

eISSN: 2564-6524



**ANKARA ÜNİVERSİTESİ
ECZACILIK FAKÜLTESİ
DERGİSİ**

**JOURNAL OF FACULTY OF PHARMACY
OF
ANKARA UNIVERSITY**

**Cilt / Vol : 44
Sayı / No : 2
Yıl / Year : 2020**

eISSN: 2564-6524



**ANKARA ÜNİVERSİTESİ
ECZACILIK FAKÜLTESİ
DERGİSİ**

**JOURNAL OF FACULTY OF PHARMACY
OF
ANKARA UNIVERSITY**

**Cilt / Vol: 44
Sayı / No: 2
Yıl / Year: 2020**

ANKARA ÜNİVERSİTESİ ECZACILIK FAKÜLTESİ DERGİSİ

(Ankara Ecz. Fak. Derg.)

eISSN: 2564-6524

Sahibi:

Prof. Dr. Gülbin ÖZÇELİKAY

Baş Editör:

Prof. Dr. İlkay YILDIZ

Ankara Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Kimya Anabilim Dalı,

06560 Yenimahalle-ANKARA,

Tel: 0 312 203 30 69

Faks: 0 312 213 10 81

e-posta: iyildiz@pharmacy.ankara.edu.tr

Editörler:

Prof. Dr. Canan HASÇİÇEK

Ankara Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı

e-posta: cogan@pharmacy.ankara.edu.tr

Doç. Dr. İlker ATEŞ

Ankara Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Toksikoloji Anabilim Dalı

e-posta: iates@pharmacy.ankara.edu.tr

Doç. Dr. Özgür ÜSTÜNDAĞ

Ankara Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Analitik Kimya Anabilim Dalı

e-posta: ustundag@pharmacy.ankara.edu.tr

Doç. Dr. Banu KAŞKATEPE

Ankara Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

e-posta: bkaskatepe@ankara.edu.tr

Dr. Öğr. Üyesi Işıl ÖZAKÇA GÜNDÜZ

Ankara Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmakoloji Anabilim Dalı

e-posta: ozakca@ankara.edu.tr

Dr. Öğr. Üyesi Aslı KOÇ

Ankara Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı

e-posta: akoc@ankara.edu.tr

Dr. Serkan ÖZBİLGİN

Ankara Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmakognozi Anabilim Dalı

e-posta: ozbilgin@pharmacy.ankara.edu.tr

Dr. Kayhan BOLELLİ

Ankara Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Kimya Anabilim Dalı

e-posta: bolelli@ankara.edu.tr

Dr. M. Mesud HÜRKUL

Ankara Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Botanik Anabilim Dalı

e-posta: mhurkul@ankara.edu.tr

Dr. Gizem GÜLPINAR

Ankara Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Eczacılık İşletmeciliği Anabilim Dalı

e-posta: gaykac@ankara.edu.tr

Editorial Danışma Kurulu:

Prof. Dr. Füsün ACARTÜRK	Gazi Üniversitesi, Ankara, TÜRKİYE
Prof. Dr. Fügen AKTAN	Ankara Üniversitesi, Ankara, TÜRKİYE
Prof. Dr. Nurten ALTANLAR	Ankara Üniversitesi, Ankara, TÜRKİYE
Prof. Dr. Nuray ARI	Ankara Üniversitesi, Ankara, TÜRKİYE
Prof. Dr. Rudolf BAUER	Graz Üniversitesi, Graz, AVUSTURYA
Prof. Dr. Benay CAN EKE	Ankara Üniversitesi, Ankara, TÜRKİYE
Prof. Dr. Alfonso Miguel Neves CAVACO	Lizbon Üniversitesi, Lizbon, PORTEKİZ
Prof. Dr. Nina CHANISHVILI	George Eliava Bak., Mik. ve Vir. Enstitüsü, Tiflis, GÜRCİSTAN
Prof. Dr. Bezhan CHANKVETADZE	Ivane Javakhishvili Tiflis Devlet Üniversitesi, Tiflis, GÜRCİSTAN
Prof. Dr. Ayşe Mine GENÇLER	Ankara Üniversitesi, Ankara, TÜRKİYE
Prof. Dr. Athina GERONIKAKI	Aristotelesçi Selanik Üniversitesi, Selanik, YUNANİSTAN
Prof. Dr. Hakan GÖKER	Ankara Üniversitesi, Ankara, TÜRKİYE
Prof. Dr. Vesna MATOVIC	Belgrad Üniversitesi, Belgrad, SIRBİSTAN
Prof. Dr. Milan STEFEK	Slovak Bilim Akademisi, Bratislava, SLOVAK CUMHURİYETİ
Prof. Dr. Zühre ŞENTÜRK	Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Van, TÜRKİYE
Prof. Dr. Istvan TOTH	Queensland Üniversitesi, AVUSTRALYA
Prof. Dr. Fikriye URAS	Marmara Üniversitesi, İstanbul, TÜRKİYE
Prof. Dr. Selen YEGENOĞLU	Hacettepe Üniversitesi, Ankara, TÜRKİYE

Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Dergisi (*Ankara Ecz. Fak. Derg.*) Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi'nin resmi bilimsel bir dergisidir. 1971 ve 2010 yılları arasında basılı olarak yayımlanmıştır.

Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Dergisi yılda 3 sayı olarak (Ocak-Mayıs-Eylül) yayımlanır. Bu dergi açık erişim, hakemli bir dergi olup, Türkçe veya İngilizce olarak farmasötik bilimler alanındaki önemli gelişmeleri içeren orijinal araştırmalar, derlemeler ve kısa bildirimler için uluslararası bir yayım ortamıdır. Yayımlanan yazıların sorumluluğu yazar(lar)ına aittir. Dergiye gönderilen makalelerin daha önce tamamen veya kısmen başka bir yerde yayımlanmamış veya yayımı için başka bir yere başvuruda bulunulmamış olması gereklidir. Makaleler derginin yazım kurallarına uymalıdır.

Tarandığı İndeksler

- Scopus
- Google Scholar (GS)
- Excerpta Medica Database (EMBASE)
- Scimago Journal & Country Rank (SJR)
- OpenAIRE
- UDLEdge (i-Focus, i-Future, i- Journals)

Web adresi: <http://journal.pharmacy.ankara.edu.tr/>

JOURNAL OF FACULTY OF PHARMACY OF ANKARA UNIVERSITY

(J. Fac. Pharm. Ankara)

eISSN: 2564-6524

Owner:

Prof. Dr. Gülbin ÖZÇELİKAY

Editor-in-Chief:

Prof. Dr. Ilkay YILDIZ

*Ankara University Faculty of Pharmacy, Department of Pharmaceutical Chemistry
06560 Yenimahalle-Ankara/TURKEY
Tel: 0 312 203 30 69
Fax: 0 312 213 10 81
e-mail: efd.editor@ankara.edu.tr*

Editors:

Prof. Dr. Canan HASÇİÇEK

*Ankara University, Faculty of Pharmacy, Department of Pharmaceutical Technology
e-mail: cogan@pharmacy.ankara.edu.tr*

Assoc. Dr. Prof. İlker ATEŞ

*Ankara University, Faculty of Pharmacy, Department of Pharmaceutical Toxicology
e-mail: iates@pharmacy.ankara.edu.tr*

Assoc. Dr. Prof. Özgür ÜSTÜNDAĞ

*Ankara University, Faculty of Pharmacy, Department of Analytical Chemistry
e-mail: ustundag@pharmacy.ankara.edu.tr*

Assoc. Dr. Prof. Banu KAŞKATEPE

*Ankara University, Faculty of Pharmacy, Department of Pharmaceutical Microbiology
e-mail: bkaskatepe@ankara.edu.tr*

Assis. Dr. Prof. Işıl ÖZAKÇA GÜNDÜZ

*Ankara University, Faculty of Pharmacy, Department of Pharmacology
e-mail: ozakca@ankara.edu.tr*

Assis. Dr. Prof. Aslı KOÇ

*Ankara University, Faculty of Pharmacy, Department of Biochemistry
e-mail: akoc@ankara.edu.tr*

Dr. Serkan ÖZBİLGİN

*Ankara University, Faculty of Pharmacy, Department of Pharmacognosy
e-mail: ozbilgin@pharmacy.ankara.edu.tr*

Dr. Kayhan BOLELLİ

*Ankara University, Faculty of Pharmacy, Department of Pharmaceutical Chemistry
e-mail: bolelli@ankara.edu.tr*

Dr. M. Mesud HÜRKÜL

*Ankara University, Faculty of Pharmacy, Department of Pharmaceutical Botany
e-mail: mhurkul@ankara.edu.tr*

Dr. Gizem GÜLPİNAR

*Ankara University, Faculty of Pharmacy, Department of Pharmacy Business Administration
e-posta: gaykac@ankara.edu.tr*

Editorial Advisory Board:

Prof. Dr. Füsün ACARTÜRK	Gazi University, Ankara, TURKEY
Prof. Dr. Fügen AKTAN	Ankara University, Ankara, TURKEY
Prof. Dr. Nurten ALTANLAR	Ankara University, Ankara, TURKEY
Prof. Dr. Nuray ARI	Ankara University, Ankara, TURKEY
Prof. Dr. Rudolf BAUER	University of Graz, Graz, AUSTRIA
Prof. Dr. Benay CAN EKE	Ankara University, Ankara, TURKEY
Prof. Dr. Alfonso Miguel Neves CAVACO	University of Lisbon, Lisbon, PORTUGAL
Prof. Dr. Nina CHANISHVILI	George Eliava Institute of Bac., Mic. and Vir., Tbilisi, GEORGIA
Prof. Dr. Bezhan CHANKVETADZE	Ivane Javakhishvili Tbilisi State University, Tbilisi, GEORGIA
Prof. Dr. Ayşe Mine GENÇLER	Ankara University, Ankara, TURKEY
Prof. Dr. Athina GERONIKAKI	Aristotelian University of Thessaloniki, Thessaloniki, GREECE
Prof. Dr. Hakan GÖKER	Ankara University, Ankara, TURKEY
Prof. Dr. Vesna MATOVIC	University of Belgrade, Belgrade, SERBIA
Prof. Dr. Milan STEFEK	Slovak Academy of Sciences, Bratislava, SLOVAK REPUBLIC
Prof. Dr. Zühre ŞENTÜRK	Yuzuncu Yil University, Van, TURKEY
Prof. Dr. Istvan TOTH	University of Queensland, AUSTRALIA
Prof. Dr. Fikriye URAS	Marmara University, Istanbul, TURKEY
Prof. Dr. Selen YEĞENOĞLU	Hacettepe University, Ankara, TURKEY

Journal of Faculty of Pharmacy of Ankara University (*J. Fac. Pharm. Ankara*) is official scientific journal of Ankara University Faculty of Pharmacy. It was published between 1971 and 2010 as a print.

Journal of Faculty of Pharmacy of Ankara University is published three times (January-May-September) a year. It is an international medium, an open access, peer-reviewed journal for the publication of original research reports, reviews and short communications in English or Turkish on relevant developments in pharmaceutical sciences. All the articles appeared in this journal are published on the responsibility of the author(s). The manuscript submitted to the journal should not be published previously as a whole or in part and not be submitted elsewhere. The manuscripts should be prepared in accordance with the requirements specified.

Indexing and Abstracting

- Scopus
- Google Scholar (GS)
- Excerpta Medica Database (EMBASE)
- Scimago Journal & Country Rank (SJR)
- OpenAIRE
- UDLEdge (i-Focus, i-Future, i- Journals)

Web address: <http://journal.pharmacy.ankara.edu.tr/>

İÇİNDEKİLER / CONTENTS 44(2), 2020

Özgün Makaleler / Original Articles

Sayfa / Page

Tugba ERTAN-BOLELLI, Kayhan BOLELLI - PHARMACOPHORE MODELING STUDIES ON KNOWN MMP-9 ENZYME INHIBITORS TO IDENTIFY THE IMPORTANT COMMON FEATURES - ÖNEMLİ ORTAK ÖZELLİKLERİ TANIMLAMAK AMACIYLA, BİLİNEN MMP-9 ENZİM İNHİBİTÖRLERİ ÜZERİNDE YAPILAN FARMAKOFOR MODELLEME ÇALIŞMALARI	204
Andrey GOTSULYA - SYNTHESIS AND ANTIRADICAL ACTIVITY OF ALKYL DERIVATIVES OF 5-(5-METHYL-1H-PYRAZOL-3-YL)-4-PHENYL-4H-1,2,4-TRIAZOLE-3-THIOL - 5-(5-METİL-1H-PİRAZOL-3-İL)-4-FENİL-4H-1,2,4-TRIAZOL-3-TİYOL ALKİL TÜREVLERİNİN SENTEZ VE ANTİRADİKAL AKTİVİTELERİ	211
Miray ARSLAN, Efsun Sima ÇOBAN, Sevgi ŞAR - KADIN ECZACILAR PERSPEKTİFİNDEN ECZACILIK MESLEĞİ - PHARMACY PROFESSION FROM THE PERSPECTIVE OF FEMALE PHARMACISTS	220
Roman SHCHERBYNA - AN INVESTIGATION OF THE PHARMACOKINETICS AND POTENTIAL METABOLITES OF POTASSIUM 2-((4-AMINO-5-(MORFOLINOMETYL)-4H-1,2,4-TRIAZOL-3-YL)THIO) ACETATE ON RATS - POTASYUM 2-((4-AMİNO-5-(MORFOLİNOMETİL)-4H-1,2,4-TRIAZOL-3-İL)TİYO) ASETATIN FARMAKOKİNETİĞİ VE POTANSİYEL METABOLİTLERİNİN SIÇANLARDA ARAŞTIRILMASI	233
Andrii A. SAFONOV - METHOD OF SYNTHESIS NOVEL N'-SUBSTITUTED-2-((5-(THIOPHEN-2-YLMETHYL)-4H-1,2,4-TRIAZOL-3-YL)THIO) ACETOHYDRAZIDES - YENİ N'-SÜBSTİTÜE-2-((5-(TİYOFEN-2-İLMETİL)-4H-1,2,4-TRIAZOL-3-İL)TİYO) ASETOHİDRAZİTLERİN SENTEZ YÖNTEMİ	242
Miray ARSLAN - APPLICATION OF AHP METHOD FOR THE SELECTION OF PHARMACEUTICAL WAREHOUSE LOCATION - ECZA DEPOSU YERİ SEÇİMİNDE AHS YÖNTEMİNİN UYGULANMASI	253
Ömerül Faruk TAVLI, Ömer HAZMAN, Ahmet BÜYÜKBEN, Fatıma Nur YILMAZ, Berna ÖZBEK ÇELİK, Esra EROĞLU ÖZKAN - İSTANBUL AKTARLARINDA SATILAN <i>HYPERICUM PERFORATUM</i> ÖRNEKLERİNİN FARMAKOGNOZİK AÇIDAN İNCELENMESİ - PHARMACOGNOSTIC RESEARCH ON <i>HYPERICUM PERFORATUM</i> SAMPLES SOLD BY HERBALISTS IN ISTANBUL	265
İsmail Sarı, Gonca DONMEZ ARAT, Oktay OZKAN, Işıl AYDEMİR, Caner OZBEY, M. İbrahim TUĞLU - APOPTOTIC AND CYTOTOXIC EFFECT OF <i>ORIGANUM MINUTIFLORUM</i> ON NB2A NEUROBLASTOMA CELLS - <i>ORIGANUM MINUTIFLORUM</i> 'UN NB2A NÖROBLASTOMA HÜCRELERİNE APOPTOTİK VE SİTOTOKSİK ETKİSİ	281
Derlemeler / Reviews	
Leyla PAŞAYEVA, Ayşe Cemre KARARENK, Müberra KOŞAR - <i>COUSINIA CASS.</i> CİNSİNİN GELENEKSEL KULLANIMI, FİTOKİMYASAL İÇERİĞİ VE BİYOLOJİK ETKİLERİ - TRADITIONAL USAGE, PHYTOCHEMICAL COMPOSITIONS AND BIOLOGICAL ACTIVITIES OF <i>COUSINIA CASS.</i> GENUS	293
Nadir DERELİ, Zerrin SEZGİN BAYINDIR - PROLİPOZOM TEKNOLOJİSİNDEKİ GÜNCEL GELİŞMELER VE UYGULAMALAR - RECENT DEVELOPMENTS ON PROLIPOZOME TECHNOLOGY AND APPLICATIONS	308
Dilara EREN, İsmail YALÇIN - RASYONEL İLAÇ TASARIMINDA MOLEKÜLER MEKANİK VE MOLEKÜLER DİNAMİK YÖNTEMLERİN KULLANILMA AMACI - THE AIM OF IMPLEMENTATION OF THE MOLECULAR MECHANIC AND THE MOLECULAR DYNAMIC METHODS IN RATIONAL DRUG DESIGN	334
Oğuzhan FIRAT, İlkay YILDIZ - TOPOİZOMERAZ II ENZİM İNHİBİTÖRLERİ - TOPOISOMERASE II ENZYME INHIBITORS	356



PHARMACOPHORE MODELING STUDIES ON KNOWN MMP-9 ENZYME INHIBITORS TO IDENTIFY THE IMPORTANT COMMON FEATURES

ÖNEMLİ ORTAK ÖZELLİKLERİ TANIMLAMAK AMACIYLA, BİLİNEN MMP-9 ENZİM
İNİHİTÖRLERİ ÜZERİNDE YAPILAN FARMAKOFOR MODELLEME ÇALIŞMALARI

Tugba ERTAN-BOLELLI¹, Kayhan BOLELLI^{1,2,*}

¹Ankara University, Faculty of Pharmacy, Department of Pharmaceutical Chemistry, 06560, Ankara,
Turkey

²LumiLabs, 06610, Ulus-Ankara, Turkey

ABSTRACT

Objective: *In this study, pharmacophore models were generated to explain the structure–activity relationships by using the known MMP-9 inhibitors.*

Material and Method: *Pharmacophore models were generated to explain the specification of the structure–activity relationships of common pharmacophoric sites of the known MMP-9 inhibitors. For this study Discovery Studio 3.5 software was used. A set of known MMP-9 inhibitors (NFH, Batimastat, Marimastat, Prinomastat, CGS-27023A, and Ro32-3555) were used for common feature pharmacophore generation method. Selected hypothesis included two hydrogen bond acceptor, one hydrogen bond donor, and one hydrophobic feature.*

Result and Discussion: *All of the tested inhibitors except CGS-27023A and Ro32-3555 fitted the selected pharmacophore model perfectly. These two inhibitors did not fit the A2 feature. It can be concluded that A1, D1, and H1 features at the given positions could be necessary for the activity. Additionally, we compared the pharmacophore model with NFH and MMP-9 enzyme complex to identify the important interactions. At the given positions of all of the pharmacophoric features, there is an interaction with the protein. This is also supported our pharmacophore hypothesis. As a result, this pharmacophore model could be useful to design new small molecule inhibitors of MMP-9 enzyme.*

Keywords: *cancer, inflammatory diseases, MMP-9, pharmacophore modeling, structure–activity relationships*

* **Corresponding Author / Sorumlu Yazar:** Kayhan Bolelli
e-mail / e-posta: bolelli@ankara.edu.tr, **Phone / Tel.:** +905326459086

ÖZ

Amaç: Bu çalışmada, yapı-aktivite ilişkilerini açıklamak amacıyla bilinen MMP-9 inhibitörleri üzerinden farmakofor modeller oluşturuldu.

Gereç ve Yöntem: Bilinen MMP-9 inhibitörlerinin ortak farmakoforik özellikleri belirlenerek, yapı-aktivite ilişkilerini açıklamak üzere farmakofor modeller oluşturuldu. Bu çalışma için Discovery Studio 3.5 programı kullanıldı. Bilinen MMP-9 inhibitörleri (NFH, Batimastat, Marimastat, Prinomastat, CGS-27023A ve Ro32-3555), ortak farmakofor özelliklerin belirlenmesinde kullanıldı. İki hidrojen bağı alıcısı, bir hidrojen bağı donörü ve bir hidrofobik özellik içeren hipotez seçildi.

Sonuç ve Tartışma: CGS-27023A ve Ro32-3555 dışındaki test edilen tüm inhibitörler, seçilen farmakofor modele mükemmel bir şekilde uydu. Bu iki inhibitör A2 özelliğine uymadı. Buna göre, etki için verilen konumlardaki A1, D1 ve H1 özelliklerinin gerekli olabileceği sonucuna varıldı. Ayrıca, önemli etkileşimleri tanımlamak için farmakofor model, NFH ve MMP-9 enzim kompleksi ile karşılaştırıldı. Tüm farmakoforik özelliklerin verilen pozisyonlarda, protein ile bir etkileşim gözlemlendi. Bu durum farmakofor hipotezimizi de desteklemektedir. Sonuç olarak, bu farmakofor model, MMP-9 enziminin yeni küçük molekül inhibitörlerini tasarlamak için yararlı olabilir.

Anahtar Kelimeler: enflamatuar hastalıklar, farmakofor modelleme, kanser, MMP-9, yapı-etki ilişkileri

INTRODUCTION

The matrix metalloproteinases (MMPs) are a family of zinc-containing enzymes, which are structurally related to endopeptidases that mediate the impairment of connective tissue macromolecules. Because of their central role in re-modelling connective tissue, both as part of normal physiological growth and repair, and as part of disease processes, there is quite a lot interest in these proteins as many targets, in a wide range of inflammatory and degenerative diseases, such as atherosclerosis and arthritis, and also in cancer [1-4]. Over many years in the pathogenesis of cancer and arthritis the importance of the MMP family has been determined. But it is only relatively recently that MMPs and their expressed by lipid-laden macrophages. The proofs from histological investigations and molecular genetic studies implicates that over-expression of MMP9 in the vascular re-modelling events preceding plaque rupture, acute myocardial infarction are the most common causes [5]. More recently, animal studies have shown that a reduction of MMP9 activity, either by through pharmacological intervention or genetic manipulation, has an impact on ventricular re-modelling following infarction. Thus, in the pathogenesis of heart, MMP9 activity could be a key mechanism failure [6].

Many small molecule inhibitors of MMP-9 which effectively treat cancer and arthritis have been studied in human. Figure 1 shows five MMP-9 inhibitors that have reached clinical trials (Batimastat, Marimastat, Prinomastat, Ro32-3555 and CG-S27023A) and another known inhibitor (NFH) which has a crystal structure, complex with the MMP-9 enzyme [7-12].

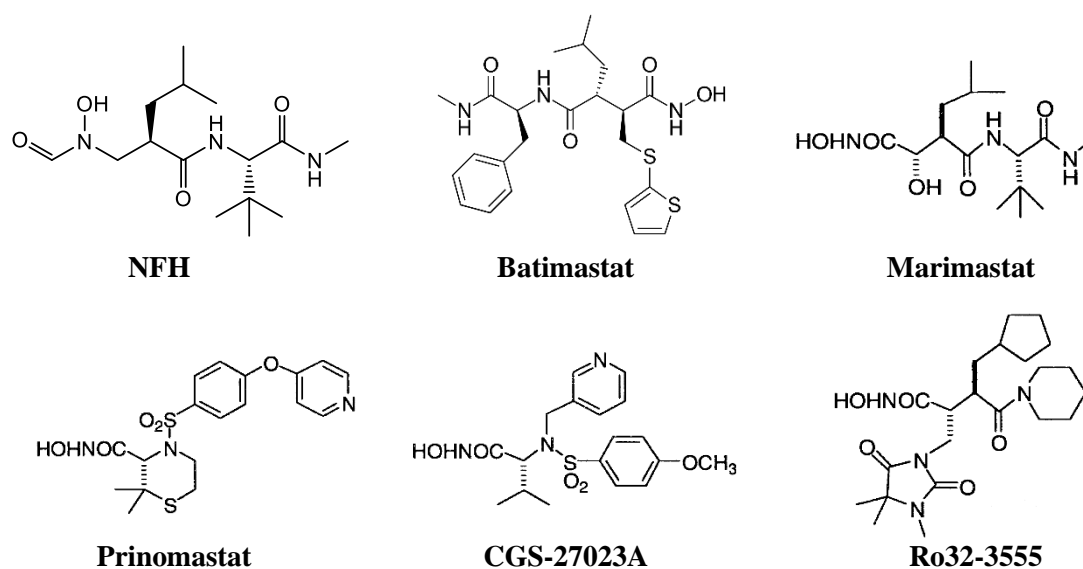


Figure 1. Structures of known MMP-9 inhibitors

In an earlier study, the crystal structure of the catalytic domain of human MMP-9 enzyme with peptidic reverse hydroxamate inhibitor (NFH) complex was determined. In the centre of catalytic there is an active-site zinc ion which co-ordinated by an essential glutamic acid residue (Glu402) and three histidine residues (His401, His405 and His411) (Figure 2) [7].

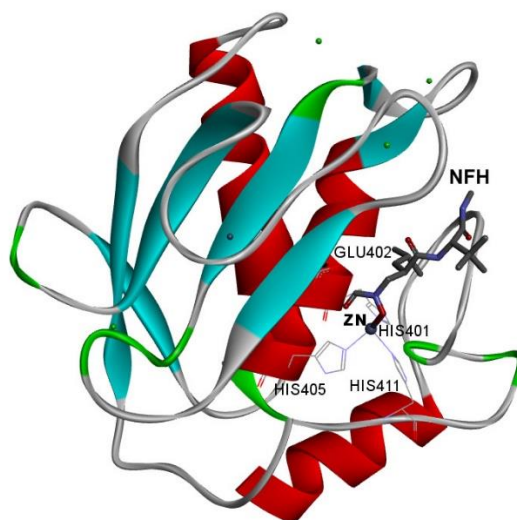


Figure 2. Crystal structure of the catalytic domain of human MMP-9 enzyme with peptidic reverse hydroxamate inhibitor (NFH) complex (PDB ID: 1GKC).

Herein, pharmacophore models were generated to explain the structure–activity relationships by using the known MMP-9 inhibitors. Then we compared the pharmacophore model with NFH and MMP-9 enzyme complex (Figure 2) to identify the important interactions.

MATERIAL AND METHOD

In this study we used common feature pharmacophore generation method to explain the specification of the structure–activity relationships of pharmacophoric sites of the known MMP-9 inhibitors. We used Discovery Studio 3.5 software for built the compounds and generated the standard 3D structures. The geometry of the inhibitors was optimized by using ABNR Minimization Method and for each inhibitor, conformational models were automatically generated. The “best conformer generation” procedure was applied to provide the best conformational coverage for a maximum number of conformers generated, defaulted to 255 in a 0–20 kcal/mol range from the global minimum. The generated conformations were used to align common molecular features and generate the pharmacophore hypotheses [13-15].

