491.
103. Grzegorzczak-Karolak I, Kiss A. Determination of the phenolic profile and antioxidant properties of *Salvia viridis* L. shoots: A comparison of aqueous and hydroethanolic extracts. *Molecules*. 2018; 23(6):1468.
104. Pereira OR, Catarino MD, Afonso AF, Silva AMS, Cardoso SM. *Salvia elegans*, *Salvia greggii* and *Salvia officinalis* decoctions: antioxidant activities and inhibition of carbohydrate and lipid metabolic enzymes. *Molecules*. 2018; 23(12):3169.
105. Tabefam M, Farimani MM, Danton O, Ramseyer J, Ebrahimi SN, Neuburger M, Kaiser M, Salehi P, Potterat O, Hamburger M. Antiprotozoal isoprenoids from *Salvia hydrangea*. *J. Nat. Prod.* 2018; 81(12):2682–2691.
106. Lehbili M, Magid AA, Kabouche A, Voutquenne-Nazabadioko L, Abedini A, Morjani H, Gangloff SC, Kabouche Z. Antibacterial, antioxidant and cytotoxic activities of triterpenes and flavonoids from the aerial parts of *Salvia barrelieri* Etl. *Natural Product Research*. 2018; 32(22):2683-2691.
107. Bahadori MB, Eskandani M, De Mieri M, Hamburger M, Nazemiyeh H. Anti-proliferative activity-guided isolation of clerodermic acid from *Salvia nemorosa* L.: Geno/cytotoxicity and hypoxia-mediated mechanism of action. *Food and Chemical Toxicology*. 2018; 120:155-163.
108. Duletic Lausevic S, Alimpic Aradski A, Savikin K, Knezevic A, Milutinovic M, Stevic T, Vukojevic J, Markovic S, Marin PD. Composition and biological activities of Libyan *Salvia fruticosa* Mill. and *S. lanigera* Poir. extracts. *South African Journal of Botany*. 2018; 117:101-109.

109. Ovidi E, Triggiani D, Valeri M, Mastrogiovanni F, Salvini L, Bonechi C, Taddei AR, Masci VL, Tiezzi A. Biological effects of *Salvia officinalis* leaf extract on murine myeloma cells. *Pharmacognosy Magazine*. 2018; 14,55.
110. Uto T, Tung NH, Ohta T, Juengsanguanpornasuk W, Hung LQ, Hai NT, Long DD, Thuong PT, Okubo S, Hirata S, Shoyama Y. Antiproliferative activity and apoptosis induction by trijuganone C isolated from the root of *Salvia miltiorrhiza*. *Phytotherapy Research*. 2018; 32,4.
111. Rustaie A, Hadjiakhoondi A, Akbarzadeh T, Safavi M, Samadi N, Sabourian R, Khanavi M. Phytochemical constituents and biological activities of *Salvia suffruticosa*. *Research Journal of Pharmacognosy*. 2018; 5(2):25-32.
112. Kamatou G, Sandasi M, Viljoen A. An overview of the biological activities and essential-oil composition of three South African *Salvia* species. *FACTA UNIVERSITATIS Series: Physics, Chemistry and Technology (FU Phsy Chem Tech)*. 2018; 16,1.
113. Privitera G, Luca T, Castorina S, Passanisi R, Ruberto G, Napoli E. Anticancer activity of *Salvia officinalis* essential oil and its principal constituents against hormone-dependent tumour cells. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*. 2019; 9(1):24-28.
114. Cao Y, Huang B, Gao C. *Salvia miltiorrhiza* extract dihydrotanshinone induces apoptosis and inhibits proliferation of glioma cells. *Bosnian journal of basic medical sciences*. 2017; 17(3):235-240.
115. Russo A, Cardile V, Graziano A, Avola R, Bruno M, Rigano D. Involvement of Bax and Bcl-2 in induction of apoptosis by essential oils of three lebanese *Salvia* species in human prostate cancer cells. *International Journal of Molecular Sciences*. 2018; 19(1):292.
116. Guoqiang J, Jia L, Baoyin R, Lin Z, Lawrence O, Likun L, Jing Z, Yawei T, Weiling L. Anti-tumor and chemosensitization effects of Cryptotanshinone extracted from *Salvia miltiorrhiza* Bge. on ovarian cancer cells in vitro. *Journal of Ethnopharmacology*. 2017; 205:33-40.
117. Farimani MM, Mohammadi MA. Two new polyhydroxylated triterpenoids from *Salvia urmiensis* and their cytotoxic activity. *Natural Product Research* 2016; 30(23):2648-2654.
118. Moghadam SB, Masoudi R, Monsefi M. *Salvia officinalis* induces apoptosis in mammary carcinoma cells through alteration of Bax to Bcl-2 ratio. *Iranian Journal of Science and Technolog*. 2018; 42(1):297-303.