A set of known MMP-9 inhibitors (NFH, Batimastat, Marimastat, Prinomastat, CGS-27023A, and Ro32-3555) shown in Figure 1 were selected as the training set for use common feature pharmacophore generation method. Then 10 pharmacophoric hypotheses were generated from these aligned inhibitors. We selected the hypothesis which have two hydrogen bond acceptor (A1 and A2), one hydrogen bond donor (D1), and one hydrophobic (H1) features (Figure 3a).

RESULT AND DISCUSSION

Selected pharmacophore hypothesis included two hydrogen bond acceptor (A1 and A2), one hydrogen bond donor (D1), and one hydrophobic (H1) features. The hypothesis and mapping of all of the inhibitors are shown in Figure 3. All of the tested inhibitors except CGS-27023A and Ro32-3555 fitted the pharmacophore model perfectly (Figure 3 and Figure 4). According to the mapping of CGS-27023A, and Ro32-3555, these compounds fitted the three features of the model (A1, D1, and H1) but did not fit the A2 feature. Fit values of the tested inhibitors are shown in Table 3. It can be concluded that A1, D1, and H1 features at the given positions could be necessary for the activity.

Table 1. Fit values of the tested inhibitors

Inhibitor Name	Fit value
Batimastat	3,99931
NFH	3,78265
Marimastat	3,56112
Prinomastat	3,44325
CGS-27023A	2,98623
Ro32-3555	2,95924

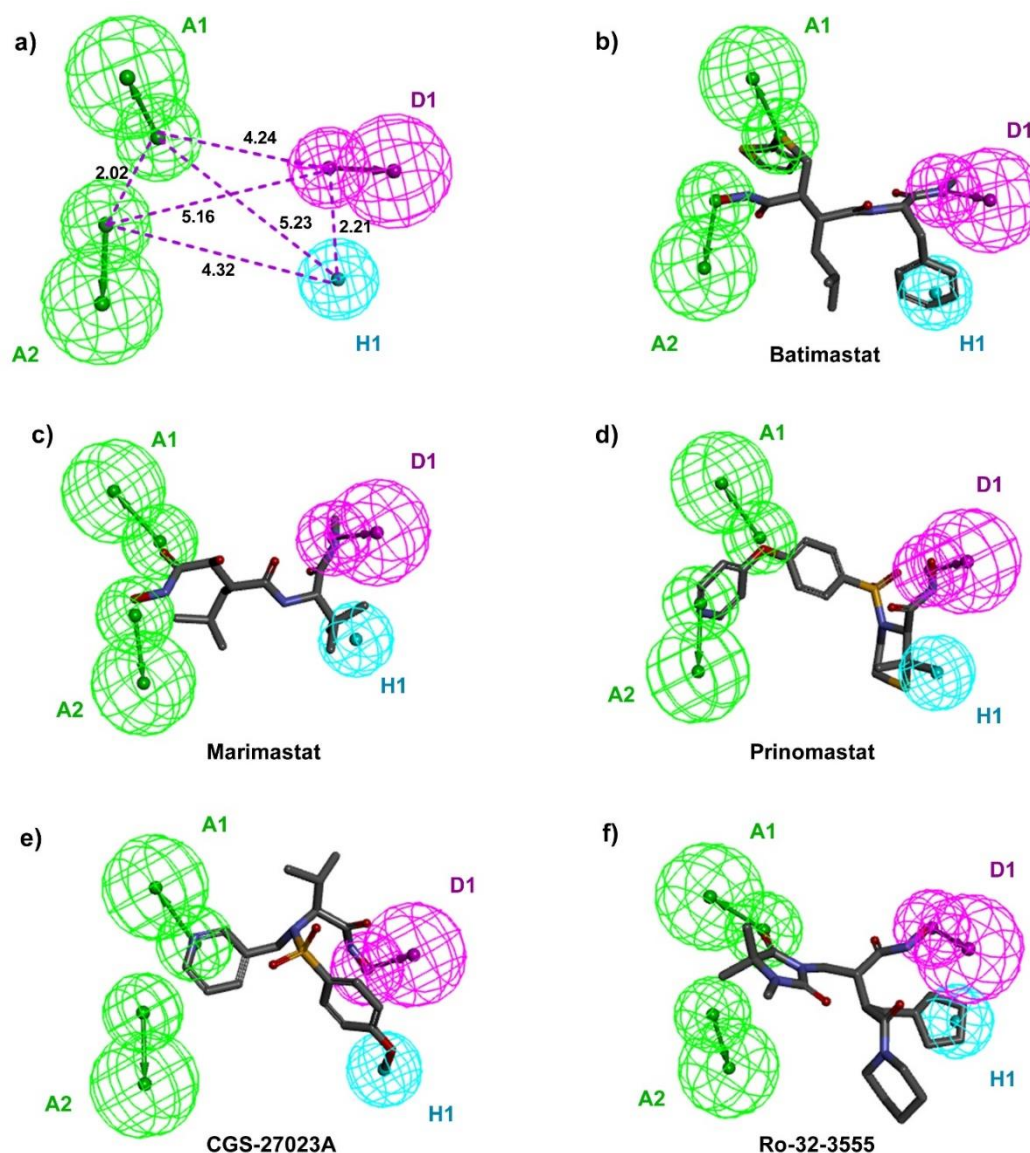


Figure 3. a) The selected pharmacophore model and distances between the features. b) Mapping of Batimastat to pharmacophore model. c) Mapping of Marimastat to pharmacophore model. d) Mapping of Prinomastat to pharmacophore model. e) Mapping of CGS-27023A to pharmacophore model. f) Mapping of Ro32-3555 to pharmacophore model.

Additionally we compared this pharmacophore model with the X-ray crystal structure of MMP-9 and NFH complex (PDB ID: 1GKC) (Figure 4). At the given positions of all of the pharmacophoric features, there is an interaction with the protein. At the A1 position there is metal interaction with Zn ion, at the A2 position there is a metal interaction with Zn ion and H bond with Glu402, at the D1 position there is a H bond with Gly186 and at the H1 position there is hydrophobic interactions with His401 and Tyr423. All of these are also supported our pharmacophore hypothesis. It is reported that interaction with the Zn ion is necessary for the activity. And according to our hypothesis at the given

positions of A1 and A2 features, there can be seen interactions with Zn ion. So, it can be concluded that for interaction with Zn ion, the A1 and A2 features, especially A1 could be very important for the activity. As a result, this pharmacophore model could be useful to design new small molecule inhibitors of MMP-9 enzyme.

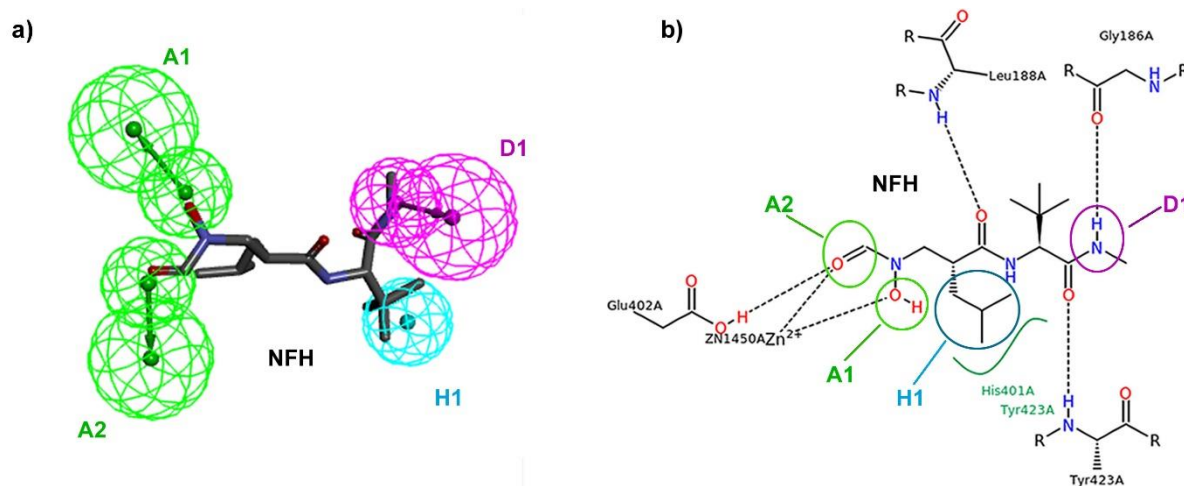


Figure 4. a) Pharmacophore mapping to the NFH b) Interactions between NFH and MMP-9 enzyme from X-ray crystal complex (PDB ID 1GKC).

CONFLICT OF INTEREST

The authors confirm that this article content has no conflict of interest.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank to Prof. Dr. İlkey Yıldız from Ankara University, for providing us Discovery Studio software.

REFERENCES

1. Alexander, C.M., Werb, Z. (1991). Extracellular matrix degradation. In *Cell Biology of the Extracellular Matrix* (Hay, E. D., ed.), pp. 255–302, Plenum Press, New York.
2. Murphy, G., Reynolds, J. (1993). Extracellular matrix degradation. In *Connective Tissue and its Heritable Disorders* (Royce, P. M. & Steinman, B., eds), pp. 287–316, Wiley-Liss, New York.
3. Birkedal-Hansen, H. (1995). Proteolytic remodeling of extracellular matrix. *Curr. Opin. Cell Biol.*, 7, 728–735.
4. Whittaker, M., Floyd, C.D., Brown, P., Gearing, A.J.H. (1999). Design and therapeutic application of matrix metalloproteinase inhibitors. *Chem. Rev.*, 99, 2735–2776.

5. Brown, D.L., Hibbs, M.S., Kearney, M., Loushin, C., Isner, J.M. (1995). Identification of 92 kD gelatinase in human coronary atherosclerotic lesions. Association of active enzyme synthesis with unstable angina. *Circulation*, *91*, 2125–2131.
6. Rohde, L.E., Ducharme, A., Arroyo, L.H., Aikawa, M., Sukhova, G.H., Lopez-Anaya, A., McClure, K.F., Mitchell, P.G., Libby, P., Lee, R.T. (1999). Matrix metalloproteinase inhibition attenuates early left ventricular enlargement after experimental myocardial infarction in mice. *Circulation*, *99*, 3063–3070.
7. Rowsell, S., Hawtin, P., Minshull, C.A., Jepson, H., Brockbank, S.M.V., Barratt, D.G., Slater, A.M., McPheat, W.L., Waterson, D., Henney, A.M., Pauptit, R.A. (2002). Crystal Structure of Human MMP9 in Complex with a Reverse Hydroxamate Inhibitor. *J. Mol. Biol.*, *319*, 173–181.
8. Lee, P.P.H., Hwang, J.J., Murphy, G., Ip, M.M. (2000). Functional Significance of MMP-9 in Tumor Necrosis Factor-Induced Proliferation and Branching Morphogenesis of Mammary Epithelial Cells. *Endocrinology*, *141*, 3764–3773.
9. Barnett, J.M., McCollum, G.W., Fowler, J.A., Duan, J.J.W., Kay, J.D., Liu, R.Q., Bingaman, D.P., Penn, J.S. (2007). Pharmacologic and Genetic Manipulation of Matrix Metalloproteinases -2 and -9 Reduce Retinal Neovascularization in Rodent Models of Retinopathy of Prematurity. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, *48*, 907–915.
10. Orner, C.A., Geary, M.B., Hammert, W.C., O'Keefe, R.J., Loiselle, A.E. (2016). Low-dose and short-duration Matrix Metalloproteinase 9 Inhibition does not affect adhesion formation during murine flexor tendon healing. *Plast. Reconstr. Surg.*, *137*, 545–553.
11. Levin, J.I., Gu, Y., Nelson, F.C., Zask, A., DiJoseph, J.F., Sharr, M.A., Sung, A., Jin, G., Cowling, R., Chanda, P., Cosmi, S., Hsiao, C.L., Edris, W., Wilhelm, J., Killar, L.M., Skotnicki, J.S. (2001). Heteroaryl and Cycloalkyl Sulfonamide Hydroxamic Acid Inhibitors of Matrix Metalloproteinases. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, *11*, 239–242.
12. Hidalgo, M., Eckhardt, S.G. (2001). Development of Matrix Metalloproteinase Inhibitors in Cancer Therapy. *J. Natl. Cancer Inst.*, *93*, 178–193.
13. Krovat, E.M., Fruhwirth, K.H., Langer, T. (2005). Pharmacophore identification, in silico screening, and virtual library design for inhibitors of the human factor Xa. *J. Chem. Inf. Model.*, *45*, 146–159.
14. Smellie, A., Teig, S.L., Towbin, P. (1995). Poling: Promoting conformational variation. *J. Comput. Chem.*, *16*, 171–187.
15. Dassault Systèmes BIOVIA, Discovery Studio Modeling Environment, Release 2017, San Diego: Dassault Systèmes, 2016.



SYNTHESIS AND ANTIRADICAL ACTIVITY OF ALKYL DERIVATIVES OF 5-(5-METHYL-1H-PYRAZOL-3-YL)-4-PHENYL-4H- 1,2,4-TRIAZOLE-3-THIOL

5-(5-METİL-1H-PIRAZOL-3-İL)-4-FENİL-4H-1,2,4-TRIAZOL-3-TİYOL ALKİL
TÜREVLERİNİN SENTEZ VE ANTİRADİKAL AKTİVİTELERİ

Andrey GOTSULYA*

Zaporizhzhia State Medical University, Faculty of Pharmacy, Department of Natural Sciences for
Foreign Students and Toxicological Chemistry, Ukraine

ABSTRACT

Objective: The aim of the work was to develop effective methods for the synthesis of biologically active heterocyclic systems containing 1,2,4-triazole and pyrazole.

Material and Method: Chemical structures of synthesized compounds were characterized with elemental analysis, IR, ¹H-NMR, LC-MS techniques. The antiradical activity was evaluated using the 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging activity assay.

Result and Discussion: Developed optimal methods of obtaining of alkyl derivatives of 5-(5-methyl-1H-pyrazol-3-yl)-4-phenyl-4H-1,2,4-triazole-3-thiol. A number of synthesized compounds showed moderate antiradical activity.

Keywords: antiradical activity, pyrazole, synthesis, 1,2,4-triazoles

ÖZ

Amaç: Çalışmanın amacı biyolojik olarak aktif 1,2,4-triazol ve pirazol içeren heterosiklik sistemlerin sentezi için etkili yöntemler geliştirmektir.

Gereç ve Yöntem: Sentezlenen bileşiklerin kimyasal yapıları elemental analiz, IR, ¹H-NMR, LC-MS teknikleri ile karakterize edildi. Antiradikal aktivite 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) radikal süpürücü aktivite deneyi kullanılarak değerlendirildi.

Sonuç ve Tartışma: 5-(5-metil-1H-pirazol-3-il)-4-fenil-4H-1,2,4-triazol-3-tiyol alkil türevlerinin elde edilmesi için optimum yöntemler geliştirildi. Bir dizi sentezlenmiş bileşik, orta derecede antiradikal aktivite göstermiştir.

Anahtar Kelimeler: antiradikal aktivite, pirazol, sentez, 1,2,4-triazol

* Corresponding Author / Sorumlu Yazar: Andrey Gotsulya
e-mail / e-posta: andrey.goculya@gmail.com

INTRODUCTION

Chemistry of pyrazole and 1,2,4-triazole derivatives is of considerable interest in scientific circles [1, 2, 3]. The attractiveness of these heterocycles is associated with great opportunities in their structural modification and their practical use as medicines [1, 3, 4]. Currently, there are known methods of synthesis that allow you to combine these two synthons into one molecule. Despite this, some aspects of the transformations of these molecules and the study of their properties are not fully exhausted. Thus, the search for optimal ways of synthesis of substances that combine in their structure fragments of 1,2,4-triazole and pyrazole, as well as the study of the properties of their derivatives is relevant and practically significant.

The aim of the present work was to synthesize of alkylderivatives of 5-(5-methyl-1*H*-pyrazol-3-yl)-4-phenyl-4*H*-1,2,4-triazole-3-thiol and to study the antioxidant activity of the obtained substances.

MATERIAL AND METHOD

Chemistry

During the study as synthones for the preparation of a new series of compounds, pyrazole was selected. It is important to note that due to the variety and power of pharmacological effects that appear, this structure is a worthy place among heterocyclic compounds [1, 3, 5 - 7, 14]. 5-(5-Methyl-1*H*-pyrazole-3-yl)-4-phenyl-4*H*-1,2,4-triazole-3-thiol was obtained from diethyloxalate, acetone and sodium methanoate through a series of successive stages [8].

The study of physico-chemical properties of the obtained compounds was carried out using methods listed in the State Pharmacopoeia of Ukraine. Melting points were determined in open capillary tubes in a “Stanford Research Systems Melting Point Apparatus 100” (SRS, USA). The elemental analysis (C, H, N) were performed using the “Elementar vario EL cube” analyzer (Elementar Analysensysteme, Germany). IR spectra (4000 – 400 cm⁻¹) were taken off the module ALPHA-T of Bruker ALPHA FT-IR spectrometer (Bruker optics, Germany). ¹H NMR spectra (400 MHz) were recorded at “Varian-Mercury 400” spectrometer with SiMe₄ as internal standard in DMSO-*d*₆ (dimethyl sulfoxide-*d*₆) solution. Chromatography-mass spectral studies were conducted on the instrument “Agilent 1260 Infinity HPLC” equipped with a mass spectrometer “Agilent 6120” (method of ionization – electrospray (ESI)).

Methyl 5-methylpyrazole-3-carboxylate (4). Hydrazine hydrate (10 g, 0.2 mol) in ethanol (25 ml) is gradually added with stirring and cooling to a solution of methyl 2,4-dioxopentanoate (**3**) (0.2 mol) in alcohol. After 1 hour of heating, the alcohol was discarded. The resulting compound (99%) was recrystallized from aqueous ethanol in the form of a needle crystal with a melting point of 82 °C (**Fig. 1**).

5-Methylpyrazole-3-carbohydrazide (5). Methyl 5-methylpyrazole-3-carboxylate (58.4 g) and hydrazine hydrate (25 g) were heated for 8 hours. The reaction product was obtained in the form of prismatic crystals, which was recrystallized from water. The precipitate was dried at 100 °C (**Fig. 1**). Yield: 90%; m. p.: 153 – 154 °C; IR (v, cm⁻¹): 3409-3235 (NH, NH₂), 1627 (C=O); ¹H NMR (δ, ppm): 2.23 (s, 3H, CH₃), 4.34 (s, 2H, NH₂), 6.38 (s, 1H, pyrazole, =CH-), 9.18 (s, 1H, CONH), 13.52 (s, 1H, pyrazole, NH). Anal. calcd. (%) for C₅H₈N₄O: C, 42.85; H, 5.75; N, 39.98. Found: C, 42.74; H, 4.82; N, 40.08.

2-(5-Methyl-1H-pyrazole-3-carbonyl)-N-phenylhydrazine-1-carbothioamide (6). 0.05 mol of 5-methylpyrazole-3-carbohydrazide, 150 ml of dioxane and 60 ml of water are heated to dissolve the starting material. To the solution obtained add an equivalent amount of phenyl isothiocyanate, boil for 1 hour, cool, add 100 ml of water, the precipitate is filtered off, washed with water, propan-2-ol and crystallized from DMF (**Fig. 1**). Yield: 71%; m. p.: 263 - 265 °C; IR (v, cm⁻¹): 3231 (NH), 1649 (C=O); ¹H NMR (δ, ppm): 2.26 (s, 3H, CH₃), 6.45 (s, 1H, pyrazole, =CH-), 7.37-7.41 (dd, *J* = 6.65, 2.86 Hz, 2H, C₆H₅), 7.53-7.60 (m, 3H, C₆H₅), 8.54 (s, 1H, CONH), 9.63 (s, 1H, NHCS), 13.28 (s, pyrazole, NH). Anal. calcd. (%) for C₁₂H₁₃N₅OS: C, 52.35; H, 4.76; N, 25.44; S, 11.64. Found: C, 52.47; H, 4.75; N, 25.37; S, 11.67.

5-(5-Methyl-1H-pyrazole-3-yl)-4-phenyl-4H-1,2,4-triazole-3-thiol (7). A mixture of 0.01 mol of 2-(5-methyl-1H-pyrazole-3-carbonyl)-N-hydrazinocarbothioamide, 0.011 mol of sodium hydroxide and 50 ml of water is heated to reflux for 2 hours, cooled and add 2 ml of concentrated acetic acid. The resulting precipitate is filtered off, washed with water. Recrystallized from DMF (**Fig. 1**). Yield: 84 %; m. p.: 274 - 276 °C; IR (v, cm⁻¹):

Alkylation. 0.05 mol 5-(5-methyl-1H-pyrazole-3-yl)-4-phenyl-4H-1,2,4-triazole-3-thiol (**7**) is added to a solution of 0.05 mol of sodium hydroxide in 30-40 ml of water, reaching complete dissolution. Subsequently, a solution of 0.055 mol of the alkylating part in methanol or propan-2-ol is added (**Fig. 1**). The obtained precipitate was filtered, washed by water, dried and recrystallized with ethanol to give white crystalline compounds (**8.1-8.10**).

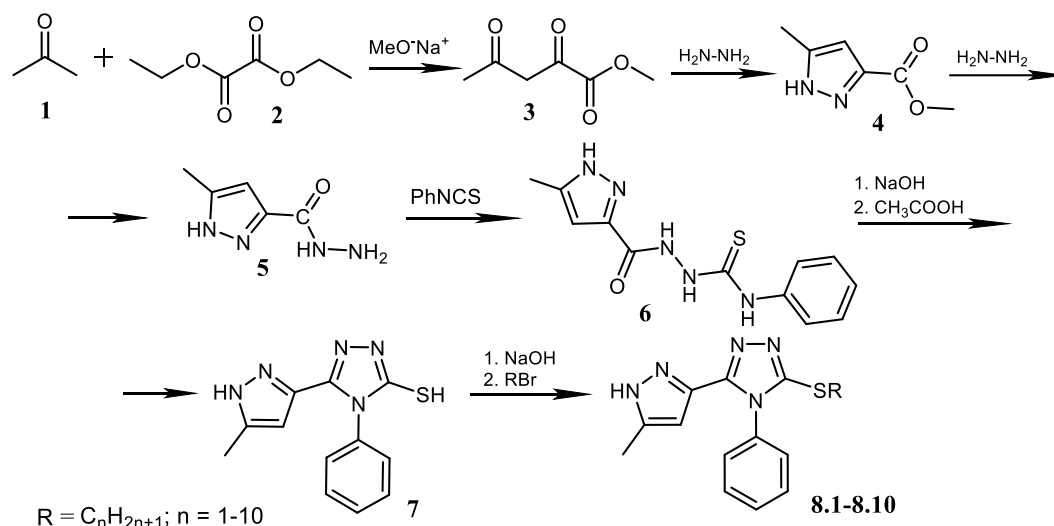


Figure 1. The synthetic route of title compounds

Antiradical activity

To assess the antiradical activity of the synthesized samples in the test with radical DPPH, a 0.1 *mM* DPPH solution in methanol was used [9, 12, 13]. To detect compounds with a marked antiradical activity of up to 2 ml of 0.1 *mM* DPPH solution in methanol, 2 ml of 2 *mM* solution was added to the DMSO of the test compound. Incubated for 30 minutes at 25 °C and optical density (A_D) was determined. In parallel, the optical density of the solution was determined, which consisted of 2 ml of 0.2 *mM* solution of the test compound in DMSO and 2 ml of 0.1 *mM* DPPH solution. The optical density of 2 ml of 0.1 *mM* methanol DPPH solution in DMSO was also determined. Ascorbic acid was used as a comparison drug. Antiradical activity was calculated by the formula:

$$\text{APA}\% = \frac{A_{\text{DPPH}} - A_D}{A_{\text{DPPH}}}$$

Weighing of the synthesized compounds and reagents was performed using electronic scales "ANG200" (Axis, Gdansk, Poland). The optical density was measured using a spectrophotometer "ULAB108UV" (Ulab, Shanghai, China).

RESULT AND DISCUSSION

The reaction route for the synthesis of the newly synthesized compounds has been described in Figure 1.

3-(5-Methyl-1H-pyrazol-3-yl)-5-(methylthio)-4-phenyl-4H-1,2,4-triazole (8.1). Yield: 69 %; m. p.: 220 – 221 °C; IR (ν , cm^{-1}): 3229 (NH), 1607 (C=N); $^1\text{H NMR}$ (δ , ppm): 2.32 (s, 3H, CH_3), 2.75 (s, 3H, CH_3), 6.46 (s, 1H, pyrazole, =CH-), 7.33-7.36 (dd, $J = 6.68, 2.89$ Hz, 2H, C_6H_5), 7.48-7.54 (m, 3H, C_6H_5), 11.73 (s, 1H, pyrazole, NH). Anal. calcd. (%) for $\text{C}_{13}\text{H}_{13}\text{N}_5\text{S}$: C, 57.54; H, 4.83; N, 25.81; S, 11.82. Found: C, 57.39; H, 4.82; N, 25.74; S, 11.85. ESI-MS: $m/z = 272$ [M+1], 274 [M+3].

3-(Ethylthio)-5-(5-methyl-1H-pyrazol-3-yl)-4-phenyl-4H-1,2,4-triazole (8.2). Yield: 82 %; m. p.: 212 – 214 °C; IR (ν , cm^{-1}): 3233 (NH), 1597 (C=N); $^1\text{H NMR}$ (δ , ppm): 1.40-1.42 (t, $J = 5.1$ Hz, 3H, S- CH_2 - CH_3), 2.35 (s, 3H, CH_3), 3.19-3.21 (m, $J = 4.8$ Hz, 2H, S- CH_2 - CH_3), 6.45 (s, 1H, pyrazole, =CH-), 7.33-7.37 (dd, $J = 6.64, 2.86$ Hz, 2H, C_6H_5), 7.48-7.54 (m, 3H, C_6H_5), 11.71 (s, 1H, pyrazole, NH). Anal. calcd. (%) for $\text{C}_{14}\text{H}_{15}\text{N}_5\text{S}$: C, 58.93; H, 5.30; N, 24.54; S, 11.23. Found: C, 58.77; H, 5.29; N, 24.61; S, 11.20. ESI-MS: $m/z = 286$ [M+1], 288 [M+3].

3-(5-Methyl-1H-pyrazol-3-yl)-4-phenyl-5-(propylthio)-4H-1,2,4-triazole (8.3). Yield: 74 %; m. p.: 257 – 259 °C; IR (ν , cm^{-1}): 3219 (NH), 1615 (C=N); $^1\text{H NMR}$ (δ , ppm): 1.07-1.09 (t, $J = 5.3$ Hz, 3H, S-(CH_2) $_2$ - CH_3), 1.73-1.76 (m, $J = 8.2, 5.4$ Hz, 2H, S- CH_2 - CH_2 - CH_3), 2.32 (s, 3H, CH_3), 3.14-3.17 (t, 2H, S- CH_2 - CH_2 - CH_3), 6.45 (s, 1H, pyrazole, =CH-), 7.33-7.37 (dd, $J = 6.45, 2.71$ Hz, 2H, C_6H_5), 7.47-7.54 (m, 3H, C_6H_5), 11.74 (s, 1H, pyrazole, NH). Anal. calcd. (%) for $\text{C}_{15}\text{H}_{17}\text{N}_5\text{S}$: C, 60.18; H, 5.72; N, 23.39; S, 10.71. Found: C, 60.03; H, 5.71; N, 23.45; S, 10.74. ESI-MS: $m/z = 300$ [M+1], 302 [M+3].

3-(Butylthio)-5-(5-methyl-1H-pyrazol-3-yl)-4-phenyl-4H-1,2,4-triazole (8.4). Yield: 68 %; m. p.: 197 - 199 °C; IR (ν , cm^{-1}): 3225 (NH), 1592 (C=N); $^1\text{H NMR}$ (δ , ppm): 0.93-0.95 (t, 3H, S-(CH_2) $_3$ - CH_3), 1.36-1.39 (m, 2H, S-(CH_2) $_2$ - CH_2 - CH_3), 1.67-1.70 (m, $J = 8.16, 7.27$ Hz, 2H, S- CH_2 - CH_2 - CH_2 - CH_3), 2.32 (s, 3H, CH_3), 3.16-3.19 (t, 2H, S- CH_2 -(CH_2) $_2$ - CH_3), 6.46 (s, 1H, pyrazole, =CH-), 7.33-7.37 (dd, $J = 6.36, 2.83$ Hz, 2H, C_6H_5), 7.46-7.53 (m, 3H, C_6H_5), 11.75 (s, 1H, pyrazole, NH). Anal. calcd. (%) for $\text{C}_{16}\text{H}_{19}\text{N}_5\text{S}$: C, 61.32; H, 6.11; N, 22.35; S, 10.23. Found: C, 61.48; H, 6.12; N, 22.31; S, 10.21. ESI-MS: $m/z = 314$ [M+1], 316 [M+3].

3-(5-Methyl-1H-pyrazol-3-yl)-5-(pentylthio)-4-phenyl-4H-1,2,4-triazole (8.5). Yield: 77 %; m. p.: 168 – 169 °C; IR (ν , cm^{-1}): 3220 (NH), 1611 (C=N); $^1\text{H NMR}$ (δ , ppm): 0.88-0.92 (t, 3H, S-(CH_2) $_4$ - CH_3), 1.36-1.41 (m, 4H, S-(CH_2) $_2$ -(CH_2) $_2$ - CH_3), 1.66-1.69 (m, $J = 7.92, 7.25$ Hz, 2H, S- CH_2 - CH_2 -(CH_2) $_2$ - CH_3), 2.33 (s, 3H, CH_3), 3.14-3.16 (t, $J = 5.1$ Hz, 2H, S- CH_2 -(CH_2) $_3$ - CH_3), 6.47 (s, 1H, pyrazole, =CH-), 7.33-7.37 (dd, $J = 6.36, 2.59$ Hz, 2H, C_6H_5), 7.48-7.53 (m, 3H, C_6H_5), 11.74 (s, 1H, pyrazole, NH). Anal. calcd. (%) for $\text{C}_{17}\text{H}_{21}\text{N}_5\text{S}$: C, 62.36; H, 6.46; N, 21.39; S, 9.79. Found: C, 62.52; H, 6.45; N, 21.35; S, 9.82. ESI-MS: $m/z = 328$ [M+1], 330 [M+3].

3-(Hexylthio)-5-(5-methyl-1H-pyrazol-3-yl)-4-phenyl-4H-1,2,4-triazole (8.6). Yield: 79 %; m. p.: 162 – 164 °C; IR (ν , cm^{-1}): 3237 (NH), 1618 (C=N); $^1\text{H NMR}$ (δ , ppm): 0.87-0.90 (t, 3H, S-(CH_2) $_5$ - CH_3), 1.37-1.42 (m, $J = 4.8$ Hz, 1.7, 1.3 Hz, 6H, S-(CH_2) $_2$ -(CH_2) $_3$ - CH_3), 1.72-1.75 (m, $J = 7.8$

Hz, 2H, S-CH₂-CH₂-(CH₂)₃-CH₃), 2.33 (s, 3H, CH₃), 3.15-3.17 (t, $J = 7.9$ Hz, 2H, S-CH₂-(CH₂)₄-CH₃), 6.47 (s, 1H, pyrazole, =CH-), 7.33-7.37 (dd, $J = 6.68, 2.89$ Hz, 2H, C₆H₅), 7.48-7.54 (m, 3H, C₆H₅), 11.73 (s, 1H, pyrazole, NH). Anal. calcd. (%) for C₁₈H₂₃N₅S: C, 63.31; H, 6.79; N, 20.51; S, 9.39. Found: C, 63.16; H, 6.78; N, 20.56; S, 9.41. ESI-MS: $m/z = 342$ [M+H⁺], 344 [M+3].

3-(Heptylthio)-5-(5-methyl-1H-pyrazol-3-yl)-4-phenyl-4H-1,2,4-triazole (8.7). Yield: 68 %; m. p.: 161 – 163 °C; IR (ν , cm⁻¹): 3223 (NH), 1588 (C=N); ¹H NMR (δ , ppm): 0.85-0.88 (t, 3H, S-(CH₂)₆-CH₃), 1.33-1.40 (m, 8H, S-(CH₂)₂-(CH₂)₄-CH₃), 1.70-1.73 (m, $J = 8.2$ Hz, 2H, S-CH₂-(CH₂)₅-CH₃), 2.31 (s, 3H, CH₃), 3.13-3.15 (t, $J = 7.9$ Hz, 2H, S-CH₂-(CH₂)₅-CH₃), 6.47 (s, 1H, pyrazole, =CH-), 7.34-7.38 (dd, $J = 6.78, 2.95$ Hz, 2H, C₆H₅), 7.47-7.54 (m, 3H, C₆H₅), 11.73 (s, 1H, pyrazole, NH). Anal. calcd. (%) for C₁₉H₂₅N₅S: C, 64.19; H, 7.09; N, 19.70; S, 9.02. Found: C, 64.33; H, 7.08; N, 19.65; S, 9.05. ESI-MS: $m/z = 356$ [M+H⁺], 358 [M+3].

3-(5-Methyl-1H-pyrazol-3-yl)-5-(octylthio)-4-phenyl-4H-1,2,4-triazole (8.8). Yield: 76 %; m. p.: 156 – 158 °C; IR (ν , cm⁻¹): 3225 (NH), 1604 (C=N); ¹H NMR (δ , ppm): 0.85-0.87 (t, 3H, S-(CH₂)₇-CH₃), 1.32-1.38 (m, 10H, S-(CH₂)₂-(CH₂)₅-CH₃), 1.68-1.71 (m, $J = 8.0$ Hz, 2H, S-CH₂-CH₂-(CH₂)₅-CH₃), 2.31 (s, 3H, CH₃), 3.13-3.15 (t, $J = 7.8$ Hz, 2H, S-CH₂-(CH₂)₇-CH₃), 6.46 (s, 1H, pyrazole, =CH-), 7.34-7.38 (dd, $J = 6.68, 2.89$ Hz, 2H, C₆H₅), 7.47-7.53 (m, 3H, C₆H₅), 11.73 (s, 1H, pyrazole, NH). Anal. calcd. (%) C₂₀H₂₇N₅S: C, 65.01; H, 7.37; N, 18.95; S, 8.68. Found: C, 64.83; H, 7.36; N, 19.00; S, 8.70. ESI-MS: $m/z = 370$ [M+H⁺], 372 [M+3].

3-(5-Methyl-1H-pyrazol-3-yl)-5-(nonylthio)-4-phenyl-4H-1,2,4-triazole (8.9). Yield: 71 %; m. p.: 150 – 152 °C; IR (ν , cm⁻¹): 3221 (NH), 1579 (C=N); ¹H NMR (δ , ppm): 0.83-0.86 (t, 3H, S-(CH₂)₈-CH₃), 1.32-1.38 (m, 12H, S-(CH₂)₂-(CH₂)₆-CH₃), 1.68-1.71 (m, $J = 8.2$ Hz, 2H, S-CH₂-CH₂-(CH₂)₆-CH₃), 2.32 (s, 3H, CH₃), 3.11-3.13 (t, $J = 7.9$ Hz, 2H, S-CH₂-(CH₂)₇-CH₃), 6.46 (s, 1H, pyrazole, =CH-), 7.33-7.37 (dd, $J = 6.62, 2.85$ Hz, 2H, C₆H₅), 7.45-7.51 (m, 3H, C₆H₅), 11.72 (s, 1H, pyrazole, NH). Anal. calcd. (%) for C₂₁H₂₉N₅S: C, 65.76; H, 7.62; N, 18.26; S, 8.36. Found: C, 65.92; H, 7.63; N, 18.21; S, 8.33. ESI-MS: $m/z = 384$ [M+H⁺], 386 [M+3].

3-(Decylthio)-5-(5-methyl-1H-pyrazol-3-yl)-4-phenyl-4H-1,2,4-triazole (8.10). Yield: 73 %; m. p.: 152 – 154 °C; IR (ν , cm⁻¹): 3238 (NH), 1603 (C=N); ¹H NMR (δ , ppm): 0.83-0.85 (t, 3H, S-(CH₂)₉-CH₃), 1.31-1.36 (m, 14H, S-(CH₂)₂-(CH₂)₇-CH₃), 1.67-1.71 (m, $J = 8.1$ Hz, 2H, S-CH₂-CH₂-(CH₂)₇-CH₃), 2.32 (s, 3H, CH₃), 3.10-3.13 (t, $J = 7.7$ Hz, 2H, S-CH₂-(CH₂)₈-CH₃), 6.46 (s, 1H, pyrazole, =CH-), 7.33-7.36 (dd, $J = 6.68, 2.89$ Hz, 2H, C₆H₅), 7.49-7.54 (m, 3H, C₆H₅), 11.75 (s, 1H, pyrazole, NH). Anal. calcd. (%) for C₂₂H₃₁N₅S: C, 66.46; H, 7.86; N, 17.62; S, 8.06. Found: C, 66.27; H, 7.87; N, 17.57; S, 8.08. ESI-MS: $m/z = 398$ [M+H⁺], 400 [M+3].

The sets of S-alkyl fragment proton signals are fixed in the expected magnetic field region, and their parameters correspond to the literature data [10]. For example, the signals of protons methyl group are shown at 2,75 ppm in the form of singlet (8.1). Increasing the length of the alkyl chain contributes

to the shift of proton signals in the direction of a stronger field (+I and +M-effects). Thus, the signals of the protons of the methyl fragment is gradually changed to 0.83 ppm; the signals of protons of methylene fragment are observed in the region of strong fields in the form of a triplet (3.10-3.19 ppm) or multiplets (1.31-1.42 ppm, 1.66-1.75 ppm). Signals in the form of doublets (7.33-7.38 ppm) and multiplets (7.45-7.54 ppm) are observed in the absorption region of aromatic protons. Hydrogen at C₄ atom of the pyrazole fragment resonates at 6.45-6.47 ppm. in the form of a singlet.

In the IR-spectrum of synthesized alkyl derivatives observe deformation vibrations of alkyl groups in ranges from 645 to 1300 cm⁻¹ and H-C-H fragment in a narrow area of frequency 1465 - 1370 cm⁻¹. For example, for CH₃-group δ-vibrations occupied area at 1367 - 1374 cm⁻¹. Valence vibrations of bonds of C-H alkyl groups form bands in area 3085 - 2830 cm⁻¹ [11].

In the mass spectrum, there is a peak of the molecular ion and peaks of fragment ions, which confirm this structure.

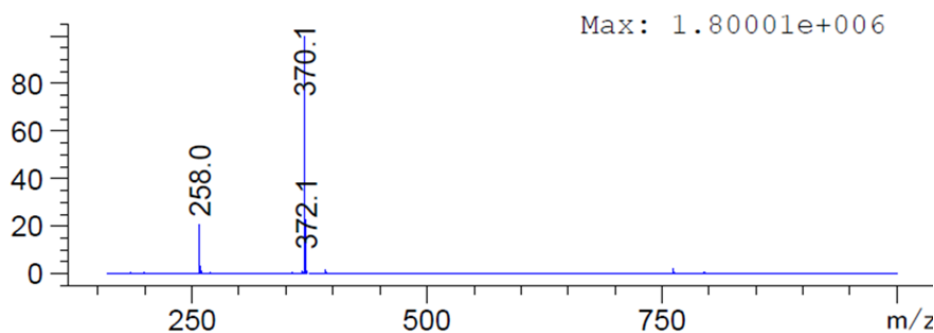


Figure 2. Mass fragmentation pattern of compound 8.8 (CID*, 200 eV)

*CID – Collision-induced dissociation

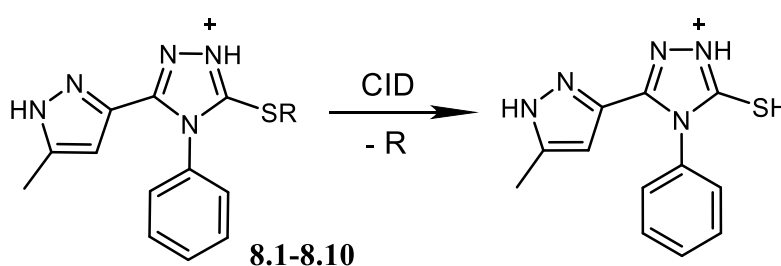


Figure 3. Molecular ion fragmentation scheme (CID, 200 eV)

A study of antiradical activity of synthesized substances was carried out to assess the prospects of this research direction. The decision to study this type of activity was made in connection with the detection of this type of activity in similar substances.

The synthesized compounds exhibit moderate antiradical activity, which in some of them approaches the reference product "Ascorbic acid". Modification of the alkyl fragment does not lead to a

significant change in antiradical activity. Importantly, reducing the concentration of the compounds also does not lead to a significant loss of antiradical activity. The highest loss of activity was observed for compound 8.10. It should also be noted that the appearance of the alkyl fragment in most cases leads to a decrease in activity (5% - 42%). This is due to the more pronounced acidic properties of the free thiol group compared to the alkylated one.

The data obtained confirmed the assumption of the presence of antiradical activity, but it was not expressed (**Table 1**).

Table 1. Antiradical activity of synthesized compounds

№	Compound	2 ml 2 mM compound, investigated + 2 ml 0.1 mM DPPH solution, I%; $1 \cdot 10^{-3}$	2 ml 2 mM compound, investigated + 2 ml 0.1 mM DPPH solution, I%; $1 \cdot 10^{-4}$
1	Ascorbic acid	92,42	79,85
2	7	76,15	65,13
3	8.1	72,31	55,04
4	8.2	60,68	51,54
5	8.3	59,15	52,31
6	8.4	43,93	42,31
7	8.5	78,12	72,82
8	8.6	63,16	55,64
9	8.7	84,10	74,27
10	8.8	63,42	63,93
11	8.9	78,80	69,06
12	8.10	50,09	10,43

A universal method for the preparation of 5-(5-methyl-1*H*-pyrazole-3-yl)-4-phenyl-4*H*-1,2,4-triazole-3-thiol and its alkyl derivatives was developed. The structure and individuality of the synthesized compounds was confirmed by ¹H NMR, IR and LC-MS spectra, elemental analysis. The biological potential of new compounds was ascertained.

REFERENCES

1. Karrouchi, K., Radi, S., Ramli, Y., Taoufik, J., Mabkhot, Y., Al-aizari, F., Ansar, M. (2018). Synthesis and Pharmacological Activities of Pyrazole Derivatives: A Review. *Molecules*, 23, 134.
2. Al-Ghamdi, H. M. (2019). Synthesis and antimicrobial activity of novel pyrazole derivatives. *Oriental journal of chemistry*, 35 (1), 391-398.
3. Vijesh, A. M., Isloor, A. M., Shetty, P., Sundershan, S., Fun, H. K. (2013). New pyrazole derivatives containing 1,2,4-triazoles and benzoxazoles as potent antimicrobial and analgesic agents. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 62, 410-415.

4. Kharb, R., Sharma P. C., Bhandari, A., Yar, M. S. (2012). Synthesis, spectral characterization and anthelmintic evaluation of some novel imidazole bearing triazole derivatives / *Der Pharmacia Lettre*, 4 (2), 652-657.
5. Hassan, G. S, Abdel Rahman D. E., Abdelmajeed E. A., Refaey R. H., Alaraby, S. M., Nissan, Y. M. (2019). New pyrazole derivatives: Synthesis, anti-inflammatory activity, cyclooxygenase inhibition assay and evaluation of mPGES. *Eurohean Journal of Medicinal Chemistry*, 171, 332-342.
6. Li, Y.-S., Tian, H., Zhao, D.-S., Hu, D.-K., Liu, X.-Y., Jin, H.-W., Cui, Z.-N. (2016). Synthesis and bioactivity of pyrazole and triazole derivatives as potential PDE4 inhibitors. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 26 (15), 3632-3635.
7. Ashok, D., Kavitha, R., Gundu, S., Rao, V. H. (2017). Microwave-assisted synthesis of new pyrazole derivatives bearing 1,2,3-triazole scaffold as potential antimicrobial agents. *Journal of the Serbian Chemical Society*, 82 (4), 357-366.
8. Hotsulia, A. S., Fedotov, S. O. (2019). Synthesis, structure and properties of *N*-R-2-(5-(5-methyl-1*H*-pyrazole-3-yl)-4-phenyl-4*H*-1,2,4-triazole-3-ylthio) acetamides / *Current issues in pharmacy and medicine: science and practice*, 12 (1), 4-9.
9. Kazunin, M. S., Voskoboynik, O. Yu., Nosulenko, I. S., Berest, G. G., Sergeieva, T., Okovytyy, S., Karpenko, O. V., Priimenko, B. O., Kovalenko, S. I. (2018). Synthesis, Tautomerism, and Antiradical Activity of Novel Pteridinetrione Derivatives / *Journal of Heterocyclic Chemistry*, 55 (4), 1033-1041.
10. Breitmaier E. *Structure Elucidation by NMR in Organic Chemistry: A Practical Guide: 3rd Revised Edition*. Wiley, 2002. 272 p.
11. Barbara H. Stuart. *Infrared Spectroscopy: Fundamentals and Applications*. Wiley, 2004. 224 p.
12. Kedare S. B., Singh R. P. (2011). Genesis and development of DPPH method of antioxidant assay / *Journal of Food Science and Technology*, 48, 412-422.
13. Szabo, M., Idițoiu, C., Chambre, D., Lupea, A. (2007). Improved DPPH determination for antioxidant activity spectrophotometric assay / *Chemical Papers*, 61, 214-216.
14. Shcherbyna, R., Parchenko, V., Martynyshyn, V., Hunchak, V. (2018). Evaluation of acute and subacute toxicity of oil liniment based on 4-((5-(decylthio)-4-methyl-4*H*-1,2,4-triazol-3-yl)methyl) morpholine / *Journal of Faculty of Pharmacy of Ankara University*, 42 (1), 43-52.



KADIN ECZACILAR PERSPEKTİFİNDEN ECZACILIK MESLEĞİ

PHARMACY PROFESSION FROM THE PERSPECTIVE OF FEMALE PHARMACISTS

Miray ARSLAN*¹, Efsun Sima ÇOBAN², Sevgi ŞAR³

¹Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Eczacılık İşletmeciliği Ana Bilim Dalı, 65080,
Van, Türkiye

²Denizli Devlet Hastanesi, 20100, Denizli, Türkiye

³Ankara Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Eczacılık İşletmeciliği Ana Bilim Dalı, 06100, Ankara,
Türkiye

ÖZ

Amaç: Bu çalışmanın amacı, eczacılık sektörünün farklı alanlarında çalışan kadın eczacılar perspektifinden eczacılık mesleğinin değerlendirilmesi ve aynı zamanda kadın eczacıların iş doyumlarının ele alınmasıdır.

Gereç ve Yöntem: Çalışmanın evrenini Ankara ilinde eczacılığın farklı alanlarında çalışan kadın eczacılar oluşturmaktadır. Çalışmada nitel görüşme yönteminden yararlanılmış olup, görüşmede katılımcılara yarı yapılandırılmış sorular yöneltilmiştir. Görüşmeler tamamlandıktan sonra nitel görüşme esnasında tutulan kısa notlar ve ses kayıtları ile elde edilen veriler araştırmacılar tarafından çözümlenerek, tematik analiz yapılmıştır.

Sonuç ve Tartışma: Çalışmada, Meslek Tercihi, Karşılaşılan Zorluklar ile İş Doyumu ve Memnuniyet olmak üzere üç temel tema belirlenmiştir. Belirlenen temalar ve alt temalar değerlendirildiğinde, eczacılık mesleğinin icrasında cinsiyet farklılığının herhangi bir olumsuzluk oluşturmadığı görülmüştür. Kadın eczacıların genel olarak mesleki memnuniyetlerinin çalıştıkları alana bağlı olarak değişkenlik gösterdiği, özellikle akademisyen kadın eczacılarının mesleki memnuniyetlerinin çok yüksek olduğu gözlemlenmiştir. Mesleki memnuniyet maddi olarak ele alındığında ise memnuniyet düzeyi en yüksek olan grubun serbest eczacılık yapan kadınlar olduğu tespit edilmiştir. Bu çalışmada elde edilen sonuçların gerek meslek tercihi yapacak olan bireylere ve gerekse çalışma alanı seçiminde kararsızlık yaşayan eczacılık mesleği mensuplarına yol göstereceği düşünülmektedir.

Anahtar Kelimeler: eczacılık, kadın, mesleki memnuniyet

ABSTRACT

Objective: The aim of this study is evaluating the pharmacy profession from the perspective of the female pharmacists working in different areas of the pharmaceutical sector, also addressing the job satisfaction of the female pharmacists.

* Sorumlu Yazar / Corresponding Author: Miray Arslan
e-posta / e-mail: eczmirayarslan@gmail.com, Tel. / Phone: +90 432 444565/21148

Material and Method: *The population of the study consists of female pharmacists working in different fields of the pharmacy profession in Ankara. The qualitative interview method was used in the study and semi-structured questions were asked to the participants. After the interviews were completed, the data obtained from the short notes and voice recordings held during the qualitative interview were analyzed by the researchers and thematic analysis was conducted.*

Result and Discussion: *In the study, three main themes were determined: Vocational Preference, Difficulties Encountered and Job Satisfaction. When the identified themes and sub-themes were evaluated, it was seen that gender difference did not cause any negativity in the practice of the pharmacy profession. It has been observed that the job satisfaction of female pharmacists depending on the field in which they work, and the job satisfaction of the academic female pharmacists, in particular, is very high. When job satisfaction is taken into consideration financially, it is determined that the group with the highest level of satisfaction is women working as a community pharmacist. It is thought that the results obtained in this study will guide both the individuals who will make a career choice and the members of the pharmacy professionals who are indecisive in the selection of the working area.*

Keywords: *job satisfaction, pharmacy, women*

GİRİŞ

Kadınların toplumdaki statüleri dünyadaki gelişmeler ile birlikte ev odaklı işlerle uğraşan birey olmaktan, gerek toplumsal ve gerekse ekonomik kalkınmada yer alan bireyler olmaya doğru değişiklik göstermiştir [1]. Ülkemizde meslek hayatının çeşitli alanlarında özellikle Cumhuriyet'in ilanından itibaren yer alan kadınlar eczacılık alanında varlıklarını hissettirmişlerdir. Türkiye'de 1839 yılında *Mekteb-i Tıbbiye-i Adliye-i Şâhâne*'de *Eczacılık Sınıfı*'nın açılması ile başlayan eczacılık eğitimine başlangıçta sadece erkek öğrenciler alınırken, 1922 yılından itibaren Kadırga'daki Eczacılık Mektebi kayıtlarında kız öğrencilerin de adına rastlanılmaktadır [2-7]. Eczacılık eğitimine ilk başlayan kadın, 1924 yılında 226 numarayla kayıt yaptıran ve bir buçuk ay sonra okuldan ayrılan *Ayşe Saadet Hanım* olduğu bilinmektedir. Eczacılık Mektebi'ne 1927 yılında kayıt olan *Fatma Belkıs (Derman) Hanım*, *Fatma Bedriye (Siren) Hanım* ve *Ayşe Semra (Erçin) Hanım* ise 1930 yılında mezun olan ilk kadın eczacılardır [8-10]. İlerleyen yıllarda ise eczacılık eğitimi gören kadınların sayısı giderek artış göstermiştir.

Türk Eczacıları Birliği tarafından 2018 yılında yayınlanan Sağlık İlaç ve Eczacılık İstatistiklerine bakıldığında ülkemizde kayıtlı 32894 eczacının bulunduğu ve bunların %56'sının kadın olduğu görülmektedir. Türkiye'deki kadın eczacıların istihdam alanları ele alındığında büyük çoğunluğunun eczane eczacılığı yapmayı tercih ettiği görülmektedir. Ülkemizde 2019 Haziran ayı Türk Eczacıları Birliği verilerine göre toplam 26210 serbest eczane bulunmakta olup bunlardan 13.846'sının sahibi kadın eczacılardır. Bunun yanı sıra üniversite, kamu ve özel sektörde görev yapmakta olan pek çok kadın eczacı bulunmaktadır.

Bu çalışma kapsamında, eczacılık sektörünün farklı alanlarında mesleklerini icra eden kadın eczacıların kendi çalışma alanları özelinde eczacılık mesleğini değerlendirmeleri ve bu bağlamda kadın eczacıların iş doyumlarının belirlenmesi amaçlanmaktadır.

GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışmanın evrenini, Ankara ilinde eczacılık mesleğinin farklı alanlarında çalışan kadın eczacılar oluşturmaktadır. Çalışmada nitel görüşme yönteminden yararlanılmış olup, görüşmede kullanılacak olan yarı yapılandırılmış sorulardan oluşan görüşme protokolü Helsinki Deklerasyonu Prensipleri'ne uygun bir şekilde Ankara Üniversitesi Etik Kurulunun 06 Mayıs 2019 tarihli toplantısında alınan 175 sayılı karar ile uygun bulunmuştur. Görüşmelere başlamadan ise katılımcılar bilgilendirilmiş olur formunu imzalamışlardır.

Çalışmaya ilaç endüstrisinde görev yapan, kamuda çalışan, akademisyen olarak görev yapan ve serbest eczacı olarak hizmet sunmakta olan kadın eczacılardan eşit sayıda olacak şekilde toplam 20 eczacı davet edilmiştir. Verilerin tekrarlamaya başlaması ile birlikte görüşme sayısı yeterli görülmüş olup, uygulama sona erdirilmiştir.