119. Fiore G, Nencini C, Cavallo F, Capasso A, Bader A, Giorgi G, Micheli L. In vitro antiproliferative effect of six *Salvia* species on human tumor cell lines. *Phytotherapy Research*. 2006; 20:701-703.
120. Campos-Xolalpa N, Alonso-Castro AJ, Sanchez-Mendoza E, Zavala-Sanchez MA, Perez-Gutierrez S. Cytotoxic activity of the chloroform extract and four diterpenes isolated from *Salvia ballotiflora*. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. 2017; 27(3):302-305.
121. Zhao Q, Huo XC, Sun FD, Dong RQ. Polyphenol-rich extract of *Salvia chinensis* exhibits anticancer activity in different cancer cell lines, and induces cell cycle arrest at the G0/G1-phase, apoptosis and loss of mitochondrial membrane potential in pancreatic cancer cells. *Molecular Medicine Reports*. 2015; 4843-4850.
122. Weiwei Z, Yin L. Advances in studies on antitumor activities of compounds in *Salvia miltiorrhiza*. *China journal of Chinese materia medica*. 2010; 35(3):389.
123. Tubon I, Zannoni A, Bernardini C, Salaroli R, Bertocchi M, Mandrioli R, Vinueza D, Antognoni F, Forni M. In vitro anti-inflammatory effect of *Salvia sagittata* ethanolic extract on primary cultures of porcine aortic endothelial. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2019; 2019:1-11.
124. Tuncer M. Kanserin Ülkemiz ve Dünyada Önemi, Hastalık Yükü ve Kanser Kontrol Politikaları. Ankara: T.C. S.B. Kanserle Savaş Dairesi Başkanlığı. 2007.
125. Tuncer İ, Burgut R, Bozdemir N, Coşar EF. Türkiye’de Kanser Sıklığı. Tübitak ve Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi, Adana. 1994.
126. Atta-ur-Rahman Choudhary MI. Bioactive natural products as a potential source of new pharmacophores. *A Theory of Memory. Pure and Applied Chemistry*. 2001; 73:555-560.
127. Mukherjee PK, Kumar V, Mal M, Houghton PJ. Acetylcholinesterase inhibitors from plants. *Phytomedicine*. 2007; 14:289-300.
128. Hengartner M.O. The biochemistry of apoptosis. *Nature*. 2000; 407:770-776.
129. Favaloro B, Allocati N, Graziano V, Di Ilio C, De Laurenzi V. Role of apoptosis in disease. *AGING*. 2012; 4:5.
130. Mukhopadhyay S, Panda PK, Sinha N, Das DN, Bhutia SK. Autophagy and apoptosis: where do they meet. *Springer*. 2014; 19(4):555-566.