Nitel görüşmeler araştırmacılardan biri tarafından gönüllü mahremiyetinin korunacağı bir mekânda yüz yüze yapılmıştır. Görüşmeler sırasında gönüllüden onay alınarak ses kaydı gerçekleştirilmiştir. Her bir nitel görüşmede gönüllülere nitel görüşme araştırma protokolünde belirlenmiş olan, yarı yapılandırılmış sorular yöneltilmiştir. Görüşmeler yaklaşık 45 dakika sürmüştür.

Görüşmeler tamamlandıktan sonra öncelikle nitel görüşme esnasında tutulan kısa notlar ve ses kayıtları ile elde edilen veriler araştırmacılar tarafından çözümlenerek kodlanmıştır. Veriler arasında bağlantı kurabilmek amacıyla kategoriler belirlenip temalar oluşturulmuş ve içerik analizi yapılmıştır.

SONUÇ VE TARTIŞMA

Çalışmaya 20 kadın eczacı katılmış olup, katılımcılara ait demografik bilgiler Tablo 1'de verilmiştir.

Nitel görüşmelerin tamamlanması ile ses kayıtları ve görüşme sırasında tutulmuş olan kısa notlar çözümlenerek temalar oluşturulmuştur. Çalışmada *Meslek Tercihi, Karşılaşılan Zorluklar ile İş Doyumu ve Memnuniyet* olmak üzere üç temel tema belirlenmiştir. Çalışmaya ait tema ve alt temalar Tablo 2'de verilmiştir.

Tablo 1. Katılımcılara ait demografik bilgiler

Katılımcı numarası	Çalışma alanı	Yaş	Medeni hal	Eczacı olarak çalıştığı süre (yıl)
E1	Serbest Eczane	30	Evli	6
E2		47	Bekar	25
E3		47	Bekar	25
E4		37	Evli	14
E5		34	Evli	8
E6		46	Evli	25
E7		29	Bekar	7

E8	Kamu	27	Evli	4
E9		28	Bekar	4
E10		46	Evli	21
E11	Üniversite	41	Evli	19
E12		56	Evli	34
E13		39	Evli	7
E14		57	Bekar	34
E15		29	Bekar	5
E16	İlaç Sanayi	24	Bekar	2
E17		37	Evli	15
E18		28	Evli	4
E19		27	Bekar	3
E20		35	Evli	12

*Katılımcılar E1:1. Eczacı-...-E20: 20. Eczacı olacak şekilde kodlanmıştır.

Tablo 2. Ana ve Alt Temalar

Ana temalar	Alt temalar
Meslek Tercihi	Aile etkisi Üniversiteye giriş sınavı sonucunun etkisi Saygın ve sosyal bir meslek oluşu
Karşılaşılan Zorluklar	Çalışma saatleri Nöbetler Cinsiyete bağlı yaşanan zorluklar
İş Doyumu ve Memnuniyet	Maddi açıdan Manevi açıdan

Eczacıların Meslek Tercihlerini Etkileyen Faktörler

Çalışma sonucunda katılımcıların görüşleri değerlendirildiğinde, katılımcıların meslek tercihlerinde ailelerinin etkisi, üniversiteye giriş sınavının sonucu ile eczacılığın sosyal ve saygın bir meslek oluşu algısı olmak üzere üç önemli faktör olduğu görülmektedir. Katılımcıların çoğunluğunun mesleğini bilinçli olarak tercih ettiği ve tercihlerini en çok etkileyen unsurların ise üniversiteye giriş sınavı sonuçları ve aile etkisi olduğu tespit edilmiştir.

E2: “Annem çok istemişti. Meslek seçiminde kararsızdım. Ben de annemi dinledim.”

E8: “Sağlık alanının her zaman geleceği olduğunu düşündüğüm için seçtim. ... Bir de o zamanlar ailem esnek çalışma saatleri var, ailenle ilgilenirsin gibi söylemlerle beni yönlendirdi.”

E10: “Açıkçası meslek seçimim bilinçli değildi. Sınava girerken ailemin eczacılık mesleğine yönlendirmesi sonucu tercih ettim...”

E11: “Babam çok istemişti. Tıp fakültesini kazanmayınca eczacılık mesleğini tercih ettim.”

E17: “...Annem eczane açmamı çok istiyordu...”

Yukarıda da belirtildiği gibi katılımcılar aile etkisi dışındaki en önemli faktörün üniversite sınavından alınan sonuç olduğunu ifade etmişlerdir.

E3: “Bilinçli olarak tercih etmedim. Sayısal alanda başarılıydım ve ilgim o yöneydi. Bizim dönemde genellikle sağlık alanında seçim yaparken ya tıp ya dış hekimliği ya da eczacılık tercih edilirdi. Ben eczacılık fakültesini kazandım...”

E5: “...puan açıklandıktan sonra da benim için en mantıklı tercih eczacılık oldu...”

E6: “İlk tercihim tıptı. Puanım yeterli gelmedi. Bizim zamanımızda eczacılık prestijli ve kadınlara yakıştırılan bir meslekti. Ben eczacılığı tercih ettim...”

E7: “Ben tıp ya da eczacılık istiyordum. O yıl tıp fakültelerinde artış çok fazla oldu o yüzden ben de eczacılık bölümünü kazanabildim.”

Literatüre bakıldığında bireylerin üniversite veya meslek tercihlerini ele alan pek çok çalışma ile karşılaşılmaktadır [11-14]. Bu çalışmalarda da benzer şekilde aile etkisinin ve üniversite sınav sonuçlarının bireylerin meslek seçiminde etkili olan faktörler arasında yer aldığı görülmektedir. Ayrıca, Kıran ve Taşkıran’ın eczacılık fakültesi öğrencilerin meslek tercihine etki eden faktörleri ele aldıkları çalışmada mesleğe duyulan ilgi ve üniversite sınavının aile etkisinden daha önemli olduğu belirlenmiştir [15]. Bu iki temel neden dışında katılımcıların eczacılığın saygın bir meslek olduğunu düşündüklerinden ve insanlar ile ilişkilerinin yoğun olduğu bir meslek olmasından dolayı tercih ettikleri görülmüştür.

E1: “...Ben eczacılığın saygın bir meslek olduğunu düşünerek tercih ettim...”

E8: “... Sosyal yönünün hoşuma gitmesi de tercihlerimde etkili oldu...”

E18: “Eczacılığı aslında çok da bilinçli olarak seçmedim ama tercih ederken düşündüklerim ve hayal ettiklerim; sağlık alanında çalışmak, insanlarla iletişim kurmaktı...”

E19: “...sağlık sektörüne olan ilgim ve insanlarla iletişim kurmayı sevdiğimden dolayı tercih ettim.”

Ek olarak, ülkemizde eczacılık mesleğinin kadınlarla özdeşleştirilmiş olması ve kadınların iş hayatı ile birlikte ev işleri ve annelik gibi sorumluluklarını da rahatlıkla halledebileceğine inandıklarından dolayı bu mesleği seçtikleri görülmüştür.

Katılımcıların mezuniyet sonrası çalışma alanlarının belirlenmesine yönelik görüşleri değerlendirildiğinde ise, çoğunluğunun fakülte eğitimine başladıklarında serbest eczacılık yapma hayali ve hedefi olduğu görülmüştür. Katılımcılar bu hayal ve hedeflerinin özellikle üniversite eğitimleri sürecinde değişim gösterdiğini ve bu değişim ile farklı alanlara yöneldiklerini ifade etmişlerdir.

E6: “...Eczane açan arkadaşlarım hiç memnun değildi. Zaman ayıramamaktan, hafta sonları çalışmaktan yakınıyorlardı. Kamu eczacılığının giriş çıkış saatleri belli, hafta sonları tatil. O yüzden kamuya yöneldim.”

E10: “...Okul döneminde stajımı eczanede yapmıştım. Oradaki deneyimlerime göre serbest eczacılığın bana göre olmadığına karar verdim. Bizim dönemimizde ilaç sanayisinde eczacılar tercih edilmiyordu. 1 sene çalışıp gidiyorlar diye düşünüyorlardı. Bizim yerimize daha düşük ücretle kimyagerler ve biyologlar çalıştırıyorlardı. Akademik anlamda da pek başarılı değildim. Bu yüzden ben de kamuya yöneldim.”

E11: “Üniversiteye başlamadan önce serbest eczacılık istiyordum. Eczane ortamını seviyordum, hayalimdi... 2.sınıftan sonra eczane eczacılığı fikrimden vazgeçtim, akademisyenliği hedef belirledim. Çünkü okulumu çok sevmişim. Araştırma yapmak, laboratuvarlarda çalışmak ilgilimi çekmişti...”

E12: “ ... eczacılık fakültesine geldiğimde akademisyenliği düşünüyor muydum? Hayır, düşünmüyordum. Mezun olduktan sonra kafamda yavaş yavaş şekillendi.”

Elde edilen bu bulgular mevcut literatür ile de paralellik göstermektedir [11-14]. Yukarıda da belirtildiği gibi katılımcıların çoğu eczacılık fakültesini, eczane açma düşüncesiyle seçtiğini ancak bu kararlarının üniversite eğitimi sürecinde değiştiğini belirtmişlerdir. Akademisyen kadın eczacıların çoğu fakülte ortamını sevmeleri ve bu ortamdaki ayrılmak istememeleri, özel firmada çalışan kadın eczacıların ise kendilerini sürekli geliştirmeyi ve aktif bir şekilde çalışmayı sevmelerinden dolayı bu alanlarda çalışmak istediklerini ifade ettikleri görülmektedir.

Meslek Hayatında Karşılaşılan Zorluklar

Katılımcıların meslek hayatlarında yaşadığı zorluklar çalışma alanlarına bağlı olarak değişiklik göstermekte olup, bu zorlukların özellikle çalışma saatleri ile ilişkili olduğu tespit edilmiştir. Bu tema altında çalışma saatleri, nöbetler ve cinsiyet etkisi olmak üzere üç alt tema ele alınmıştır.

Çalışma saatlerini farklı çalışma alanlarına göre ele alındığında özellikle serbest eczacı olan katılımcıların günlük çalışma saatlerinden ve hafta sonu çalışıyor olmaktan memnun olmadığı belirlenmiştir.

E1: “Cumartesi çalışıyor olmak gerçekten aile ve sosyal yaşantımı çok etkiliyor. Bana sadece pazar günü kalıyor... Çalışma koşullarından memnunum fakat saatlerimiz çok uzun...”

E3: “Saatlerin uzun olması ve haftada 6 gün olması bana zorluk yaşıyor...Çalışma saatlerimiz çok uzun...Günde neredeyse 11 saat...”

E5: “Çalışma saatlerinden memnun değilim. Özellikle cumartesi çalışıyor olmak insanı yoruyor...”

Serbest eczacıların aksine kamu eczacılarının birçoğu çalışma saatlerinden ve koşullarından memnun olduğunu belirtmiştir. Akademisyen eczacılar ve ilaç sanayiinde çalışan eczacılar açısından da çalışma saatleri bir sorun teşkil etmemektedir. Akademisyen eczacılar genel olarak memuriyette olduğu gibi mesai saatleri olmadığını ama bu durumun onları rahatsız etmediğini ifade etmiştir.

E15: “Üniversitede mesai kavramı olmuyor. Her an hocadan mail gelebiliyor, fakültede işimiz çıkabiliyor, ama bu durum bana uygun. 8.00-17.00 çalışmaktansa bu durumu tercih ederim.”

Literatürdeki çalışmalar incelendiğinde Warr-Cook-Wall ölçeğine göre İngiltere’de eczacıların genellikle işlerinden memnun olduklarını özellikle de kadın eczacıların iş memnuniyetinin daha yüksek olduğu kaydedilmiştir [16-18]. Çalgan ve ark. tarafından Ankara il merkezinde yapılan ve katılımcıların çoğunluğunun kadın eczacılardan oluştuğu çalışmada elde edilen bulgularda ise eczacıların tükenmişlik açısından risk altında olduğu ortaya konulmuştur. Çalışma sonucuna göre en büyük tükenmişlik sendromu nedeni fiziksel koşullar ve çalışma saatlerinin uzunluğu olarak belirlenmiştir [19]. Bu duruma paralel olarak, bu çalışmada da kadın eczacıların büyük bir çoğunluğu çalışma saatlerinin uzun olmasından dolayı çalışma verimliliğinin düştüğünü, aile ve sosyal yaşamına etki ettiğini belirtmişlerdir. Akademisyen kadın eczacılar bu durumu hayatını ve görevlerini programlayarak çözüme kavuşturduğu görüşünde fikir birliği göstermişken, serbest eczacılık yapmakta olan kadın eczacılar özellikle Ankara ilinde cumartesi günlerinin de mesai saatleri içinde olması sebebiyle olumsuzluklar yaşadıklarını ifade etmişlerdir. Liu ve ark. ’nın Avustralya’da hastane eczanesi personelleri ile yaptıkları çalışma sonucunda da benzer şekilde uzun çalışma saatlerinin eczacıların verimliliğini düşürdüğü gözlemlenmiştir [20].

Serbest eczacılar ve hastane eczacıları açısından önem arz eden diğer bir konu ise nöbetlerdir. Serbest eczacılar nöbet sürelerinin uzun oluşundan ve bir kadın olarak nöbetlerde tek başlarına zorlandıklarından dolayı rahatsızlıklarını dile getirmişlerdir. Cinsiyet farklılığının serbest eczacılar açısından en çok fark oluşturduğu noktanın nöbetler olduğu tespit edilmiştir.

E1: “Nöbette bir kadın eczacı olarak tek başına kalamıyorsun. Personelinizden ya da ailenizden destek alıyorsunuz. Bazı ilaçları erkek hastalar kadın eczacılardan almak istemiyor. Öyle zamanlarda erkek personellerim devreye giriyor. Erkek eczacı olsam durum böyle olmazdı.”

E4: “Bence özellikle nöbetlerde erkek olmam fark yaratırdı. Daha rahat olurum. Çocuklar babaya göre anneyi daha çok arıyorlar. Geceleri yanlarında olmak istiyorum...”

E5: “...Özellikle nöbetler yüzünden çoğu eczanede erkek personel şart oluyor...”

Hastane eczacısı olan katılımcılar cinsiyetin değil hastanede hizmet veren eczacı sayısının az olması gibi durumlarda nöbet sayılarının arttığını belirtmişlerdir.

E10: “...ben ilk çalışmaya başladığım yerde çok az eczacıydık. Nöbete kalıyordum tüm gece ertesi gün eve gidemiyordum. İdari personel sen kal elemana ihtiyacımız var diyordu. Ben de mecburen 24 saat boyunca çalışmış oluyordum...bu zorluklar da cinsiyete bağlı değil.”

Akademisyen eczacılar meslek hayatlarında yaşadıkları zorlukların cinsiyete bağlı olmadığını ancak cinsiyetin zorlukları aşmada fark oluşturabileceğini belirtmişlerdir. Ayrıca, evli ve özellikle çocuk sahibi olan kadınların iş hayatı dışında ev işleri ve anneliğin getirdiği sorumluluklardan kaynaklı olarak erkeklere göre mesleklerini icra ederken zorlanabildiklerini ifade etmişlerdir.

E11: “Yine aynı zorluklarla karşılaşacağımı düşünüyorum. Fakat erkek olsam bu zorlukların altından daha rahat kalkardım. Çünkü kadın olmak Türk toplumunda ev düzeninde ana faktördür. Evdeki her türlü detayı kadının düşünmesi gerekir. Bu yüzden kadın akademisyen eczacı olmak daha zor diyebilirim...”

E13: “...Kadın olarak çalışmanın zor olduğu konusunda genel geçer bir algı vardır fakat ben böyle bir zorlukla henüz karşılaşmadım... (Erkek olsaydım da) Yine aynı zorluklarla karşılaşırdım ... yine eczacılığı seçerdim fakat tercihim akademisyenlik olmazdı.”

E15: “Yaşadığım sıkıntıların hiçbiri cinsiyetime bağlı değildi. Erkek ya da kadın eczacı olmam karşılaşacağım sıkıntıları değiştireceğini sanmıyorum.”

Katılımcılar eczacılığın çoğu çalışma alanında kadınlarının sayısının daha çok olduğunu, bu nedenle kadınlar ve erkekler arasında bir farklılık ile genel olarak karşılaşmadıklarını ifade etmişlerdir. İlaç sanayiinde çalışan eczacılar da bu konuya vurgu yapmıştır.

E17: “Zaten eczacılık mesleğinin çoğunu kadın eczacılar oluşturuyor. O yüzden çalışma ortamımda kadın olmama bağlı bir zorlukla karşılaşmadım hiç.”

E19: “...Sadece kadın olduğum için karşılaştığım zor bir durum olmadı, sadece anlayışsız insanlarla karşılaşmak beni bazen zorladı diye düşünüyorum...Bence erkek ve ya kadın olmam durumu değiştirmezdi...”

Çalışmanın bulguları ışığında, kadın eczacıların mesleklerini yürütürken erkeklere oranla daha çok zorlandıklarını düşünmelerinin nedeninin cinsiyet değil, medeni durum olduğu tespit edilmiştir. Odabaş tarafından yapılan çalışmada da benzer şekilde eczacıların eczacılık mesleğinin cinsel kimliği

olmadığı vurgusu yaptığı görülmektedir [21]. Çalışma sonucuna göre bekâr kadın eczacıların, evli kadın eczacılara göre iş hayatında daha az zorluklarla karşılaştığı gözlenmiştir. Evli kadın eczacılar hem ev düzeni hem de işini aynı anda yürütmekte bazen zorluklar yaşadıklarını ve ailesine yeterince vakit ayıramadıklarını belirtmişlerdir. T.C. Sağlık Bakanlığı tarafından 2017 yılında yürütülmüş olan Türkiye Sağlık Personeli Memnuniyet Araştırması'nın sonuçları incelendiğinde, cinsiyet ve medeni durumun sağlık personellerinin mesleki memnuniyet düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar göstermediği tespit edilmiştir [22].

İş Doyumu ve Memnuniyet

Çalışma kapsamında, katılımcıların iş doyumu ve memnuniyetleri gerek maddi gerekse manevi açıdan ele alınmıştır. Serbest eczacılık yapan katılımcılar, geçmişte eczacıların daha çok kazandıklarını ve eczacılığın daha saygın bir meslek olduğunu vurgulamış ve bu gibi nedenlerden dolayı iş doyumu ve memnuniyetlerinin günümüzde iyi düzeyde olmasına karşın geçmişe göre daha düşük olduğunu ifade etmişlerdir. Maddi açıdan iş doyumu ve memnuniyet dikkate alındığında serbest eczacı katılımcılardan 4'ünün maddi olarak serbest eczacılığın kendilerini tatmin ettiğini belirttikleri görülmüştür.

Manevi tatmin noktasında aile hayatına sağlayacağı kolaylığın yanı sıra ise çeşitli görüşler ile karşılaşmıştır.

E3: "Akademik olarak yaklaşık 5 yıl asistanlık yaptım, Türk Eczacıları Birliği'nde de 5 yıl çalıştım. Ama beni en çok tatmin eden serbest eczacılık oldu. İnsanlarla birebir iletişimde olmak, yaptığımız işin, edindiğimiz bilgilerin tamamen karşılığını gözlerinizle görüyorsunuz. Tabi biz çok ağır eğitim aldık bitkilerin adları, içindeki etken maddeler, kimyasal bileşenler gibi konular da gördük. Bu aldığımız eğitimi uygulayabileceğimiz en yakın alan eczane eczacılığı..."

E4: "Bir insana yardım edebilmek, minnetlerini almak çok güzel bir şey."

E5: "Ben mesleğimi titizlikle yaptığımı ve layıkıyla yerine getirdiğimi düşünüyorum. Hastalarım uzun uzun anlatırım, sorularına cevap veririm..."

Kamu eczacıları genel olarak maddi gelirlerinin verdikleri hizmetle orantılı olmadığını ve düşük olduğundan şikâyet etmektedirler. Kamu eczacılarının maddi ve manevi tatmin ile ilgili bilgiler şu şekildedir:

E6: "...Maddi olarak diğer kamu kuruluşlarındaki eczacılara göre kıyasladığımızda neredeyse onlardan daha fazla çalışıyoruz ama aldığımız ücret onlardan daha az. ... Kadınlar

ileride aile kurmayı ve anne olmayı planladığı için ya öğretmen ya da eczacılık alanında tercihleri fazla oluyor ...”

E7: “Maddi ve manevi olarak memnun değilim. Özellikle maddi olarak düzenlemeler yapılmaya çalışılıyor umarım şartlar değişir...”

E8: “Maddi açıdan memnunum. Her ay gelen para miktarım belli ve emekli olurken yüksek miktarda ikramiye alacağım. Manevi açıdan da tatmin oluyorum.”

E9: “Hem maddi hem de manevi açıdan tatmin oluyorum. Maddi olarak çevremdeki diğer farklı mesleklerdeki arkadaşlarımla kendimi kıyasladığımda çok daha iyi fark var. Manevi olarak ise yaptığım iş hastaları ilgilendirdiği için tatmin oluyorum. Zira SGK’da yaptığım iş yurtdışından gelen yani yetim ilaçların hastalara verilip verilmemesi. Bunlar hayati önem taşıyan ve çok pahalı ilaçlardır. O yüzden geçmiş olsun dememin ardından onların bana teşekkür ederim dediğini duymak, onlara hayatına dokunabildiğimi bilmek beni çok mutlu ediyor.”

Bulgular doğrultusunda kamu eczacılarının genel olarak elde ettikleri maddi gelirden memnun olmadığı görülmektedir. Akademisyen eczacılar gözüyle konuya bakıldığında, katılımcıların maddi açıdan tam olarak tatmin olamasalar da akademik derece arttıkça maddi doyumun da artacağı görüşüne sahip oldukları ve eğitmen rolünün manevi doyumunu sağlamada etkili olduğunu düşündükleri tespit edilmiştir.

E11: “...Yeni eczacılar yetiştirmek güzel bir şey”

E13: “Manevi yönden tatmin oluyorum maddi olarak ise bu çalışma performansı için yeterli olduğunu düşünüyorum.”

E14: “Manevi yönden tatmin oluyorum fakat maddi olarak özellikle asistan olduğumuz zamanlarda hiç tatmin etmiyordu. Dışarda çalışan herkes bizden daha iyi maaşlara sahipti. Şuan biraz daha tatmin edici bir maaş alıyorum...”

Son olarak ilaç sanayiinden katılımcıların görüşleri ele alınmıştır. Tecrübe ve çalışılan birime bağlı olarak katılımcıların maddi ve manevi doyum düzeylerinde değişiklikler olduğu görülmektedir.

E16: “Başlangıç olarak maddi açıdan tatmin etmiyor. Kıdem atlamam gerekiyor. Fakat manevi yönden işi öğrendikçe, bir şeyleri yönettikçe oldukça tatmin edici oluyor. Ben sınıflandırma bölümünde çalışıyorum. İşimi seviyorum. Beni tatmin ediyor.”

E17: “Evet, hem maddi hem de manevi yönden beni tatmin ediyor. Zaten o yüzden 15 yıldır mesleğimi severek devam ediyorum. Ama bu tatmin kişinin kendisine neler kattığıyla da ilgili.

Ben çalışma hayatım, mastırım ve doktoram boyunca sürekli öğrenmeye açık olarak kendimi geliştirmeye çabaladım.”

E18: “Mesleğim şuan için ortalamaya göre maddi olarak tatmin ediyor diyebilirim. Manevi olarak kesinlikle tatmin ediyor...”

Çalışmada katılımcıların iş doyumunu ve memnuniyetleri maddi açıdan ele alındığında, tatmin düzeyi en yüksek olan grubun eczane eczacılarından, en düşük olan grubun ise kamuda çalışan eczacılardan oluştuğu gözlemlenmiştir. Literatüre bakıldığında eczacıların iş doyumunu ve memnuniyetini ele alan pek çok çalışma yer almaktadır [23-25]. Bu çalışmalarda iki cinsiyet grubu birlikte ele alınmış olup, kadınların eczacılık mesleğindeki iş doyumunu ve memnuniyet düzeylerinin genel olarak erkeklerden yüksek olduğu ortaya konulmuştur. Bu çalışmada da elde edilen sonuçlara baktığımızda, çalışma alanları arasında farklılıklar gözlense de kadın eczacıların genel olarak yaptıkları işten memnun olduğu tespit edilmiştir.

Çalışma bulgularında dikkat çeken bir diğer ayrıntı ise katılımcıların eczacılık mesleğinin birbirinden çok farklı çalışma alanına sahip olduğunu ve bu durumun onları memnun ettiğini belirtmesidir. Literatüre bakıldığında ise, Aydemir’in meslek seçeneklerindeki artışın meslek seçiminde kararsızlıklara yol açtığı görülmektedir [26]. Buna karşın, Kıran ve Taşkiran tarafından belirtildiği gibi değişen eczacılık mevzuatıyla birlikte, eczacılığın farklı çalışma alanlarına yönelen eczacı sayıları değişmekte olup [15], bu çalışma ile benzer şekilde bu durumun eczacıların mesleki memnuniyetine katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

Bu çalışma sonucunda kadın eczacıların, eczacılık mesleğini genel olarak aile yönlendirmesi ve sağlık alanında çalışmak istemesi nedeniyle tercih ettikleri ve eğitime başlamadan önce çoğu katılımcının eczane açmak dışındaki diğer çalışma alanlarından haberdar olmadıkları belirlenmiştir. Ayrıca, kadınlar tarafından eczacılık mesleğinin bu kadar çok tercih edilmesinin sebepleri arasında eczanede kendi işinin patronu olma, çalışma şartlarını ve saatlerini kendisi belirleyebilme gibi düşüncelerin olduğu görülmüştür. Ancak, katılımcıların çoğu mezun olduktan sonra bu düşüncelerinde yarıldıklarını ve eczacılık mesleğinin çalışma şartları ve saatlerinin düşündüklerinden yorucu olduğunu ifade etmişlerdir.

Bu bağlamda, bu çalışmada elde edilen sonuçların gerek meslek tercihi yapacak olan bireylere ve gerekse çalışma alanı seçiminde kararsızlık yaşayan eczacılık mesleği mensuplarına yol göstereceği düşünülmektedir.

TEŞEKKÜR

Çalışmaya katılan tüm eczacılara sundukları katkılarından dolayı teşekkür ederiz.

KAYNAKLAR

1. Karabıyık, İ. (2012). Türkiye’de çalışma hayatında kadın istihdamı. Marmara Üniversitesi İİBF Dergisi, 32, 231-260.
2. Baytop, T. (1985). Türk Eczacılık Tarihi, İ.Ü. Yayınları, No: 3358, Ecz. Fak. No: 47, İstanbul: Sanal Matbaacılık.
3. Baytop, T. (2000). Osmanlı Döneminde Eczacılık Öğretimi, Türk Eczacılık Tarihi Araştırmaları, s.96-105, İstanbul.
4. Baytop, T. (2000). Türkiye’de Eczacılık Eğitiminin 150. Yılı, Türk Eczacılık Tarihi Araştırmaları, s.50-57, İstanbul.
5. Baylav, N. (1968). Eczacılık Tarihi, İstanbul: Yörük Matbaası.
6. Dölen, E. (1995). Eczacılık Tarihi (Ders Notları), İstanbul: Marmara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi.
7. Kocaer, R. (1949). Türkiye Eczacılar Almanacağı, İstanbul: Hüsnütabiat Matbaası.
8. Çubukçu, B. Prof., Dr. Asuman (Berk) Baytop. (1988). Farmakognozi Alanında Akademik Dereceleri (Dr., Doç., Prof.,) Kazanan İlk Türk Kadını. İçinde: N. Yıldırım (Ed.). Sağlık Alanında Türk Kadını (Cumhuriyetin Tıp Fakültesi'ne Kız Öğrencilerinin Kabulünün 75. Yılı), (s.341-347). İstanbul: Novartis Yayınları.
9. Şar, S. (2002). Türkiye’de eczacılık fakültelerindeki başlangıçtan bugüne lisans diploması eczacılık olan kadın öğretim üyeleri. VII. Türk Tıp Tarihi Kongresi; 4 Eylül 2002; İstanbul.
10. Şar, S., Arslan, M., Sözen Şahne, B. (2014). Türkiye’de eczacılık alanında ilk kadın eczacılar. Kadın/Woman 2000 Journal for Women’s Studies. 15(2), 141-164.
11. Tuncalı Yaman, T., Çakır, Ö. (2017). Üniversite tercihlerini etkileyen faktörlerin seçime dayalı konjoint analizi ile belirlenmesi. Makü-Uyg. Bil. Derg, 1, 65-84.
12. Köksal, K. (2016). Üniversite ve meslek tercihini etkileyen unsurlara yönelik bir alan araştırması. Kara Harp Okulu Bilim Dergisi, 26, 39-69.
13. Gürdoğan, A. (2016). Öğrencilerin üniversite tercihlerini etkileyen faktörler: ortaca örneği. Journal of International Social Research. 9(42), 1238-1246.
14. Sarıkaya, T., Khorshid, L. (2009). Üniversite öğrencilerinin meslek seçimini etkileyen etmenlerin incelenmesi: üniversite öğrencilerinin meslek seçimi. Türk Eğitim Bilimleri Dergisi. 7, 393-423.
15. Kıran, B., Taşkiran, E.G. (2015). Ege üniversitesi eczacılık fakültesi 1. Sınıf öğrencilerinin meslek tercihine etki eden faktörler. Marmara Pharmaceutical Journal. 19, 159-167.
16. Sibbald, B., Enzer, I., Cooper, C., Rout, U. (2000). Gp job satisfaction in 1987, 1990 and 1998: lessons for the future? Fam Pract. 17, 364–371.

17. Whalley, D., Bojke, C., Gravelle, H., Sibbald, B. (2000). Gp job satisfaction in view of contract reform: a national survey. *Br J Gen Pract.* 56, 87–92.
18. Boyke, C., Sibbald, B., Gravelle, H. (2003). National survey of job satisfaction and retirement intentions among general practitioners in England. *Br Med J.* 326, 22–24.
19. Çalgan, Z., Yeğenoğlu, S., Aslan, D. (2009). Eczacılar da mesleki bir sağlık sorunu: tükenmişlik. *Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Dergisi.* 29, 61-74.
20. Liu, C.S., White, L. (2011). Key determinants of hospital pharmacy staff's job satisfaction. *Research in Social and Administrative Pharmacy.* 7, 51-63.
21. Odabaş, S. (2018). Devlet, eczacılar ve ilaç politikası: Mersin örneği. *Çukurova Araştırmaları.* 2, 45-56.
22. T.C. Sağlık Bakanlığı Web sayfası. (2017). Erişim Tarihi 04 Eylül 2019, erişim Adresi: <https://sbu.saglik.gov.tr/Ekutuphane/kitaplar/SAGEMpersonelMemnuniyeti2017.pdf>.
23. Carvajal, M. J., Popovici, I., Hardigan, P. C. (2019). Gender and age variations in pharmacists' job satisfaction in the United States. *Pharmacy.* 7(2), 46.
24. Carvajal, M. J., Hardigan, P. C. (2000). Pharmacists' sources of job satisfaction: inter-gender differences in response. *American Journal of Pharmaceutical Education.* 64, 420-425.
25. Al-Muallem, N., Al-Surimi, K. M. (2019). Job satisfaction, work commitment and intention to leave among pharmacists: a cross-sectional study. *BMJ open.* 9(9), e024448.
26. Aydemir, L. (2017). Lise öğrencilerinin meslek seçimindeki kararsızlıklarına etki eden faktörler (Trabzon Örneği). *Siirt Üniversitesi Sosyal Bilimler Enstitüsü Dergisi.* 5, 651-664.



AN INVESTIGATION OF THE PHARMACOKINETICS AND POTENTIAL METABOLITES OF POTASSIUM 2-((4-AMINO-5- (MORFOLINOMETYL)-4H-1,2,4-TRIAZOL-3-YL)THIO) ACETATE ON RATS

*POTASYUM 2-((4-AMİNO-5-(MORFOLİNOMETİL)-4H-1,2,4-TRİAZOL-3-İL)TİYO)
ASETATIN FARMAKOKİNETİĞİ VE POTANSİYEL METABOLİTLERİNİN SIÇANLARDA
ARAŞTIRILMASI*

Roman SHCHERBYNA*

Zaporizhzhya State Medical University, Faculty of Pharmacy, Department of Natural Sciences for
Foreign Students and Toxicological Chemistry, 69035, Zaporizhzhya, Ukraine

ABSTRACT

Objective: *The purpose of this work is to study the designated pharmacokinetic parameters and possible metabolites of the substance potassium 2-((4-amino-5-(morfolinometyl)-4H-1,2,4-triazol-3-yl)thio)acetate by intragastric introduction to rats.*

Material and Method: *The study was performed on Wistar rats. The following parameters were calculated to evaluate the pharmacokinetic properties: area under the pharmacokinetic curve (AUC), apparent clearance (CL), elimination rate constant (K), volume of distribution (VT), serum half-life (t_{1/2}). Separation was performed using Agilent 1260 Infinity HPLC system.*

Result and Discussion: *The determination of the concentration of potassium 2-((4-amino-5-(morfolinometyl)-4H-1,2,4-triazol-3-yl)thio)acetate in serum was performed for 0.08 (5 min), 0.25 (15 min), 0.75 (45 min), 2.5, 7.5, 13.5 and 24 hours. It was found that in the serum of rats the maximum concentration of the injected substance was reached almost immediately after administration, namely for 5 min with an average value at the level of 279,67 µg/ml. Thereafter, the concentration decreases mono-exponential, which indicates that the distribution and elimination occur at the same rate. The area under the pharmacokinetic curve is AUC = 150,8998 µg*h/ml. The serum half-life of the specified substance is established (t_{1/2} = 0.32 hours). Based on the obtained chromatograms and mass spectra, 5 possible metabolites of potassium 2-((4-amino-5-(morfolinometyl)-4H-1,2,4-triazol-3-yl)thio)acetate (PKR-173) were determined by intragastric introduction to rats.*

Keywords: *1,2,4-triazole, metabolite, pharmacokinetics*

* **Corresponding Author / Sorumlu Yazar:** Roman Shcherbyna
e-mail / e-posta: rscherbyna@gmail.com, *Phone / Tel.:* +380979181933

ÖZ

Amaç: Bu çalışmanın amacı, sıçanlara intragastrik olarak uygulanan potasyum 2-((4-amino-5-(morfolinometil)-4H-1,2,4-triazol-3-il)tiyo) asetat maddesinin, belirli farmakokinetik parametrelerini ve olası metabolitlerini incelemektir.

Gereç ve Yöntem: Çalışma Wistar sıçanları üzerinde gerçekleştirilmiştir ve farmakokinetik özellikleri değerlendirmek için aşağıdaki parametreler hesaplanmıştır: Farmakokinetik eğri altındaki alan (AUC), toplam klerens (CL), eliminasyon sabiti (K), toplam dağılım hacmi (VT) ve serum yarılanma ömrü (t_{1/2}). Ayırım, Agilent 1260 Infinity HPLC sistemi kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

Sonuç ve Tartışma: Kan serumundaki potasyum 2-((4-amino-5-(morfolinometil)-4H-1,2,4-triazol-3-il)tiyo) asetat konsantrasyonunun belirlenmesi, 0.08 (5 dakika), 0.25 (15 dakika), 0.75 (45 dakika), 2.5, 7.5, 13.5 ve 24 saat boyunca gerçekleştirilmiştir. Sıçanların kan serumunda, enjekte edilen maddenin maksimum konsantrasyonuna, uygulamadan hemen sonra, ortalama 279.67 µg/ml'lik bir değerle ve 5 dakika içinde ulaşıldığı bulunmuştur. Bu aşamadan sonra, konsantrasyon mono-exponential olarak azalmıştır ve bu durum dağılım ve eliminasyonun aynı oranda devam ettiğini göstermiştir. Farmakokinetik eğri altındaki alan (AUC) = 150.8998 µg*h/ml olup, belirtilen maddenin serum yarılanma ömrü belirlenmiştir (t_{1/2} = 0,32 saat). Elde edilen kromatogramlara ve kütle spektrumlarına dayanarak, sıçanlara intragastrik uygulama sonucunda, 5 adet olası potasyum 2-((4-amino-5-(morfolinometil)-4H-1,2,4-triazol-3-il)tiyo) asetat metaboliti belirlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: 1,2,4-triazol, farmakokinetik, metabolitler

INTRODUCTION

The process of creating new drugs is a rather complicated and time-consuming algorithm, as pharmacological documentation should include a large body of research into the effects of a potential drug on the human body [1, 2]. Along with studies of specific activity for a potential drug, it is necessary to study acute and chronic toxicity without which it is not possible to objectively evaluate the safety of the drug [3]. In this respect, the pharmacokinetics is closely interrelated with toxicity, which allows scientists to fundamentally approach the development of dosage, route of administration, and emergency assistance (in overdose) with new drugs. Also, the study and establishment of metabolites of drugs plays an important role in establishing the mechanism of action of the drug and allows to predict the possible side effects [1-3].

The pharmaceutical industry, along with synthetic chemists for over 150 years, has been involved in the creation of diverse organic molecules with pronounced pharmacological properties [4-6]. 1,2,4-Triazole derivatives are a prime example of this trend [7-11]. The range of use of molecules containing this nucleus is very wide [12-14]. In our previous studies, the potential substances of potassium 2-((4-amino-5-(morfolinometil)-4H-1,2,4-triazol-3-yl)thio)acetate (PKR-173) as a hepatoprotector and antioxidant was noted [15, 16]. Therefore, the purpose of this work is to study the pharmacokinetic parameters and possible metabolites of this substance by intragastric introduction to rats.

MATERIAL AND METHOD

The starting material of potassium 2-((4-amino-5-(morfolinometyl)-4H-1,2,4-triazol-3-yl)thio)acetate (PKR-173) was synthesized and standardized by the methods described previously [17, 18]. All studies were approved by the Bioethics Committee of Zaporizhzhya State Medical University (protocol № 1 of 10/01/2019).

Biological part

The studies were performed on pubescent white nonlinear rats (Wistar) of both sexes weighing 107-246 g. The rats were obtained from the nursery of the State Institution of Pharmacology and Toxicology (Academy of Medical Sciences of Ukraine). During the experiment, the animals were restricted from food access and water was not restricted. A substance of potassium 2-((4-amino-5-(morfolinometyl)-4H-1,2,4-triazol-3-yl)thio)acetate (PKR-173) was orally administered in an isotonic solution using a rigid probe. Rats were removed from the experiment by anesthesia with diethyl ester and blood was collected from aortic bifurcation. The blood was centrifuged, serum was isolated. A number of parameters have been calculated to evaluate the pharmacokinetic properties of PKR-173.

The area under the pharmacokinetic curve "concentration-time" (AUC) is the main pharmacokinetic parameter characterizing the bioavailability of a medicinal product and is calculated by the formula:

$$AUC = \frac{C_1}{2} * \Delta t_1 + \frac{C_1 + C_2}{2} * \Delta t_2 + \frac{C_2 + C_3}{2} * \Delta t_3 + \dots + AUC_{rem} (\text{mg} * \text{h/L})$$

where, **AUCrem** - is the ratio of the last determination of the compound concentration to the elimination constant.

Apparent clearance (CL) reflects a volume of serum from which drug is completely removed per unit of time, where (D) represents the Dose:

$$CL = \frac{D}{AUC} (\text{ml/h})$$

Elimination rate constant (K), characterizing the decrease in the concentration of the drug at the end of the pharmacokinetic curve:

$$K = \frac{\ln \frac{C_{max}}{C_{rem}}}{T_{rem} - T_{max}} (\text{h}^{-1})$$

where, C_{max} and T_{max} - are the maximum concentration and time of this determination;

C_{rem} and T_{rem} - recent concentration and study time values.

Volume of distribution (VT), is the theoretical volume that would be necessary to contain the total amount of an administered drug at the same concentration that it is observed in the blood plasma:

$$V_T = \frac{CL}{K} (\text{ml})$$

Biological half-life ($t_{1/2}$), showing the time during which the concentration of the test substance in the blood is halved:

$$t_{1/2} = \frac{\ln 2}{K} (h)$$

Chromatographic conditions

Separations were carried out using an Agilent 1260 Infinity HPLC System (Agilent Technologies, Germany) system consisting of a degasser, binary pump, autosampler, thermostat column compartment, and diode array detector. Data acquisition was performed using the Open LAB CDS Software. The column was ZORBAX RX-SIL (50 × 4.6, 1.8 μm). The column temperature was maintained at 40 °C. The mobile phase consisted of 70% acetonitrile (0.1% HCOOH): 30% H₂O (100mM HCOONH₄). The flow rate of the mobile phase was 0.400 ml/min.

The injected volume was 20 μl for metabolite identification and 2 μl for pharmacokinetics study.

Mass spectrometry conditions

Agilent 6120 single quadrupole mass spectrometer with ionization in electrospray (ESI) was utilized. Scanning was performed in the range of m/z 100-1000 for metabolite identification. SIM mode for pharmacokinetics study was at m/z 274 and m/z 547. The MS "fragmentor" voltage was 10V with positive polarity. Drying gas temperature was 300 °C. Nebulizer pressure was 40 psi. Drying gas flow rate was 10l/min.

Sample preparation

For analyses, 100 μl of plasma sample was added to 2.0-mL Eppendorf polypropylene centrifuge micro-tube. Then, 1 ml of methanol was added to the tube. Tube was mixed. After, 20 μl of 60% perchloric acid was added, it was shaken on a vortex mixer for 1 minute, and ultrasonicated for 3 minutes. The mixture was centrifuged for 10 minutes at 15000 g. Supernatant was injected to LC-MS.

RESULT AND DISCUSSION

The biological part

Determination of the concentration of PKR-173 was carried out for 24 hours, and the preliminary determination time was calculated from the logarithm 24 on the basis of 10 at an interval of 0,5 (Table 1).

Table 1. Calculation of the time of blood collection after administration of potassium 2-((4-amino-5-(morfolinometyl)-4*H*-1,2,4-triazol-3-yl)thio)acetate

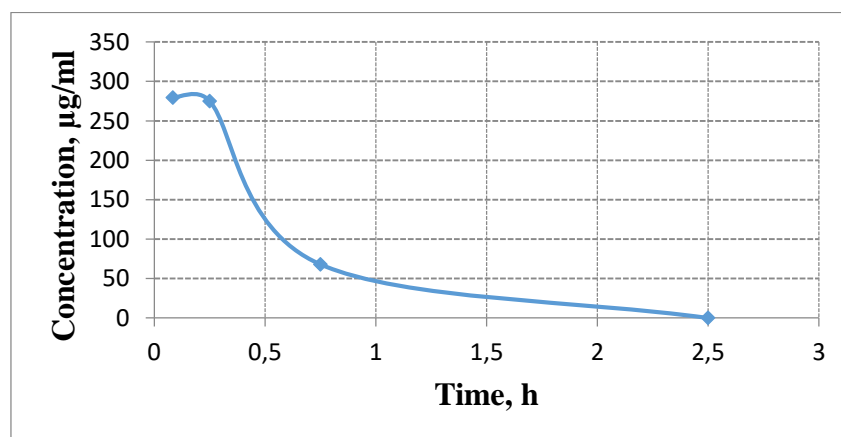
Time	24					
lg ₁₀ (hour)	1,38	0,88	0,38	-0,12	-0,62	-1,12
10 ^{log₁₀(hour)} , hour	24	7,59	2,4	0,76	0,24	0,08

Since the time intervals are too small, a logarithmic scale was used. Thus, based on the data obtained, the determination of the concentration of potassium 2-((4-amino-5-(morfolinometyl)-4*H*-1,2,4-triazol-3-yl)thio)acetate in serum was performed for 0.08 (5 min), 0.25 (15 min), 0.75 (45 min), 2.5, 7.5, 13.5 and 24 hours.

In this way, as a result of the study, it was found that in the serum of rats the maximum concentration of the administered substance was reached almost immediately after the introduction, namely for 5 min with an average value at the level of 279,67 µg/ml (Table 2).

Table 2. Concentration of potassium 2-((4-amino-5-(morfolinometyl)-4*H*-1,2,4-triazol-3-yl)thio) acetate in blood, µg/ml

C, µg/ml	279,6703	275,2029	68,04355	0	0	0	0
Time, h	0,08	0,25	0,75	2,5	7,5	13,5	24

**Figure 1.** The concentration of potassium 2-((4-amino-5-(morfolinometyl)-4*H*-1,2,4-triazol-3-yl)thio)acetate in the blood depending on time

As a result of the experiment, the arithmetic mean values of the potassium concentration of 2-((4-amino-5-(morfolinometyl)-4*H*-1,2,4-triazol-3-yl)thio)acetate in the blood of rats were determined. Thus, from the data given in table 2 and figure 1, it was shown that the maximum concentration of the test compound was observed as early as 5 minutes after its administration to animals. Thereafter, the concentration decreases mono-exponentially, indicating that the distribution and elimination occur at the

same rate. The main pharmacokinetic parameters calculated from the concentration of compound in plasma of rats over time (Table 3) show a low serum half-life ($t_{1/2} = 0.32$ hours). The area under the pharmacokinetic curve is $AUC = 150.8998 \mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{ml}$.

Table 3. Pharmacokinetic parameters of the substance potassium 2-((4-amino-5- (morfolinometyl)-4*H*-1,2,4-triazol-3-yl)thio) acetate

Indicator	Value
AUC, $\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{ml}$.	150,8998
AUCrem	32,25353
$\ln(C_{\text{max}}/C_{\text{rem}})$	1,413463
K, h ⁻¹	2,109647
$t_{1/2}$, h	0,328561
CL, ml/h	1,086814
VT, l/kg	0,515164

Chromatographic studies

Subsequently, for the determination of possible metabolites of potassium 2-((4-amino-5- (morfolinometyl)-4*H*-1,2,4-triazol-3-yl)thio)acetate, a chromatographic study was performed by liquid plasma chromatography of rats. Thus, on the chromatogram obtained at the 5th minute of the introduction of the compound there is a peak with a retention time of 2.008 min. In the mass spectrum of this peak there is a pseudo-molecular ion with a mass of 288.2 m/z. (Figure 2).

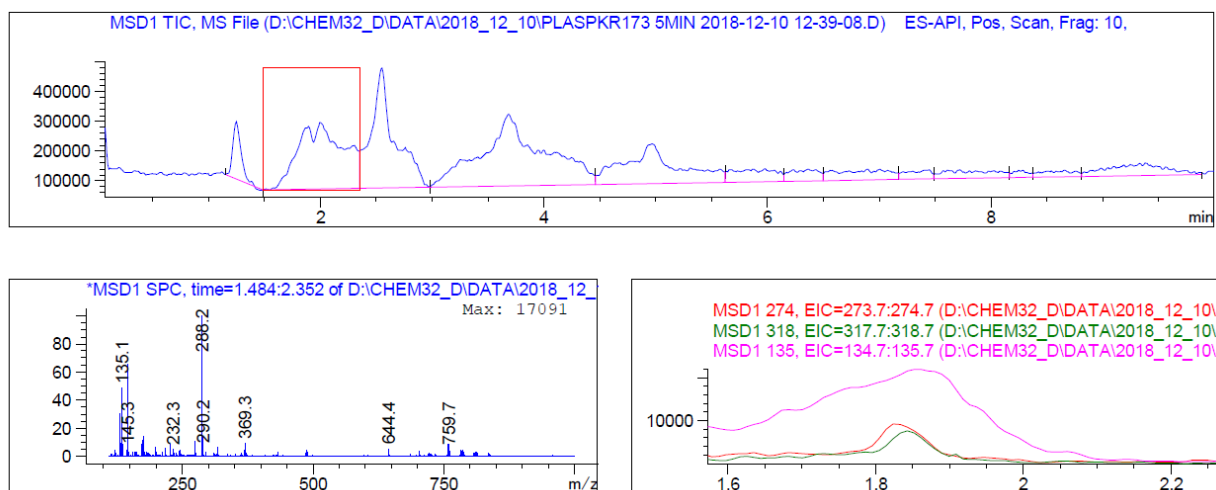


Figure 2. Chromatogram and mass spectrum of rat plasma with potassium 2-((4-amino-5- (morfolinometyl)-4*H*-1,2,4-triazol-3-yl)thio)acetate (5 min).

Further exploring possible metabolites, it should be noted, that the chromatogram obtained after 15 min. introduction of the test substance there is contained an identical peak at 2.012 min. In the mass spectrum, there is a molecular ion with a mass of 288.1 m/z. (Figure 3).

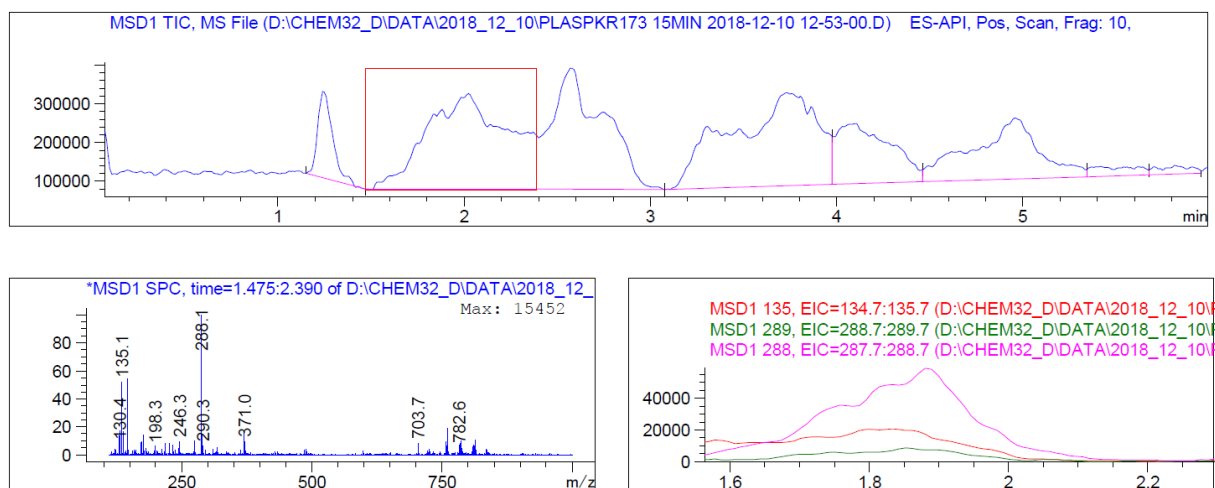


Figure 3. Chromatogram and mass spectrum of rat plasma with potassium 2-((4-amino-5-(morpholinomethyl)-4H-1,2,4-triazol-3-yl)thio)acetate (15 min).

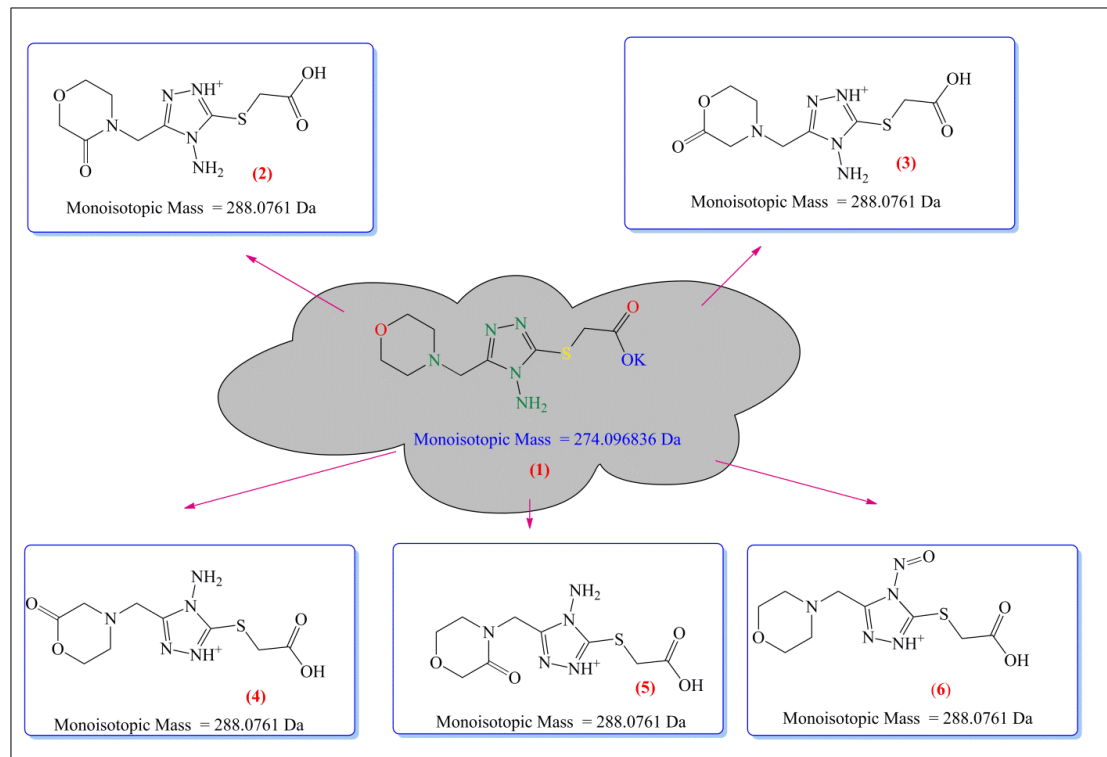


Figure 4. Scheme of formation of possible metabolites of potassium 2-((4-amino-5-(morpholinomethyl)-4H-1,2,4-triazol-3-yl)thio)acetate compound

The data obtained from chromatographic studies allowed us to determine the probable structures of metabolites based on obtaining the values of their molecular weights (m/z) (Figure 4) such as:

- 4-amino-5-((carboxymethyl)thio)-3-((3-oxomorpholino)methyl)-4*H*-1,2,4-triazol-1-ium(2),
- 4-amino-5 ((carboxymethyl)thio)-3-((2-oxomorpholino)methyl)-4*H*-1,2,4-triazol-1-ium(3),
- 4-amino-5-((carboxymethyl)thio)-3-((2-oxomorpholino)methyl)-4*H*-1,2,4-triazol-1-ium(4),
- 4-amino-5-((carboxymethyl)thio)-3-((3-oxomorpholino)methyl)-4*H*-1,2,4-triazol-1-ium(5),
- 5-((carboxymethyl)thio)-3-(morpholinomethyl)-4-nitroso-4*H*-1,2,4-triazol-1-ium (6).