131. Zucco F, Angelis DI, Stamatia A. Cellular models for in vitro toxicity testing. In *Animal Cell Culture Techniques*. Ed; Clynes M, Springer Verlag, Germany. 1998.
132. Gilbert DF, Boutros M. A protocol for a highthroughput multiplex cell viability assay. *Methods Mol Biol*. 2016; 1470:75-84.
133. Riss TL, Moravec RA. Use of multiple assay endpoints to investigate the effects of incubation time, dose of toxin, and plating density in cell-based cytotoxicity assays. *Assay Drug Dev Techn*. 2004; 2(1):51- 62.
134. Galluzzi L. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring cell death in higher eukaryotes. *Cell Death Differ*. 2009; 16:1093-1107.
135. Borenfreund E, Puerner JA. Toxicity determined in vitro by morphological alterations and neutral red absorption. *Toxicol Lett*. 1985; 24(2-3):119-124.
136. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*. 1983; 65(1-2):55-63.
137. Issa Y, Watts DC, Brunton PA, Waters CM, Duxbury AJ. Resin composite monomers alter MTT and LDH activity of human gingival fibroblasts in vitro. *Dental Materials*. 2004; 20(1):12-20.
138. Yaka E, Eğrilmez MY, Keskinoglu P, Cavdar Z, Genç Ş, Genç K, İyilikçi L, Yener GG. Alzheimer hastalığında beyin omurilik sıvısında (BOS) biyolojik belirteçler ve BOS' un PC12 hücre hattı canlılığı üzerinde in vitro etkisinin değerlendirilmesi. *Türk Geriatri Dergisi*. 2006; 9(1):1-9.
139. Huet O, Petit JM, Ratinaud MH, Julien R. NADH-dependent dehydrogenase activity estimation by flow cytometric analysis of 3-(4, 5-dimethylthiazolyl-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) reduction. *Cytometry*. 1992; 13(5):532-539.
140. Harrison MA, Rae IF. *General techniques of cell culture*. Cambridge University Press. 1997.
141. Cevatemre B. Fenretinid ve İndol-3-Karbinol Kombinasyonunun Meme Kanseri Hücre Soyları Üzerindeki Sitotoksik/Apoptotik Etkilerinin Araştırılması. Uludağ Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 2012, Bursa.

142. Özel Demiralp D, İğci N, Peker S, Ayhan B. Temel Proteomik Stratejiler. Ankara Üniversitesi Yayınları. 2014. ISBN: 978-605-136-148-2.
143. Özel Demiralp D, İğci N, Peker S, Ayhan B. Temel Proteomik Stratejiler. Ankara Üniversitesi Yayınları. 2013. ISBN: 978-605-136-117-8.
144. Mojarraba M, Langzian MS, Emami SA, Asilic J, Tajarani-Najarian Z. In vitro anti-proliferative and apoptotic activity of different fractions of *Artemisia armeniaca*. Revista Brasileira de Farmacognosia. 2013; 23:783-788.
145. Çulhaoglu B, Yapar G, Dirmenci T, Topçu G. Bioactive constituents of *Salvia chrysophylla* Stapf. Natural Product Research. 2016; 27(4-5):438-447.
146. Kolak U, Hacıbekiroglu I, Öztürk M, Özgökçe F, Topçu G, Ulubelen A. Antioxidant and anticholinesterase constituents of *Salvia pocolata*. Turk J Chem. 2009; 33: 813-823.
147. Orhan I, Senol F, Dogan M. Assessment of anticholinesterase and antioxidant properties of selected sage (*Salvia*) species with their total phenol and flavonoid contents. Industrial Crops & Products. 2016; 41:21-30.



**TÜRKİYE CUMHURİYETİ**  
**DİCLE ÜNİVERSİTESİ**  
**SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**



## 8. ÖZGEÇMİŞ

<b>Adı</b>	HİLAL	<b>Soyadı</b>	SARUHAN FİDAN
<b>Doğum Yeri</b>	BİSMİL	<b>Doğum Tarihi</b>	15. 01. 1987
<b>Uyruğu</b>	T.C.	<b>Telefon</b>	05433965998
<b>E-posta</b>	hilalsaruhan87@hotmail.com		

### Eğitim Düzeyi

	<b>Mezun Olduğu Kurumun Adı</b>	<b>Mezuniyet Yılı</b>
<b>Lisans</b>	EGE ÜNİVERSİTESİ ECZACILIK FAKÜLTESİ	2009
<b>Lise</b>	FATİH LİSESİ	2003