In conclusion, the study of the pharmacokinetic parameters of potassium 2-((4-amino-5-(morpholinomethyl)-4*H*-1,2,4-triazol-3-yl)thio)acetate (PKR-173) by intragastric introduction to rats was held. The serum half-life of named substance is established ($t_{1/2} = 0.32$ hours). Based on the obtained chromatograms and mass spectra, possible metabolites of potassium 2-((4-amino-5-(morpholinomethyl)-4*H*-1,2,4-triazol-3-yl) thio) acetate (PKR-173) during intragastric introduction to rats were determined.

REFERENCES

1. Gerry, C. J., Schreiber, S. L. (2018). Chemical Probes And Drug Leads From Advances In Synthetic Planning And Methodology. *Nature Reviews Drug Discovery*, 17(5), 333.
2. Blumenthal, G. M., Goldberg, K. B., Pazdur, R. (2017). Drug development, trial design, and endpoints in oncology: adapting to rapidly changing science. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, 101(5), 572-574.
3. Mohs, R. C., Greig, N. H. (2017). Drug discovery and development: Role of basic biological research. *Alzheimer's & Dementia: Translational Research & Clinical Interventions*, 3(4), 651-657.
4. Shcherbyna, R. O. (2014). Pharmacological Activity Analysis Of The 1,2,4-Triazole Derivatives. *Pharmaceutical Journal*, (4), 145-150.
5. Kumar, R., Yar, M. S., Chaturvedi, S., Srivastava, A. (2013). Triazole as pharmaceuticals potentials. *Inter J Pharm Tech Res*, 5(4), 1844-1869.
6. Peyton, L. R., Gallagher, S., Hashemzadeh, M. (2015). Triazole antifungals: a review. *Drugs Today (Barc)*, 51(12), 705-718.
7. Bushueva, I., Parchenko, V., Shcherbyna, R., Safonov, A., Kaplaushenko, A., Gutyj, B., Hariv, I. (2017). Tryfuzol-New Original Veterinary Drug. *J. Fac. Pharm. Ankara/Ankara Ecz. Fak. Derg*, 41(1), 42-49.
8. Shcherbyna, R. O., Danilchenko, D. M., Parchenko, V. V., Panasenko, O. I., Knysh, E. H., Hromyh, N. A., Lyholat, Y. V. (2017). Studying Of 2-((5-R-4-R-1-4*H*-1,2,4-triazole-3-yl)thio)acetic Acid Salts Influence On Growth And Progress Of Blackberries (KIOWA Variety) Propagules. *Research Journal of Pharmaceutical Biological and Chemical Sciences*, 8(3), 975-979.

9. Hulina, Y.S., Kaplaushenko, A. G. (2018). Synthesis, Physicochemical Properties And Further Transformations In The Series 5-((1H-tetrazol-1-yl)methyl)-4-R-4H-1,2,4-triazol-3-thiols. *Biopharmaceutical Journal*, 10 (1), 26-30.
10. Samelyuk, Y. G., Kaplaushenko, A. G. (2014). Synthesis of 3-alkylthio(sulfo)-1,2,4-triazoles, Containing methoxyphenyl substituents at C5atoms, Their antipyretic activity, Propensity to adsorption and acute toxicity. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, 6(5), 1117-1121.
11. Keri, R. S., Patil, S. A., Budagumpi, S., Nagaraja, B. M. (2015). *Triazole: a promising antitubercular agent*. *Chemical biology & drug design*, 86(4), 410-423.
12. Shcherbyna, R., Parchenko, V., Martynyshyn, V., Hunchak, V. (2018). Evaluation Of Acute And Subacute Toxicity Of Oil Liniment Based On 4-((5-(Decylthio)-4-methyl-4H-1,2,4-triazol-3-yl)methyl)morpholine. *J. Fac. Pharm. Ankara/Ankara Ecz. Fak. Derg*, 42 (1), 43-52. Retrieved from <http://dergipark.gov.tr/jfpanu/issue/42653/514314>.
13. Safonov, A. A. (2018). Derivatives of 3-(alkylthio)-5-(thiophen-2-ylmethyl)-4H-1, 2, 4-triazol-4-amines as Anti-fatigue Substances. *Indonesian Journal of Pharmacy/Majalah Farmasi Indonesia*, 29(3).
14. Küçükgülzel, Ş. G., Çıkla-Süzgün, P. (2015). Recent advances bioactive 1,2,4-triazole-3-thiones. *European journal of medicinal chemistry*, 97, 830-870.
15. Shcherbyna, R., Vashchyk, Y. (2019). The Research Of 1,2,4-Triazole Derivatives Hepatoprotective Activity Under Tetracycline And Infectious Hepatitis. *Journal of Faculty of Pharmacy of Ankara University*, 43 (2), 135-146 . DOI: 10.33483/jfpau.487173
16. Shcherbyna, R.O., Vashchyk, Y.V. (2018). Histological study of potassium 2-((4-amino-5-(morpholinomethyl)-4H-1, 2, 4-triazole-3-yl)thio)acetate (PKR-173) corrective influence on the chickens liver state in the condition of tetracycline hepatitis. *Zaporožskij Medicinskij Žurnal*, 3, 404-412.
17. Shcherbyna, R., Parchenko, V., Varynskyi, B., Kaplaushenko, A. (2019). The development of HPLC-DAD method for determination of active pharmaceutical ingredient in the potassium 2-((4-amino-5-(morpholinomethyl)-4H-1, 2, 4-triazol-3-yl) thio) acetate substance. *Current Issues in Pharmacy and Medical Sciences*, 32(1), 5-9.
18. Shcherbyna, R. O. (2017). Synthesis, physical and chemical properties of 2-((4-R-3-(morfolinomethylen)-4H-1,2,4-triazole-5-yl)thio)acetic acid salts. *Current Issues in Pharmacy and Medicine: Science and Practice*, 10 (1), 4-8.



METHOD OF SYNTHESIS NOVEL N'-SUBSTITUTED- 2-((5-(THIOPHEN-2-YLMETHYL)-4H-1,2,4-TRIAZOL-3-YL)THIO) ACETOHYDRAZIDES

YENİ N'-SÜBSTİTÜE-2-((5-(TİYOFEN-2-İLMETİL)-4H-1,2,4-TRİAZOL-3-İL)TİYO)
ASETOHİDRAZİTLERİN SENTEZ YÖNTEMİ

Andrii A. SAFONOV*

Zaporizhzhia State Medical University, Faculty of Pharmacy, Department of Natural Sciences for
Foreign Students and Toxicological Chemistry, Ukraine

ABSTRACT

Objective: The purpose of this work is to synthesize new series of N'-substituted-2-((5-(thiophen-2-ylmethyl)-4H-1,2,4-triazol-3-yl)thio)acetohydrazides.

Material and Method: The compound (3) (2-((3-(thiophen-2-ylmethyl)-1H-1,2,4-triazol-5-yl)thio)acetohydrazide) was synthesized by adding hydrazine hydrate to isopropyl 2-((3-(thiophen-2-ylmethyl)-1H-1,2,4-triazol-5-yl)thio)acetate (1) and refluxed for 3-4 h in propan-2-ol. Synthesis of (5a-s) (N'-substituted-2-((3-(thiophen-2-ylmethyl)-1H-1,2,4-triazol-5-yl)thio)acetohydrazide) was carried out by adding aromatic or heterocyclic aldehyde to 2-((3-(thiophen-2-ylmethyl)-1H-1,2,4-triazol-5-yl)thio)acetohydrazide (3) in acetic acid. The structure of synthesized compounds is confirmed using Elemental analysis (CHNS), ¹H-NMR and Chromatographic mass spectral analysis.

Result and Discussion: The compound (3) was synthesized by adding hydrazine hydrate to compound (1) and compound (3) characterized by ¹H-NMR peak, as a singlet due to (NH₂) at δ=2.01ppm. Synthesis of (5a-s) was carried out by adding aromatic or heterocyclic aldehyde to compound (3) in acetic acid. The signals of ¹H NMR for (5a-s) are consented with the proposed structure. The elemental analysis (CHNS) was accomplished for synthesized compounds to confirm their basic chemical structures and revealed acceptable agreement with the calculated percentages.

Keywords: ¹H-NMR, heterocyclic compounds, synthesis, 1,2,4-triazole

ÖZ

Amaç: Bu çalışmanın amacı, bir seri yeni N'-süstitüe-2-((5-(tiyofen-2-ilmetil)-4H-1,2,4-triazol-3-il)tiyo)asetohidrazit sentezlemektir.

Gereç ve Yöntem: Bileşik (3) (2-((3-(tiyofen-2-ilmetil)-1H-1,2,4-triazol-5-il)tiyo)asetohidrazit), izopropil 2-((3-(tiyofen-2-ilmetil)-1H-1,2,4-triazol-5-il)tiyo)asetat (1)'e hidrazin hidrat ilave edilerek sentezlenmiş ve

* **Corresponding Author / Sorumlu Yazar:** Andrii A. Safonov
e-mail / e-posta: 8safonov@gmail.com

propan-2-ol içerisinde 3-4 saat geri çeviren soğutucuda bekletilmiştir. Bileşikler (5a-s) (N'-süstitüe-2-((3-(tiyofen-2-ilmetil)-1H-1,2,4-triazol-5-il)tiyo)asetohidrazit), 3-(tiyofen-2-ilmetil)-1H-1,2,4-triazol-5-il)tiyo)asetohidrazit (3) aromatik veya heterosiklik aldehit ilave edilerek sentezlenmiştir. Çözücü olarak asetik asit kullanılmıştır. Sentezlenen bileşiklerin yapısı, Elementel analiz (CHNS), ¹H-NMR ve Kromatografik kütle spektral analizi kullanılarak doğrulanmıştır.

Sonuç ve Tartışma: *Bileşik (3), Bileşik (1)'e hidrazin hidrat ilave edilerek sentezlenmiş ve NH = 2,01 ppm'de (NH₂) nedeniyle bir singlet formunda ¹H-NMR pik ile karakterize edilmiştir. Bileşikler (5a-s), Bileşik (3)'e aromatik veya heterosiklik aldehit ilave edilerek asetik asit ortamda sentezlenmiştir. Bileşikler (5a-s) için önerilen yapı, ¹H-NMR sinyalleri ile doğrulanmıştır. Temel kimyasal yapılarını doğrulamak için sentezlenen bileşikler üzerinde elementel analiz (CHNS) yapılmış ve hesaplanan yüzdelere kabul edilebilir bir uyum sağladığı gösterilmiştir.*

Anahtar Kelimeler: *¹H-NMR, heterosiklik bileşikler, sentez, 1,2,4-triazol*

INTRODUCTION

The search for means to combat diseases was conducted throughout the history of human existence. However, if in the past medical preparations were made, as a rule, from substances of animal and vegetable origin, today the achievements in the field of synthetic organic chemistry are used for the production of medicines.

Modern science is linked to the creation of the necessary synthetic drugs [1, 2, 3]. As a result, it is possible to treat many diseases that were previously considered incurable or fatal [4, 5].

Synthetic drugs in modern medicine are an important, dominant group. Substances that receive synthetically contain less impurities than the extract from the plant material. Chemical preparations are subject to higher requirements than herbal preparations. A more rigorous assessment shall be made of their medicinal properties and the conditions of use.

Synthesis of 1,2,4-triazole derivatives is a promising direction for the creation of new substances [6, 7, 8] with different types of biological activity [9, 10, 11].

The aim of the work was to synthesize and to confirm structure of N'-substituted -2-((5-(thiophen-2-ylmethyl)-4H-1,2,4-triazol-3-yl)thio)acetohydrazides.

MATERIAL AND METHOD

Chemicals

The initial compounds isopropyl 2-((3-(thiophen-2-ylmethyl)-1H-1,2,4-triazol-5-yl)thio)acetate and (1) were synthesized at the Department of Toxicological and Inorganic Chemistry of the Zaporizhzhya State Medical University (Ukraine) and purified by recrystallization with content of the main component $\geq 98\%$ [12]. The hydrazine hydrate (assay- 50-60%), acetic acid (99%), benzaldehyde (99.5%), 2-bromobenzaldehyde (98%), 2-chlorobenzaldehyde (99%), 4-chlorobenzaldehyde (97%), 4-fluorobenzaldehyde (98%), 2-hydroxybenzaldehyde (98%), 4-hydroxybenzaldehyde (98%), 3-methoxybenzaldehyde (98%), 2-nitrobenzaldehyde (98%), 3-nitrobenzaldehyde (98%), 4-

(dimethylamino)benzaldehyde (99%), 2,4-dimethylbenzaldehyde (90%), 2,3-dimethoxybenzaldehyde (98%), 3,4-dimethoxybenzaldehyde (99%), 3,5-dimethoxybenzaldehyde (98%), 3-bromo-4-fluorobenzaldehyde (98%), nicotinaldehyde (98%), thiophene-2-carbaldehyde (95%), 5-nitrofuran-2-carbaldehyde (90%) and 2-propanol (99,5%) were obtained from SIGMA-ALDRICH (Germany).

All chemicals and solvents used during synthesis were of analytical grade and used without further purification.

Equipment

The melting temperature was determined on an automatic melting device OptiMelt Stanford Research Systems MPA100 (US production). The elemental analysis of the compounds is installed on the elemental analyzer Elementar Vario L cube (CHNS) (standard - sulfanilamide) (Analysensysteme GmbH, Germany). Chromatographic mass spectral studies were performed on Agilent 1260 Infinity HPLC liquid chromatograph equipped with an Agilent 6120 mass spectrometer (ionization in an electric spray (ESI) (US production), $^1\text{H-NMR}$ spectra were recorded on a Mercury 400 spectrometer (Umatek International Inc.), DMSO- d_6 solvent, internal standard - tetramethylsilane and deciphered using the ADVASP 143 computer program. The synthetic method is outlined in scheme 1 [13, 14, 15].

Chemical Synthesis

General method for synthesis of 2-((3-(thiophen-2-ylmethyl)-1H-1,2,4-triazol-5-yl)thio)acetohydrazide (3)

A mixture of isopropyl 2-((3-(thiophen-2-ylmethyl)-1H-1,2,4-triazol-5-yl)thio)acetate (1) (0.1 mol) and hydrazine hydrate (0.15 mol) (2) were dissolved in 250 ml propan-2-ol in a round bottom flask and refluxed for 3-4 h. After completion of the reaction, the mixture was evaporated. The residue obtained was dried, recrystallized from propan-2-ol.

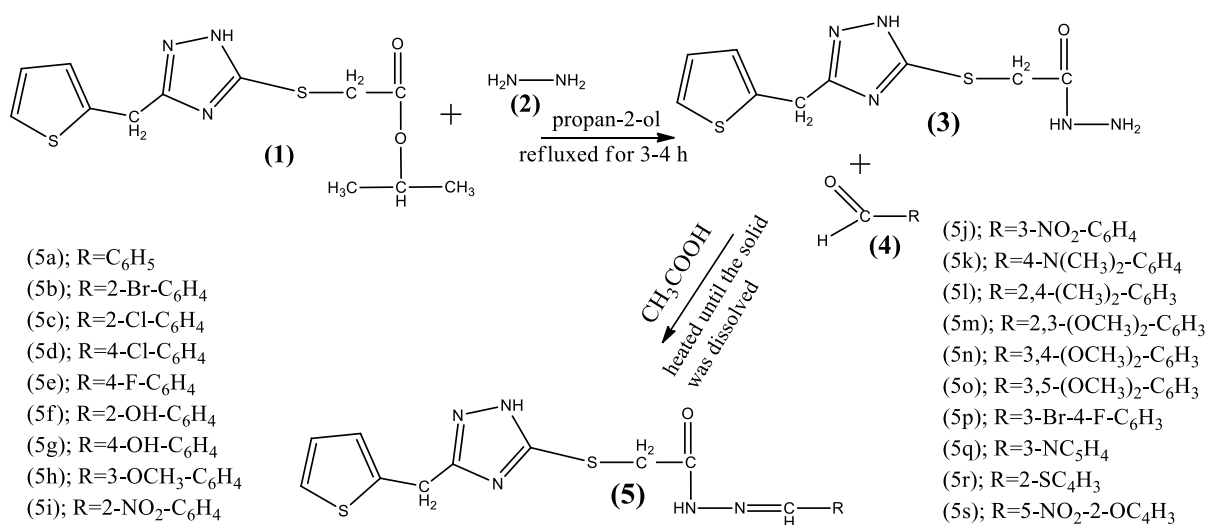
2-((3-(Thiophen-2-ylmethyl)-1H-1,2,4-triazol-5-yl)thio)acetohydrazide (3)

Bright yellow powder; yield 72%; m.p. 124-126°C ; $^1\text{HNMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6 , δ =ppm): 13.51 (1H, s, NH); 8.02 (1H, s, NH); 7.31(1H, d, thiophen-H); 6.87 (1H, t, thiophen-H); 6.72 (1H, d, thiophen-H); 3.69 (2H, s, CH₂); 3.50 (2H, s, CH₂); 2.01 (2H, s, NH₂); CHNS elemental analysis Calcd. for (C₉H₁₁N₅O₂S): found C% 40.10, H% 4.10, N% 26.05, S% 23.79; calculated C% 40.13, H% 4.12, N% 26.00, S% 23.81. Peak of a pseudo-molecular ion [MH]⁺ 270.

Synthesis of titled compounds (5a-5s)

A mixture of 2-((3-(thiophen-2-ylmethyl)-1H-1,2,4-triazol-5-yl)thio)acetohydrazide (3) (0.01 mol, 2.69g) and aromatic or heterocyclic aldehyde (4) (0.01 mol): benzaldehyde (1.06g) or 2-bromobenzaldehyde (1.85g) or 2-chlorobenzaldehyde (1.40g) or 4-chlorobenzaldehyde (1.40g) or 4-fluorobenzaldehyde (1.24g) or 2-hydroxybenzaldehyde (1.22g) or 4-hydroxybenzaldehyde (1.22g) or 3-

methoxybenzaldehyde (1.36g) or 2-nitrobenzaldehyde (1.51g) or 3-nitrobenzaldehyde (1.51g) or 4-(dimethylamino)benzaldehyde (1.49g) or 2,4-dimethylbenzaldehyde (1.34g) or 2,3-dimethoxybenzaldehyde (1.66g) or 3,4-dimethoxybenzaldehyde (1.66g) or 3,5-dimethoxybenzaldehyde (1.66g) or 3-bromo-4-fluorobenzaldehyde (2.01g) or nicotinaldehyde (1.07g) or thiophene-2-carbaldehyde (1.12g) or 5-nitrofuran-2-carbaldehyde (1.41g) in concentrated acetic acid was heated until the solid was dissolved. After cooling the residue was formed and washed by diethyl ether, filtered and dried, then recrystallized from acetic acid.



Scheme 1: Synthesis of 1,2,4-triazole derivatives 3-5s

N'-Benzylidene-2-((3-(thiophen-2-ylmethyl)-1H-1,2,4-triazol-5-yl)thio)acetohydrazide (5a)

Yellow powder; yield 70%; m.p. 56-58°C; ¹HNMR (400 MHz, DMSO-d₆, δ=ppm): 13.52 (1H, s, NH); 8.81 (1H, s, CH), 8.04 (1H, s, NH); 7.81 (2H, d, Ar-H), 7.51 (3H, m, Ar-H), 7.30 (1H, d, thiophen-H); 6.86 (1H, t, thiophen-H); 6.71 (1H, d, thiophen-H); 3.78 (2H, s, CH₂); 3.59 (2H, s, CH₂); CHNS elemental analysis Calcd. for (C₁₆H₁₅N₅O₂S₂): found C% 53.70, H% 4.21, N% 19.56, S% 17.96; calculated C% 53.76, H% 4.23, N% 19.59, S% 17.94. Peak of a pseudo-molecular ion [MH]⁺ 358.

N'-(2-Bromobenzylidene)-2-((3-(thiophen-2-ylmethyl)-1H-1,2,4-triazol-5-yl)thio)acetohydrazide (5b)

Orange powder; yield 79%; m.p. 114-116°C; ¹HNMR (400 MHz, DMSO-d₆, δ=ppm): 13.50 (1H, s, NH); 8.75 (1H, s, CH), 8.06 (1H, s, NH); 7.81 (1H, d, Ar-H), 7.57 (1H, d, Ar-H), 7.34 (m, 1H, thiophen-H, 2H, Ar-H); 6.85 (1H, t, thiophen-H); 6.71 (1H, d, thiophen-H); 3.79 (2H, s, CH₂); 3.61 (2H, s, CH₂); CHNS elemental analysis Calcd. for (C₁₆H₁₄BrN₅O₂S₂): found C% 44.12, H% 3.25, N% 16.09, S% 14.72; calculated C% 44.04, H% 3.23, N% 16.05, S% 14.70. Peak of a pseudo-molecular ion [MH]⁺ 437.

N'-(2-Chlorobenzylidene)-2-((3-(thiophen-2-ylmethyl)-1H-1,2,4-triazol-5-yl)thio)acetohydrazide (5c)

Yellow powder; yield 74%; m.p. 161-163°C ; ¹HNMR (400 MHz, DMSO-d₆, δ=ppm): 13.51 (1H, s, NH); 8.72 (1H, s, CH), 8.02 (1H, s, NH); 7.80 (1H, d, Ar-H), 7.51 (1H, d, Ar-H), 7.30 (m, 1H, thiophen-H, 2H, Ar-H); 6.89 (1H, t, thiophen-H); 6.71 (1H, d, thiophen-H); 3.85 (2H, s, CH₂); 3.58 (2H, s, CH₂); CHNS elemental analysis Calcd. for (C₁₆H₁₄ClN₅O₂S₂) : found C% 49.12, H% 3.63, N% 17.91, S% 16.39; calculated C% 49.04, H% 3.60, N% 17.87, S% 16.36. Peak of a pseudo-molecular ion [MH]⁺ 393.

N'-(4-Chlorobenzylidene)-2-((3-(thiophen-2-ylmethyl)-1H-1,2,4-triazol-5-yl)thio)acetohydrazide (5d)

Bright yellow powder; yield 79%; m.p. 189-191°C ; ¹HNMR (400 MHz, DMSO-d₆, δ=ppm): 13.56 (1H, s, NH); 8.81 (1H, s, CH), 7.99 (1H, s, NH); 7.80 (2H, d, Ar-H), 7.52 (2H, d, Ar-H), 7.38 (d, 1H, thiophen-H); 6.86 (1H, t, thiophen-H); 6.71 (1H, d, thiophen-H); 3.65 (2H, s, CH₂); 3.52 (2H, s, CH₂); CHNS elemental analysis Calcd. for (C₁₆H₁₄ClN₅O₂S₂) : found C% 49.12, H% 3.62, N% 17.89, S% 16.38; calculated C% 49.04, H% 3.60, N% 17.87, S% 16.36. Peak of a pseudo-molecular ion [MH]⁺ 393.

N'-(4-Fluorobenzylidene)-2-((3-(thiophen-2-ylmethyl)-1H-1,2,4-triazol-5-yl)thio)acetohydrazide (5e)

Yellow powder; yield 76%; m.p. 166-168°C ; ¹HNMR (400 MHz, DMSO-d₆, δ=ppm): 13.48 (1H, s, NH); 8.88 (1H, s, CH), 8.00 (1H, s, NH); 7.76 (2H, d, Ar-H), 7.48 (2H, d, Ar-H), 7.32 (d, 1H, thiophen-H); 6.80 (1H, t, thiophen-H); 6.62 (1H, d, thiophen-H); 3.71 (2H, s, CH₂); 3.52 (2H, s, CH₂); CHNS elemental analysis Calcd. for (C₁₆H₁₄FN₅O₂S₂): found C% 51.25, H% 3.78, N% 18.68, S% 17.12; calculated C% 51.19, H% 3.76, N% 18.65, S% 17.08. Peak of a pseudo-molecular ion [MH]⁺ 376.

N'-(2-Hydroxybenzylidene)-2-((3-(thiophen-2-ylmethyl)-1H-1,2,4-triazol-5-yl)thio)acetohydrazide (5f)

Yellow powder; yield 69%; m.p. 188-190°C ; ¹HNMR (400 MHz, DMSO-d₆, δ=ppm): 13.53 (1H, s, NH); 8.78 (1H, s, CH), 7.96 (1H, s, NH); 7.68 (1H, d, Ar-H), 7.51 (1H, t, Ar-H), 7.34 (d, 1H, thiophen-H); 7.11 (2H, m, Ar-H), 6.89 (1H, t, thiophen-H); 6.71 (1H, d, thiophen-H); 5.41 (1H, s, OH); 3.95 (2H, s, CH₂); 3.67 (2H, s, CH₂); CHNS elemental analysis Calcd. for (C₁₆H₁₅N₅O₂S₂) : found C% 51.37, H% 4.03, N% 18.69, S% 17.13; calculated C% 51.46, H% 4.05, N% 18.75, S% 17.17. Peak of a pseudo-molecular ion [MH]⁺ 374.

N'-(4-Hydroxybenzylidene)-2-((3-(thiophen-2-ylmethyl)-1H-1,2,4-triazol-5-yl)thio)acetohydrazide (5g)

Orange powder; yield 73%; m.p. 180-1820C ; ¹HNMR (400 MHz, DMSO-d₆, δ=ppm): 13.54 (1H, s, NH); 8.38 (1H, s, CH); 8.03 (1H, s, NH); 7.74 (2H, d, Ar-H), 7.34 (d, 1H, thiophen-H); 6.89 (1H, t, thiophen-H); 6.71 (1H, d, thiophen-H); 6.59 (2H, m, Ar-H), 5.34 (1H, s, OH); 3.86 (2H, s, CH₂); 3.59 (2H, s, CH₂); CHNS elemental analysis Calcd. for (C₁₆H₁₅N₅O₂S₂) : found C% 51.52, H% 4.08, N% 18.81, S% 17.19; calculated C% 51.46, H% 4.05, N% 18.75, S% 17.17. Peak of a pseudo-molecular ion [MH]⁺ 374.