### İş Deneyimi

<b>Görevi</b>	<b>Kurum</b>	<b>Süre (Yıl - Yıl)</b>
ECZACI	ÖZEL ALMAN HASTANESİ	2009-2010
ECZACI (MESUL MÜDÜR)	KENT ECZANESİ	2010-2011
ECZACI	ÇINAR DEVLET HASTANESİ	2010-2011
ECZACI	HİLAL ECZANESİ	2011-2013
ECZACI (ARAŞTIRMA GÖREVLİSİ)	DİCLE ÜNİVERSİTESİ	2015-



Yabancı Dil Sınav Notu								
ÜDS/YDS	YÖKDİL	IELTS	TOEFL IBT	TOEFL PBT	TOEFL CBT	FCE	CAE	CPE
78,75								

	Sayısal	Eşit Ağırlık	Sözel
<b>ALES Puanı</b>	74,23	71,55	61,20

### POSTERLER

Sıra	Çıktı türü	Yazarlar	Başlık	Yayın yeri	Durumu*
1	Poster Bildiri	Saruhan Fidan Hilal, Yarış Esra, Şentürk Kerem, İrtegün Kandemir Sevgi, Yiğitkan Serkan, Fırat Mehmet, Ertaş Abdulselam, Mete Nuriye, Kolak Ufuk, Topçu Gülaçtı	In Vitro Cytotoxic activity of Some Compounds Obtained From <i>Salvia</i> Species.	2nd International Gazi Pharma Symposium Series. 2017  <b>Kongre Özet Kitabı</b>	Yayınlandı
2	Poster Bildiri	Saruhan Fidan Hilal, Yarış Esra, İrtegün Kandemir Sevgi, Fırat Mehmet, Çakırca Hatice, Kaplaner Erhan, Mete Nuriye, Ertaş Abdulselam	In Vitro Cytotoxic Activity of Chloroform and Ethanol Extracts of <i>Salvia cerino-prunosa</i> var. <i>cerino-prunosa</i> .	2nd International Gazi Pharma Symposium Series. 2017  <b>Kongre Özet Kitabı</b>	Yayınlandı
3	Poster Bildiri	Saruhan Fidan Hilal, Balur Leyla, Yarış Esra, İrtegün Kandemir Sevgi, Ertaş Abdulselam, Fırat Mehmet, Kolak Ufuk, Topçu Gülaçtı	In Vitro Cytotoxic Activity of <i>Salvia Kurdica</i> From Anatolia.	1st International Congress on Medicinal and Aromatic Plants "Natural and healthy life". 2017  <b>Kongre Özet Kitabı</b>	Yayınlandı

4	Poster Bildiri	Saruhan Fidan Hilal,Aydın Işıl,Yarış Esra,Aygün Tuncay Evin,Zengin Gökhan,Fırat Mehmet,Boğa Mehmet,Ertaş Abdulselam	The Biological Activities and Essential Oil composition of <i>Salvia Kurdica</i>	1st International Congress on Medicinal and Aromatic Plants "Natural and healthy life". 2017  <b>Kongre Özet Kitabı</b>	Yayınlandı
5	Poster Bildiri	Saruhan Fidan Hilal,Yarış Esra,İrtegin Sevgi,Boğa Mehmet,Aygün Tuncay Evin,Mete Nuriye,Kolak Ufuk,Ertaş Abdulselam,Topçu Gülaçtı	The cytotoxic activity of ethanol and chloroform extractsof <i>Salvia cerino-pruinosa</i> var. <i>elazığensis</i> .	3. Uluslararası İlaç ve Eczacılık Kongresi- IVEK 3rd International Convention of Pharmaceutical and Pharmacies. 2017  <b>Kongre Özet Kitabı</b>	Yayınlandı

## Turnitin Orijinallik Raporu

İşleme kondu: 19-Tem-2019 13:33 +03

NUMARA: 1153178151

Kelime Sayısı: 21867

Gönderildi: 1

Benzerlik Endeksi

%24

Kaynağa göre Benzerlik

Internet Sources:	%17
Yayınlar:	%14
Öğrenci Ödevleri:	%10

biyokimya tez son Hilal Saruhan  
Fidan tarafından

5% match (16-Eki-2015 tarihli internet)