N'-(3-Methoxybenzylidene)-2-((3-(thiophen-2-ylmethyl)-1H-1,2,4-triazol-5-yl)thio)acetohydrazide (5h)

Yellow powder; yield 76%; m.p. 85-870C ; ¹HNMR (400 MHz, DMSO-d₆, δ=ppm): 13.51 (1H, s, NH); 8.54 (1H, s, CH); 8.05 (1H, s, NH); 7.57 (1H, s, Ar-H), 7.38 (m, 1H, thiophen-H, 2H, Ar-H); 7.06 (1H, d, Ar-H), 6.89 (1H, t, thiophen-H); 6.71 (1H, d, thiophen-H); 6.59 (2H, m, Ar-H), 5.34 (1H, s, OH); 3.86 (2H, s, CH₂); 3.64 (3H, s, CH₃) 3.59 (2H, s, CH₂); CHNS elemental analysis Calcd. for (C₁₇H₁₇N₅O₂S₂) : found C% 52.72, H% 4.45, N% 18.09, S% 16.57; calculated C% 52.69, H% 4.42, N% 18.07, S% 16.55. Peak of a pseudo-molecular ion [MH]⁺ 388.

N'-(2-Nitrobenzylidene)-2-((3-(thiophen-2-ylmethyl)-1H-1,2,4-triazol-5-yl)thio)acetohydrazide (5i)

Yellow powder; yield 72%; m.p. 124-1260C ; ¹HNMR (400 MHz, DMSO-d₆, δ=ppm): 13.50 (1H, s, NH); 8.57 (1H, s, CH), 8.09 (1H, s, NH); 7.94 (3H, m, Ar-H), 7.52 (1H, t, Ar-H), 7.35 (d, 1H, thiophen-H); 6.87 (1H, t, thiophen-H); 6.75 (1H, d, thiophen-H); 3.84 (2H, s, CH₂); 3.53 (2H, s, CH₂); CHNS elemental analysis Calcd. for (C₁₆H₁₄N₆O₃S₂) : found C% 47.99, H% 3.52, N% 20.84, S% 15.98; calculated C% 47.79, H% 3.53, N% 20.90, S% 15.91. Peak of a pseudo-molecular ion [MH]⁺ 403.

N'-(3-Nitrobenzylidene)-2-((3-(thiophen-2-ylmethyl)-1H-1,2,4-triazol-5-yl)thio)acetohydrazide (5j)

Orange powder; yield 70%; m.p. 98-1000C ; ¹HNMR (400 MHz, DMSO-d₆, δ=ppm): 13.52 (1H, s, NH); 8.61 (1H, d, Ar-H), 8.49 (1H, s, CH), 8.14 (2H, m, Ar-H), 8.00 (1H, s, NH); 7.74 (1H, t, Ar-H), 7.34 (d, 1H, thiophen-H); 6.87 (1H, t, thiophen-H); 6.72 (1H, d, thiophen-H); 3.88 (2H, s, CH₂); 3.51 (2H, s, CH₂); CHNS elemental analysis Calcd. for (C₁₆H₁₄N₆O₃S₂) : found C% 47.70, H% 3.53, N% 20.91, S% 15.96; calculated C% 47.75, H% 3.51, N% 20.88, S% 15.93. Peak of a pseudo-molecular ion [MH]⁺ 403.

N'-(4-Dimethylaminobenzylidene)-2-((3-(thiophen-2-ylmethyl)-1H-1,2,4-triazol-5-yl)thio)acetohydrazide (5k)

Orange powder; yield 78%; m.p. 121-1230C ; ¹HNMR (400 MHz, DMSO-d₆, δ=ppm): 13.54 (1H, s, NH); 8.55 (1H, s, CH), 7.92 (1H, s, NH); 7.45 (2H, d, Ar-H), 7.38 (d, 1H, thiophen-H); 6.89 (1H, t, thiophen-H); 6.81 (2H, d, Ar-H), 6.72 (1H, d, thiophen-H); 3.65 (2H, s, CH₂); 3.48 (2H, s, CH₂);

3.02 (6H, s, 2CH₃); CHNS elemental analysis Calcd. for (C₁₈H₂₀N₆O₅S₂) : found C% 53.91, H% 5.05, N% 20.99, S% 16.03; calculated C% 53.98, H% 5.03, N% 20.98, S% 16.01. Peak of a pseudo-molecular ion [MH]⁺ 401.

N'-(2,4-Dimethylbenzylidene)-2-((3-(thiophen-2-ylmethyl)-1H-1,2,4-triazol-5-yl)thio)acetohydrazide (5l)

Yellow powder; yield 68%; m.p. 106-108°C ; ¹HNMR (400 MHz, DMSO-d₆, δ=ppm): 13.45 (1H, s, NH); 8.88 (1H, s, CH), 8.00 (1H, s, NH); 7.78 (1H, d, Ar-H); 7.38 (d, 1H, thiophen-H); 7.05 (2H, s, Ar-H), 6.89 (1H, t, thiophen-H); 6.75 (1H, d, thiophen-H); 3.70 (2H, s, CH₂); 3.50 (2H, s, CH₂); 2.41 (3H, s, CH₃); 2.24 (3H, s, CH₃); CHNS elemental analysis Calcd. for (C₁₈H₁₉N₅O₅S₂) : found C% 56.12, H% 4.99, N% 18.20, S% 16.61; calculated C% 56.08, H% 4.97, N% 18.17, S% 16.64. Peak of a pseudo-molecular ion [MH]⁺ 386.

N'-(2,3-Dimethoxybenzylidene)-2-((3-(thiophen-2-ylmethyl)-1H-1,2,4-triazol-5-yl)thio)acetohydrazide (5m)

Yellow powder; yield 75%; m.p. 131-132°C ; ¹HNMR (400 MHz, DMSO-d₆, δ=ppm): 13.51 (1H, s, NH); 8.80 (1H, s, CH), 8.10 (1H, s, NH); 7.40 (1H, d, thiophen-H); 7.26 (1H, d, Ar-H); 7.08 (1H, d, Ar-H); 6.87 (m, 1H, thiophen-H, 1H, Ar-H); 6.71 (1H, d, thiophen-H); 3.74 (2H, s, CH₂); 3.52 (2H, s, CH₂); 3.44 (6H, s, CH₃); CHNS elemental analysis Calcd. for (C₁₈H₁₉N₅O₃S₂) : found C% 51.84, H% 4.57, N% 16.79, S% 15.40; calculated C% 51.78, H% 4.59, N% 16.77, S% 15.36. Peak of a pseudo-molecular ion [MH]⁺ 418.

N'-(3,4-Dimethoxybenzylidene)-2-((3-(thiophen-2-ylmethyl)-1H-1,2,4-triazol-5-yl)thio)acetohydrazide (5n)

Yellow powder; yield 79%; m.p. 167-169°C ; ¹HNMR (400 MHz, DMSO-d₆, δ=ppm): 13.56 (1H, s, NH); 8.72 (1H, s, CH); 8.02 (1H, s, NH); 7.59 (1H, s, Ar-H); 7.40 (1H, d, thiophen-H); 7.28 (1H, d, Ar-H); 6.87 (m, 1H, thiophen-H, 1H, Ar-H); 6.72 (1H, d, thiophen-H); 3.79 (2H, s, CH₂); 3.54 (2H, s, CH₂); 3.49 (6H, s, CH₃); CHNS elemental analysis Calcd. for (C₁₈H₁₉N₅O₃S₂) : found C% 51.87, H% 4.62, N% 16.81, S% 15.38; calculated C% 51.78, H% 4.59, N% 16.77, S% 15.36. Peak of a pseudo-molecular ion [MH]⁺ 418.

N'-(3,5-Dimethoxybenzylidene)-2-((3-(thiophen-2-ylmethyl)-1H-1,2,4-triazol-5-yl)thio)acetohydrazide (5o)

Yellow powder; yield 74%; m.p. 140-142°C ; ¹HNMR (400 MHz, DMSO-d₆, δ=ppm): 13.41 (1H, s, NH); 8.64 (1H, s, CH); 8.05 (1H, s, NH); 7.40 (1H, d, thiophen-H); 7.09 (2H, s, Ar-H); 6.87 (1H, t, thiophen-H); 6.72 (1H, d, thiophen-H); 6.53(s, 1H, Ar-H); 3.78 (2H, s, CH₂); 3.54 (2H, s, CH₂); 3.41 (6H, s, CH₃); CHNS elemental analysis Calcd. for (C₁₈H₁₉N₅O₃S₂) : found C% 51.74, H% 4.56, N% 16.76, S% 15.40; calculated C% 51.78, H% 4.59, N% 16.77, S% 15.36. Peak of a pseudo-molecular ion [MH]⁺ 418.

N'-(3-Bromo-4-fluorobenzylidene)-2-((3-(thiophen-2-ylmethyl)-1H-1,2,4-triazol-5-yl)thio)acetohydrazide (5p)

Bright orange powder; yield 68%; m.p. 148-1500C; ¹HNMR (400 MHz, DMSO-d₆, δ=ppm): 13.48 (1H, s, NH); 8.39 (1H, s, CH); 8,12 (1H, s, NH); 7.94 (1H, d, Ar-H); 7.74 (1H, m, Ar-H); 7.40 (1H, d, thiophen-H); 7.21 (1H, t, Ar-H); 6.83 (1H, t, thiophen-H); 6.70 (1H, d, thiophen-H); 3.84 (2H, s, CH₂); 3.69 (2H, s, CH₂); CHNS elemental analysis Calcd. for (C₁₆H₁₃BrFN₅O₅S₂) : found C% 42.36, H% 2.86, N% 15.44, S% 14.09; calculated C% 42.30, H% 2.88, N% 15.41, S% 14.11. Peak of a pseudo-molecular ion [MH]⁺ 455.

N'-(Pyridin-3-ylmethylene)-2-((3-(thiophen-2-ylmethyl)-1H-1,2,4-triazol-5-yl)thio)acetohydrazide (5q)

Yellow powder; yield 71%; m.p. 101-1030C; ¹HNMR (400 MHz, DMSO-d₆, δ=ppm): 13.61 (1H, s, NH); 9.09 (1H, s, Pyr-H); 8.74 (1H, d, Pyr-H); 8.53 (1H, s, CH); 8.30 (1H, d, Pyr-H); 8,01 (1H, s, NH); 7.54 (1H, t, Pyr-H); 7.32 (1H, d, thiophen-H); 6.87 (1H, t, thiophen-H); 6.72 (1H, d, thiophen-H); 3.98 (2H, s, CH₂); 3.69 (2H, s, CH₂); CHNS elemental analysis Calcd. for (C₁₅H₁₄N₆O₅S₂) : found C% 50.29, H% 3.91, N% 23.48, S% 17.92; calculated C% 50.26, H% 3.94, N% 23.43, S% 17.89. Peak of a pseudo-molecular ion [MH]⁺ 359.

2-((3-(Thiophen-2-ylmethyl)-1H-1,2,4-triazol-5-yl)thio)-N'-(thiophen-2-ylmethylene)acetohydrazide (5r)

Bright brown powder; yield 67%; m.p. 111-1130C; ¹HNMR (400 MHz, DMSO-d₆, δ=ppm): 13.50 (1H, s, NH); 8.24 (1H, s, CH); 8,09 (1H, s, NH); 7.84 (1H, d, thiophen-H); 7.59 (1H, d, thiophen-H); 7.34 (1H, d, thiophen-H); 7.11 (1H, t, thiophen-H); 6.82 (1H, t, thiophen-H); 6.70 (1H, d, thiophen-H); 3.71 (2H, s, CH₂); 3.53 (2H, s, CH₂); CHNS elemental analysis Calcd. for (C₁₄H₁₃N₅O₅S₃) : found C% 46.31, H% 3.61, N% 19.29, S% 26.49; calculated C% 46.26, H% 3.60, N% 19.27, S% 26.46. Peak of a pseudo-molecular ion [MH]⁺ 364.

N'-(5-Nitrofur-2-yl)methylene)-2-((3-(thiophen-2-ylmethyl)-1H-1,2,4-triazol-5-yl)thio)acetohydrazide (5s)

Brown powder; yield 74 %; m.p. 158-1600C; ¹HNMR (400 MHz, DMSO-d₆, δ=ppm): 13.55 (1H, s, NH); 8.44 (1H, s, CH); 7,92 (1H, s, NH); 7.59 (1H, d, Fur-H); 7.30 (1H, d, thiophen-H); 7.08 (1H, d, Fur-H); 6.80 (1H, t, thiophen-H); 6.68 (1H, d, thiophen-H); 3.84 (2H, s, CH₂); 3.62 (2H, s, CH₂); CHNS elemental analysis Calcd. for (C₁₄H₁₂N₆O₄S₂): found C% 42.92, H% 3.07, N% 21.47, S% 16.36; calculated C% 42.85, H% 3.08, N% 21.44, S% 16.39. Peak of a pseudo-molecular ion [MH]⁺ 394.

RESULT AND DISCUSSION

The compound (3) (2-((3-(thiophen-2-ylmethyl)-1*H*-1,2,4-triazol-5-yl)thio)acetohydrazide) was synthesized by adding hydrazine hydrate to compound (1) and refluxed for 3-4 h in propan-2-ol. Compound (3) characterized by ¹H-NMR peak, as a singlet due to (NH₂) at δ=2.01ppm.

Synthesis of (5a-s) was carried out by adding aromatic or heterocyclic aldehyde to compound (3) in acetic acid. It is known, that this reaction proceeds by the mechanism of nucleophilic attachment of an amine to an aldehyde or ketone carbon. The attachment of the nucleophile to the carbonyl compound proceeds through the bipolar ion, as a result unstable heme amino alcohol is synthesized, which dehydrates to the final product. The signals of ¹H-NMR for (5a-s) are consented with the proposed structure.

Analyzing the LS/MS chromatogram in the MS spectrum there are molecular peaks with a value of 270 and 403 (m/z), which corresponds to the calculated theoretical value of 2-((3-(thiophen-2-ylmethyl)-1*H*-1,2,4-triazol-5-yl)thio)acetohydrazide (3) (left) and 3-nitrobenzylidene-2-((5-(thiophen-2-ylmethyl)-4*H*-1,2,4-triazol-3-yl)thio)acetohydrazide (5j) (right) (Fig. 1)

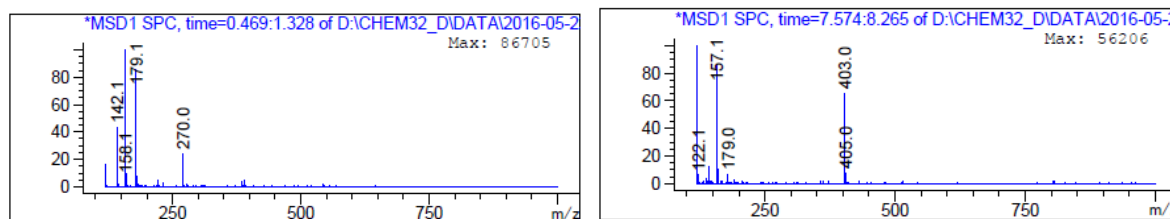


Fig. 1. Mass spectrum of 2-((3-(thiophen-2-ylmethyl)-1*H*-1,2,4-triazol-5-yl)thio)acetohydrazide (3) (left) and 3-nitrobenzylidene-2-((5-(thiophen-2-ylmethyl)-4*H*-1,2,4-triazol-3-yl)thio)acetohydrazide (5j) (right).

The elemental analysis (CHNS) was accomplished for synthesized compounds to confirm their basic chemical structures and revealed acceptable agreement with the calculated percentages.

The novel N'-substituted-2-((5-(thiophen-2-ylmethyl)-4*H*-1,2,4-triazol-3-yl)thio)acetohydrazides were synthesized and characterized.

ACKNOWLEDGEMENT

We're grateful to the Zaporizhzhia State Medical University for providing some facilities in carrying out the research.

REFERENCES

1. Pattan, S., Gadhave, P., Tambe, V., Dengale, S., Thakur, D., Hiremath, S. V., & Deotarse, P. (2012). Synthesis and evaluation of some novel 1, 2, 4-triazole derivatives for antimicrobial, antitubercular and anti-inflammatory activities. *Indian Journal of Chemistry Section B* 51(1):297-301.
2. Shcherbyna, R. A., Panasenko, A. I., Knysh, E. G., & Varinsky, B. A. (2014). Synthesis and physicochemical properties of 2-((4-R-3-(morpholinomethylene)-4H-1,2,4-triazol-5-yl)thio)acetic acids. *Aktual'ni Pitannâ Farmaceutičnoi i Medičnoï Nauki ta Praktiki*, 3 (16), 18-21.
3. Shcherbyna, R. A., Panasenko, A. I., Knysh, E. G., & Varinsky, B. A. (2014). Synthesis and physicochemical properties of 2-((4-R-3-(morpholinomethylene)-4H-1,2,4-triazol-5-yl)thio)acetic acids. *Aktual'ni Pitannâ Farmaceutičnoi i Medičnoï Nauki ta Praktiki*, 3 (16), 18-21.
4. Bushueva, I , Parchenko, V , Shcherbyna, R , Safonov, A , Kaplaushenko, A , Gutyj, B , Hariv, I . (2017). Tryfuzol - New original veterinary drug. *Journal of Faculty of Pharmacy of Ankara University* , 41 (1) , 0-0 . DOI: 10.1501/Eczfak_0000000594
5. Tkachenko, A., Zazharsky, V., Bilan, M., & Kovaleva, L. (2010). Some peculiarities of bovis tuberculosis display in long not favourably farm. *News of Dnipropetrovsk State Agrarian and Economic University*, (1), 100-103
6. Shcherbyna, R . (2019). Microwave-assisted synthesis of some new derivatives of 4-substituted-3-(morpholinomethyl)-4h-1,2,4-triazole-5-thioles. *Journal of Faculty of Pharmacy of Ankara University* , 43 (3) , 220-229 . DOI: 10.33483/jfpau.533166. Shcherbyna, R. O. (2014). Analysis of pharmacological activity of derivatives of 1, 2, 4-triazoles. *Farmatsevychnyi chasopys*, 4, 145-150.
7. Thakkar, S. S., Thakor, P., Doshi, H., & Ray, A. (2017). 1,2,4-triazole and 1,3,4-oxadiazole analogues: synthesis, MO studies, in silico molecular docking studies, antimalarial as DHFR inhibitor and antimicrobial activities. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. 25(15):4064-4075. doi: 10.1016/j.bmc.
8. Kumar, G. S., Prasad, Y. R., & Chandrashekar, S. M. (2013). Synthesis and pharmacological evaluation of novel 4-isopropylthiazole-4-phenyl-1, 2, 4-triazole derivatives as potential antimicrobial and antitubercular agents. *Medicinal Chemistry Research*, 22(2), 938-948.
9. Patel, N. B., Khan, I. H., Pannecouque, C., & De Clercq, E. (2013). Anti-HIV, antimycobacterial and antimicrobial studies of newly synthesized 1, 2, 4-triazole clubbed benzothiazoles. *Medicinal Chemistry Research*, 22(3), 1320-1329.
10. Aksonova, I. I., Shcherbyna, R. O., Panasenko, O. I., Knysh, Y. H., & Aksonov, I. V. (2014). The investigation of growth-stimulating activity of derivatives of 1, 2, 4-triazole on seeds of sunflower simple. *Ukrainskyi biofarmatsevychnyi zhurnal*, 6, 78-82.
11. Rud, A. M., Kaplaushenko, A. G., Pruglo, Y. S., & Frolova, Y. S. (2018). Establishment of diuretic activity indicators for (3-Thio-4-R-4-H-1,2,4-triazole-5-yl)(phenyl)methanols And Their Derivatives. *Aktual'ni Pitannâ Farmaceutičnoi i Medičnoï Nauki ta Praktiki*, 2018(2), 215-219.

12. Pilyugina K.S., Safonov A.A., Panasenko O.I., Knysh E.G., (2017). Synthesis, antimicrobial and antifungal activity of 2-((5-(thiophene-2-ylmethyl)-4N-1,2,4-triazoles-3-yl)thio)acetic acid esters. *Materials & Intern. Research Practice Conf. "Modern problems of pharmacotherapy and prescription of drugs"*. H., p.264.
13. Varynskyi, B., Knysh, Y., Parchenko, V., Panasenko, O., & Kaplaushenko, A. (2015). The study of retention regularities for the potential drug substances of 1,2,4-triazol-3-ylthioacetic acids and their salts series by the method of HPLC/DAD-MS. *Journal Of Organic And Pharmaceutical Chemistry*, 13(4), 68-75.
14. Saidov, G. V., Sverdlova, O. V., & Bakhshiev, N. G. (1995). *Prakticheskoe rukovodstvo po molekuliārnoi spektroskopii: uchebnoe posobie*. Izd-vo Sankt-Peterburgskogo universiteta
15. Kazitsena, L. and Kupletskaya, N. (1979). *Primenenie UF-, IK-, YaMR - i MASS - spectrometrii v orhanicheskoy khimii*. 2nd ed. Moskow: University of Moscow, p.240.



APPLICATION OF AHP METHOD FOR THE SELECTION OF PHARMACEUTICAL WAREHOUSE LOCATION

ECZA DEPOSU YERİ SEÇİMİNDE AHS YÖNTEMİNİN UYGULANMASI

Miray ARSLAN*

Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Eczacılık İşletmeciliği Anabilim Dalı, 65080, Van,
Türkiye

ABSTRACT

Objective: The primary purpose of this study is to find a solution to the warehouse location selection problem of a pharmaceutical warehouse serving in the pharmaceutical industry by using the Analytical Hierarchy Process (AHP) method.

Material and Method: Within the scope of this study, a possible new warehouse location problem that can be established in the Eastern and Southeastern Anatolia Region of Turkey for a pharmaceutical warehouse, which has a significant market share among the drug distribution channels in Turkey, will be solved with the AHP method. Firstly, the algorithm for the AHP is determined. Then, pair-wise comparison matrices for determined criteria and alternatives were prepared by decision-makers, and matrices were transferred to the Super Decision package program for the solution.

Result and Discussion: As a result, the most important criterion in the selection of the pharmaceutical warehouse location was determined as the infrastructure and physical conditions (35%) and transportation conditions (29%) followed by it. According to these criteria, the first alternative was found as the optimum.

Keywords: analytical hierarchy process, pharmaceutical warehouse, location selection

ÖZ

Amaç: Bu çalışmanın temel amacı, eczacılık sektöründe hizmet sunmakta olan bir ecza deposunun ecza deposu yeri seçim probleminde Analitik Hiyerarşi Süreci (AHS) yöntemi ile çözüm bulmaktır.

Gereç ve Yöntem: Bu çalışma kapsamında, Türkiye’de ilaç dağıtım kanalları arasında önemli bir Pazar payına sahip olan bir ecza deposunun Türkiye’de Doğu ve Güneydoğu Anadolu Bölgesinde kurulabilecek olası bir yeni deposu yer seçimi problemi AHS yöntemi ile çözülmüştür. İlk olarak, AHS algoritması belirlenmiştir. Ardından belirlenen kriterler ve alternatifler için karar vericiler tarafından ikili karşılaştırma matrisleri oluşturulmuş ve çözüm için matrisler Super Decision programına aktarılmıştır.

Sonuç ve Tartışma: Sonuç olarak, ecza deposu yer seçiminde en önemli kriter altyapı ve fiziksel koşullar (%35) kriteri olmuştur, bunu ulaşım koşulları (%29) takip etmiştir. Bu kriterler doğrultusunda en iyi depo yeri birinci alternatif olarak bulunmuştur.

Anahtar Kelimeler: analitik hiyerarşi süreci, ecza deposu, yer seçimi

* **Corresponding Author / Sorumlu Yazar:** Miray Arslan
e-mail / e-posta: eczmirayarслан@gmail.com, **Phone / Tel.:** +90 432 4445065 / 21148

INTRODUCTION

Today, according to the increase in the importance of globalization, supply chain management must be done correctly in order to ensure the continuity of the businesses. Logistics processes play a crucial role in continuing the supply chain without interruption, and warehouse management is among the critical activities of logistics [1]. Warehouse location selection, as one of the main functions of warehouse management, is a strategic decision-making process that has long term effects such as improving service quality, making economic progress, preventing material losses and, environmental problems. In this context, the choice of warehouse location, which is one of the critical decisions affecting the speed, profitability, and efficiency of the enterprises, is significant in terms of both cost and time [2,3].

In Turkey, pharmaceutical warehouses are one of the crucial members of the pharmaceutical supply chain by providing purchasing, selling, and distribution of pharmaceutical products in frame of current legal conditions [4]. Services offered by pharmaceutical warehouses directly affect the services provided both in pharmaceutical companies as suppliers and in pharmacies where distribution is provided to consumers. Warehouse activities should be carried out correctly in order to avoid problems such as delays in the process of taking a drug from the pharmaceutical company and delivering it to the patient through community pharmacies. The location of the warehouse is critical in the distribution process, which is one of these activities. In this study, an application was made for the selection of a pharmaceutical warehouse location at the pharmaceutical warehouse that has a significant market share.

The choice of warehouse location should be made with an integrated approach that should be handled together by many factors such as infrastructure, accessibility, legal status, market size, and access to the human resources [2,5]. In other words, the selection of warehouse location is a multivariate decision-making problem that deals with qualitative and quantitative criteria [6]. Multivariate decision-making techniques are frequently used in solving these types of selection problems. The analytical hierarchy process (AHP) is one of these techniques which is commonly preferred in the literature on warehouse location selection [3, 7-10]. Also, many studies apply AHP in the different areas of the pharmaceutical industry [11-14]. For example, Oey and Nitihardjo investigated the problem of location for a pharmaceutical company's regional postponement center via AHP [15]. Enyinda used the AHP model for the selection of suppliers in the pharmaceutical sector [16].

The motivation of this study comes from the lack of studies done with the AHP method related to pharmaceutical warehouses. To the best of author's knowledge, this is the first study that used AHP for solving the pharmaceutical warehouse location selection problem in Turkey. In this context, the

primary purpose of this study is to find a solution to the warehouse location selection problem of a pharmaceutical warehouse serving in the pharmaceutical industry by using the AHP method. The sub-objectives of the study are (i) establishing a hierarchical structure regarding the warehouse location selection problem, (ii) determining the importance (priority) values of the criteria in the hierarchical structure established and, (iii) comparing the warehouse location alternatives in terms of the determined criteria.

MATERIAL AND METHOD

Within the scope of this study, a possible new warehouse location problem that can be established in the Eastern and Southeastern Anatolia Region of Turkey for a pharmaceutical warehouse, which has a significant market share among the drug distribution channels in Turkey, will be solved with the AHP method. In this section, firstly, general information about the AHP method will be given, then the application process will be discussed in detail.