[http://www.apocpcontrol.org/paper\\_file/issue\\_abs/Volume14\\_No10/5719-5723%205.23%20Nida%20Nayyar%20Farshori.pdf](http://www.apocpcontrol.org/paper_file/issue_abs/Volume14_No10/5719-5723%205.23%20Nida%20Nayyar%20Farshori.pdf)

2% match (22-May-2017 tarihli öğrenci ödevleri)

Submitted to Dicle University on 2017-05-22

1% match (18-May-2015 tarihli internet)

<http://biotek.ankara.edu.tr/files/Miray-AKG%C3%9C%C3%87-Helicobacter-pylori%E2%80%99de-cagA-antijeni%E2%80%99nin-serumdan-in-vitro-saptanmas%C4%B1-i%C3%A7in-bir-El%C4%B1sa-.pdf>

1% match (yayınlar)

TURAN, İbrahim, DEMİR, Selim, ALİYAZICIOĞLU, Rezzan, MISIR, Sema and ALİYAZICIOĞLU, Yüksel. "Dianthus carmelitarum Ekstraktının Antioksidan ve Sitotoksik Özelliklerinin İncelenmesi", Gümüşhane Üniversitesi, 2017.

&lt; 1% match (17-Tem-2019 tarihli internet)

<https://dergipark.org.tr/download/issue-full-file/30174>

&lt; 1% match (26-Oca-2016 tarihli öğrenci ödevleri)

Submitted to Marmara University on 2016-01-26

&lt; 1% match (07-May-2019 tarihli internet)

<https://polen.itu.edu.tr/bitstream/11527/7317/1/10687.pdf>

&lt; 1% match (07-May-2019 tarihli internet)

<https://polen.itu.edu.tr/bitstream/11527/7339/1/11395.pdf>

&lt; 1% match (yayınlar)

"Salvia Biotechnology", Springer Nature, 2017

&lt; 1% match (08-Şub-2019 tarihli öğrenci ödevleri)

Submitted to Canakkale Onsekiz Mart University on 2019-02-08

&lt; 1% match (yayınlar)

Yusuf Ozay, Sevda Guzel, Ebru Gokalp Ozkorkmaz, Meltem Kumas et al. "Biochemical, Histopathologic, and Genotoxic Effects of Ethanol Extract of (Fisch. & Mey.) on Incisional and Excisional Wounded Diabetic Rats ", Journal of Investigative Surgery, 2019

&lt; 1% match (29-Ara-2015 tarihli öğrenci ödevleri)

Submitted to Gaziosmanpaşa Üniversitesi on 2015-12-29

&lt; 1% match (09-May-2017 tarihli öğrenci ödevleri)

Submitted to Kahramanmaraş Sütcü İmam University on 2017-05-09

&lt; 1% match (yayınlar)

Yi-Bing Wu, Zhi-Yu Ni, Qing-Wen Shi, Mei Dong, Hiromasa Kiyota, Yu-Cheng Gu, Bin Cong. " Constituents from Species and Their Biological Activities ", Chemical Reviews, 2012

&lt; 1% match (11-Tem-2017 tarihli internet)

<http://polen.itu.edu.tr/bitstream/11527/7319/1/10713.pdf>

&lt; 1% match (04-Mar-2019 tarihli internet)

<https://yquamoringa.com/wp-content/uploads/2017/04/Antistress-Antioxidant-and-Scavenging.pdf>

&lt; 1% match (13-Haz-2018 tarihli öğrenci ödevleri)

Submitted to Mersin Üniversitesi on 2018-06-13

&lt; 1% match (yayınlar)

Mouna Ben Farhat, Jose A. Sotomayor, María J. Jordán. "Antioxidants of Salvia aegyptiaca L. residues depending on geographical origin", Biocatalysis and Agricultural Biotechnology, 2019