Analytical hierarchy process

The decision-making process has a complex structure that includes external factors such as natural phenomena as well as measurable factors. The decision-making process, which involves providing maximum benefits from the alternatives at minimum cost by considering all factors to reach a specific goal, is of great importance for the health sector, as in many different sectors [17].

AHP is one of the multi-criteria decision-making (MCDP) techniques based on pair-wise comparisons, developed by Thomas L. Saaty in the 1970s. This method has a more straightforward structure compared to other MCDP techniques. A multi-dimensional problem is reduced to one dimension by determining the importance (priority) levels of the criteria for the selection of the best alternative in AHP [18].

In the literature, the implementation steps of AHP are summarized as follows [19-22]: The first step of the AHP is to identify the problem. Following the determination of the problem, the hierarchical structure known as modeling, which allows the problem to be divided into various levels, is determined. There are criteria in the lower step of the hierarchy, where the ultimate goal of the problem is at the top and alternatives in the last step. After that, the relative importance matrices of each criterion are calculated. For this purpose, binary comparisons are made. In order to make binary comparisons, the comparison scales accepted in the literature are used. The most preferred one is the importance (priority) scale of Saaty, developed by Thomas Saaty (Table 1).

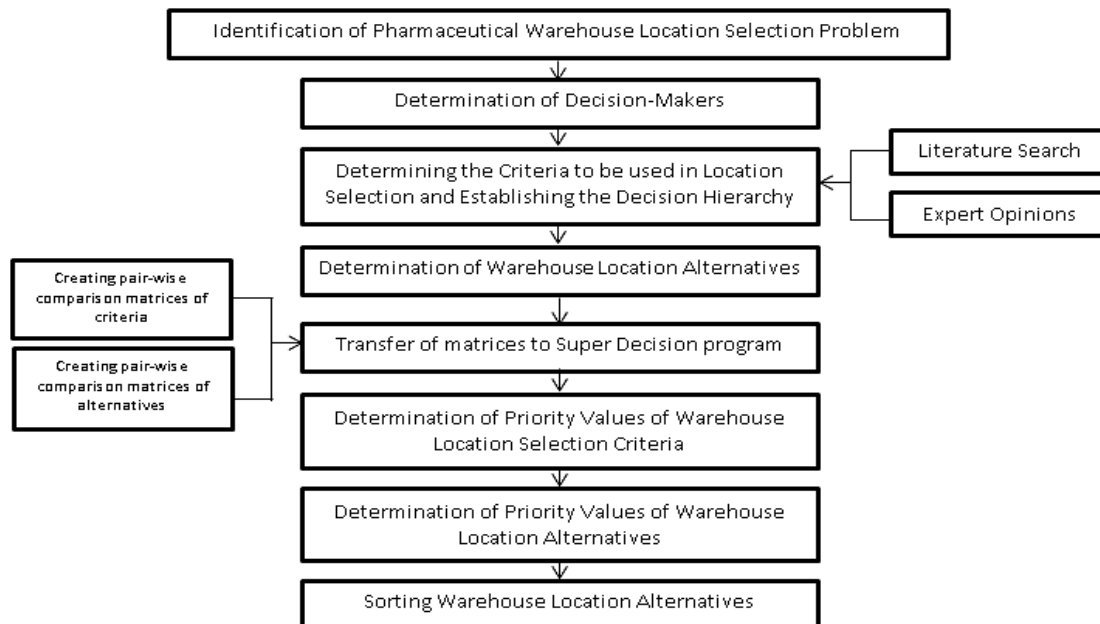
Table 1. The importance scale of Saaty [19]

Importance level	Definition
1	Equal importance
3	Moderately more important than one another
5	Strong importance
7	Very strong importance
9	Extreme importance
2,4,6,8	Intermediate / average values

After calculating the relative significance, the consistency (CR) of the comparison matrices is calculated to determine whether decision-makers are consistent when making binary comparisons. This value is expected to be below 0.1, and matrix consistency increases as it approaches zero. At the last stage, the decision alternatives are listed by creating a composite relative importance matrix. (For detailed information on the manual resolution of AHP, please see 19, 23). Modeling and solution of AHP can be done either manually or with the help of MS Excel or package programs such as "Expert Choice" and "Super Decision" [18]. In this study, AHS was modeled and solved via the "Super Decision" package program.

Application

The flow diagram followed in the application phase of this study is presented in Figure 1.

**Figure 1.** The flow diagram of the application

In line with the flow diagram presented in Figure 1, the decision problem of the study has been defined as; selecting a possible new warehouse location to be established in the Eastern Anatolia

Region for the XYZ pharmaceutical warehouse (the business name was not given due to confidentiality). Optimizing the level of service quality and minimizing costs are aimed at the solution of the problem.

Three authorities from the firm, related to supply chain management, are selected as the decision-makers of the problem. Following this, appropriate criteria and alternatives warehouse locations are determined according to relevant literature and opinions of the decision-makers. The criteria are determined as; (i) competitors, (ii) costs (rental, labor costs, etc.), (iii) the number of pharmacies and hospitals in the region, (iv) transportation conditions and, (v) infrastructure and physical conditions. Three provinces in the Eastern and Southeastern Anatolia Region of Turkey were identified as alternative locations by the relevant warehouse authorities and coded as; (i) Warehouse1, (ii) Warehouse2 and, (iii) Warehouse3. In this context, the hierarchical structure for the decision problem is presented in Figure 2.

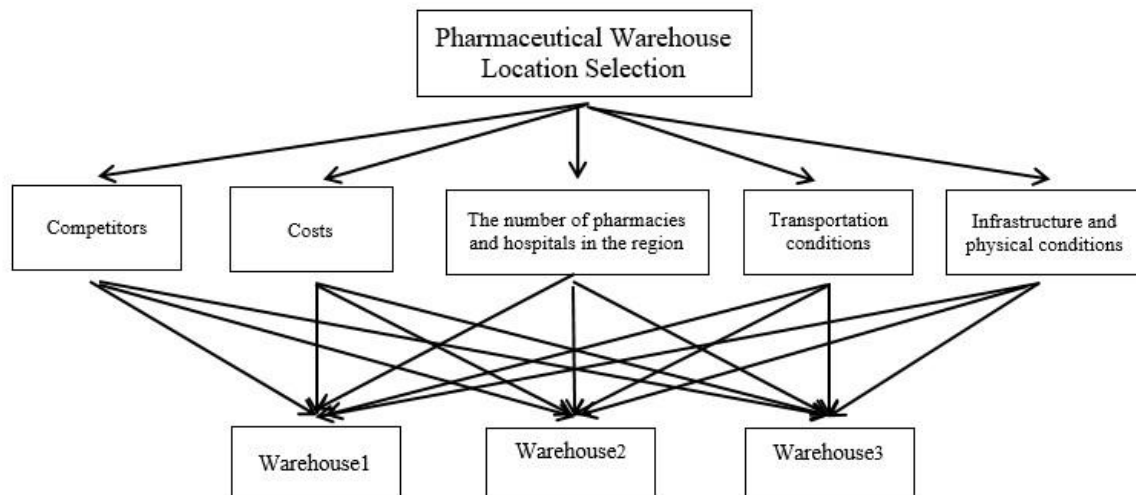


Figure 2. The hierarchical structure of the decision problem

After the hierarchical structure was created, pair-wise comparison matrices for criteria and alternatives were prepared by decision-makers, and matrices were transferred to the Super Decision package program for the solution.

RESULT AND DISCUSSION

In this section, firstly, geometric averages of pair-wise comparison matrices created by decision-makers are taken. Table 2 presents the findings obtained from the pair-wise comparison matrices for the criteria.

Table 2. Pair-wise comparison table for criteria

Criteria	Decision-maker 1	Decision-maker 2	Decision-maker 3	Geometric averages	Criteria
Competitors	5	3	3	3.557	Costs
Competitors	1/5	1/3	1/5	0.237	The number of pharmacies and hospitals
Competitors	1/7	1/5	1/3	0.212	Transportation conditions
Competitors	1/5	1/5	1/7	0.179	Infrastructure and physical conditions
Costs	1/5	1/3	1/3	0.281	The number of pharmacies and hospitals
Costs	1/3	1/3	1/3	0.281	Transportation conditions
Costs	1/5	1/3	1/3	0.333	Infrastructure and physical conditions
The number of pharmacies and hospitals	1/3	1	1/3	0.480	Transportation conditions
The number of pharmacies and hospitals	1	1/3	1/3	0.480	Infrastructure and physical conditions
Transportation conditions	1	1/3	1	0.693	Infrastructure and physical conditions

After entering the data in Table 2 into the Super Decision program, the consistency rates were evaluated. As stated in the pair-wise comparison of the criteria was calculated as 0.969, and the consistency report obtained as a result of the pair-wise comparison of the criteria is given in Figure 3.



Rank	Row	Col	Current Val	Best Val	Old Inconsist.	New Inconsist.	% Improvement
1.	1_Competers	2_Costs	3.557000	1.462564	0.096935	0.020044	79.32 %
2.	2_Costs	5_Infrastructure an	3.558719	7.419274	0.096935	0.074695	22.94 %
3.	1_Competers	3_The number of p	4.219409	1.533629	0.096935	0.076354	21.23 %
4.	2_Costs	4_Transportation c	3.003003	5.916529	0.096935	0.077911	19.63 %
5.	3_The number of p	4_Transportation c	2.083333	1.111281	0.096935	0.086235	11.04 %
6.	1_Competers	4_Transportation c	4.716981	2.612650	0.096935	0.090781	6.35 %
7.	1_Competers	5_Infrastructure an	5.586592	3.255155	0.096935	0.092577	4.50 %
8.	3_The number of p	5_Infrastructure an	2.083333	1.544979	0.096935	0.094656	2.35 %
9.	4_Transportation c	5_Infrastructure an	1.443001	1.108613	0.096935	0.095313	1.67 %
10.	2_Costs	3_The number of p	3.558719	3.120641	0.096935	0.097496	-0.58 %

Figure 3. Screenshot of the consistency report of the pair-wise comparison matrix of criteria

According to Figure 3, no inconsistency was observed in the pair-wise comparisons made by the decision-makers, and priority values for each criterion were calculated. In Figure 4, the priority rankings of the criteria are presented.

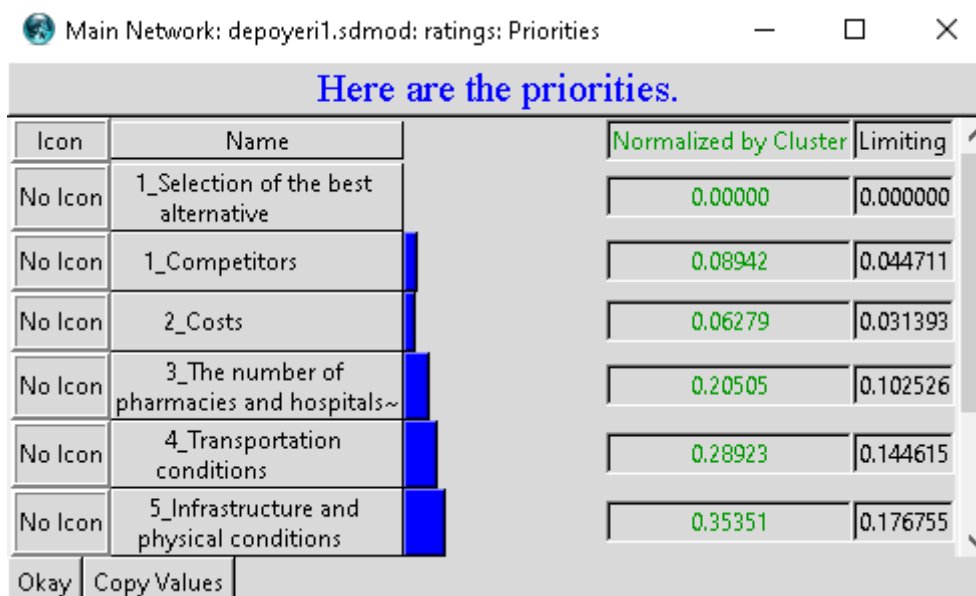


Figure 4. Priority values of warehouse location selection criteria

By Figure 4, the most important criterion in the selection of the warehouse location was determined as the infrastructure and physical conditions (35%) covering many subjects from the availability of areas suitable for the acceptance and shipment of goods to the storage to the suitability of cleaning, sewerage conditions and information technologies. These criteria are also highlighted in the legislation for pharmaceutical warehouses in Turkey. According to the “Good Distribution and Storage Practices Guideline for pharmaceuticals and products in warehouses,” published by Turkish Medicines and Medical Devices Agency (TMMDA), pharmaceutical warehouses must have adequate and appropriate buildings, areas, equipment and physical structuring. These requirements are fundamental to ensure that products are stored and distributed under appropriate conditions [24]. Parallel to this, Kolinska and Fechner stated similar constraints and emphasized the importance of infrastructure for selection of warehouse location [2,25]. In addition to the infrastructure, the importance of transportation conditions was also demonstrated in these studies. If it is needed to address the issue in pharmaceutical warehouses, the warehouse must be located in an easily accessible location to both suppliers and pharmacies in order to ensure efficient product flow in pharmaceutical warehouses. When the locations of drug distribution channels operating in Turkey are evaluated, it is seen that both central warehouses and auxiliary warehouses are located in places where transportation facilities are comfortable, and land conditions are convenient for transportation. Accordingly, it is not surprising that transportation conditions (29%) were found to be one of the two most essential warehouse location selection criteria in this study.

As mentioned by Fechner, economic and demographic criteria are both critical for determining warehouse location [25]. Kua and Kao found competition factors, including competitor’s store

numbers, store area, and competition, as the most critical factor for the selection of convenience stores located in the retail sector. They also evaluated the distance for consumer and economic values for competition [26]. Following, they put forth that all of these factors should take into consideration together for the best selection. In the present study, contrary to this, competitors (9%) and costs (6%) are found as the least influencing criteria. This situation is thought to arise from the sector difference in which the studies are carried out. Besides, in this study, rental and labor costs are discussed under the cost criterion. Decision-makers stated that the unemployment problem is similar for all three alternatives, so labor costs will not make a difference. Similarly, the idea that the rental prices would be similar caused the costs factor to be the least influential factor in the selection of the pharmaceutical warehouse location.

Following the weighting of the criteria, the pair-wise comparison matrices for alternative warehouse locations were created by the decision-makers for each criterion, and the geometric averages of them were transferred to the Super Decision program. The program output regarding the evaluation of alternative warehouse locations according to the "competitors" criterion is presented in Figure 5.

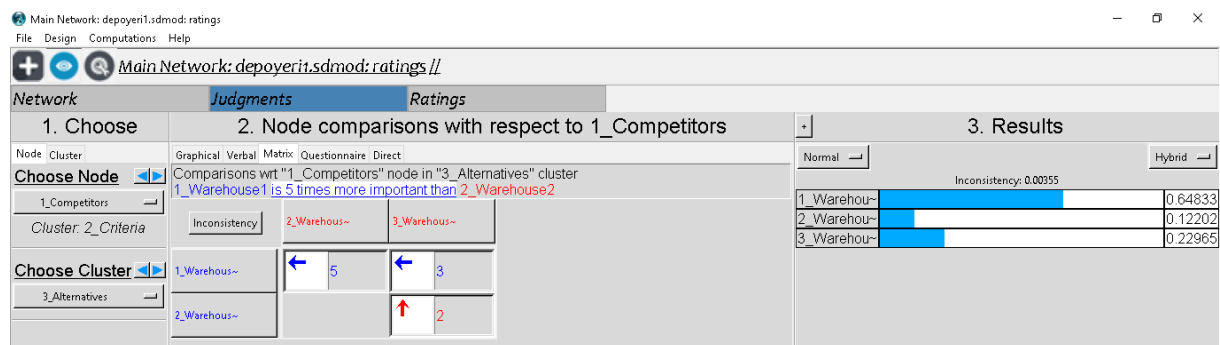


Figure 5. Program output based on the “Competitors” criterion

According to Figure 1, considering the “competitors” criterion, the best alternative is the Warehouse1, with a weight of 0.648. The consistency rate for this assessment was calculated as 0.0035. The program output obtained as a result of the evaluation of alternative warehouse locations according to the "Costs" criterion is given in Figure 6.

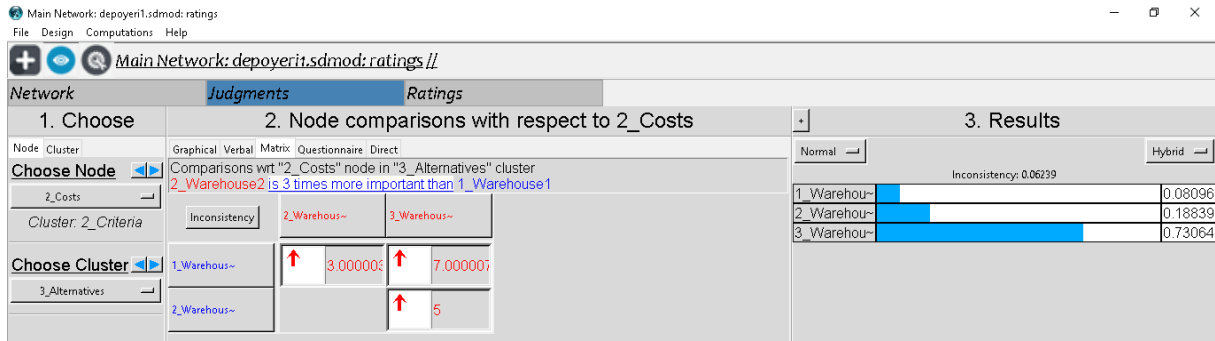


Figure 6. Program output based on the "Costs" criterion

Results in Figure 6 shows that considering the costs, it is determined that the best alternative is Warehouse3, with a weight of 0.730. The consistency rate for this assessment was calculated as 0.0623. In Figure 7, the program output obtained as a result of the evaluation of alternative warehouse locations under the criterion of "the number of pharmacies and hospitals in the region" is shown.

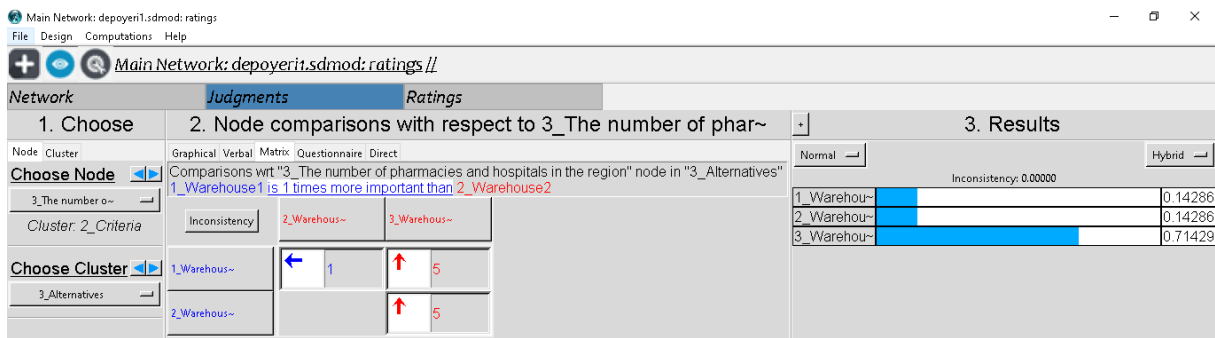


Figure 7. Program output based on the "The number of pharmacies and hospitals in the region" criterion

According to Figure 7, it is seen that the best alternative in terms of the number of pharmacies and hospitals in the region is Warehouse3, with a weight of 0.714. The consistency rate for this assessment was calculated as 0.00. The program output obtained as a result of the evaluation of alternative storage locations under the "Transportation conditions" criterion is given in Figure 8.

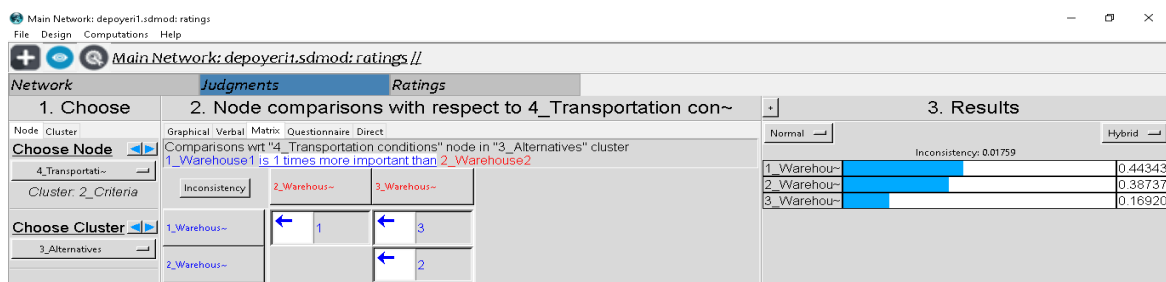


Figure 8. Program output based on the "Transportation conditions" criterion

When the transportation conditions are taken into consideration in light of the information given in Figure 8, it is seen that the best alternative is Warehouse1 with a weight of 0.443. The consistency rate for this assessment was calculated as 0.0175. The program output obtained as a result of the evaluation of alternative storage locations according to the last criterion, "Infrastructure and physical conditions," is presented in Figure 9.

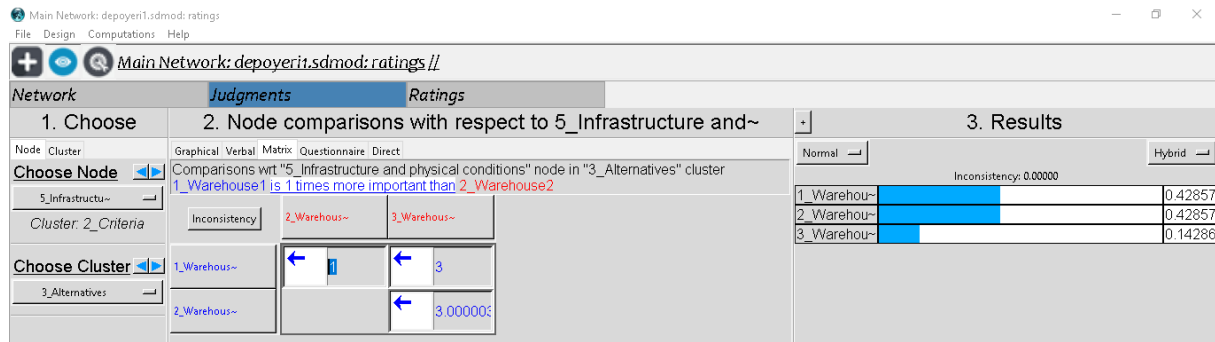


Figure 9. Program output obtained according to the "Infrastructure and physical conditions" criterion

Depending on the “Infrastructure and Physical Conditions” criterion, considering Figure 9, it is seen that Warehouse1 and Warehouse2 have an equal weight of 0.429. The consistency rate for this assessment was calculated as 0.00.

Finally, all the criteria are handled together, and the findings obtained are presented in Figure 10 by prioritizing the alternate warehouse locations through eigenvectors calculated through the program.

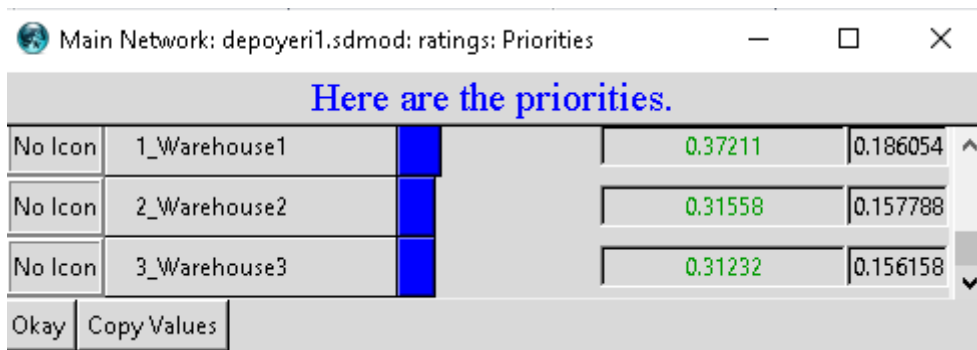


Figure 10. Priority values of alternative warehouse locations

Results presented in Figure 10 indicate that the most suitable place alternative for the pharmaceutical warehouse is Warehouse1 alternative, with a 0.372 weight. Besides, it has been demonstrated that the weight degrees of Warehouse2 and Warehouse3 are quite close to each other. Considering the alternatives, especially by taking the infrastructure and transportation conditions and the number of hospitals and pharmacies in the region into account, the result is not surprising.

The results of this study can be a guideline for the managerial policy of pharmaceutical distribution channels. To the best of author's knowledge, this study is unique because it is the first of its kind in Turkey. The study provides a different lens on how to select the optimal location for a pharmaceutical warehouse. As future studies, it is planned to improve the hierarchical model for the pharmaceutical warehouse location selection model by increasing the number of criteria or creating sub-criteria and using more advanced multivariate decision-making techniques.

REFERENCES

1. Ergün, G.Ü.L., Tamer, E.R.E.N. (2017). Lojistik dağıtım ağ problemlerinde analitik hiyerarşi prosesi yöntemi ve hedef programlama ile depo seçimi. *Harran Üniversitesi Mühendislik Dergisi*, 2(1), 1-13.
2. Kolinski, A. (2016). Logistics Management - modern development trends, Chapter 4 Role of Warehouse Space in The Supply Chain (pp.147-164). *Poznan: Poznan School of Logistics Press*.
3. Singh, R.K, Chaudhary, N., Saxena, N. (2018). Selection of warehouse location for a global supply chain: A case study. *Indian Institute of Management Bangalore*, 30, 343–356.
4. Tengilimoğlu, D., Yiğit, V. (2017). Sağlık işletmelerinde tedarik zinciri ve malzeme yönetimi. 3. Baskı. Ankara; Nobel Akademik Yayıncılık.
5. Erdin, C., Akbaş, H.E. (2019). A comparative analysis of fuzzy topsis and geographic information systems (gis) for the location selection of shopping malls: A case study from Turkey. *Sustainability*, 11(14), 3837.
6. Uysal, F., Tosun, Ö. (2012). Selection of Sustainable Warehouse Location in Supply Chain Using the Grey Approach. 3rd International Symposium on Sustainable Development, May 31 - June 01 2012, Sarajevo. 383-390.
7. Aktepe, A., Ersöz, S. (2014). AHP-VIKOR ve MOORA Yöntemlerinin Depo Yeri Seçim Probleminde Uygulanması. *Endüstri Mühendisliği*, 25(1), 2-15.
8. Cömert, S. E., Yener, F. (2017). Bir Gıda Firması İçin Bulanık Analitik Hiyerarşi Prosesi İle Depo Yeri Seçimi. *Uluslararası İktisadi ve İdari Bilimler Dergisi*, 2(2), 161-177.
9. Chen, C. (2009). A Decision Model of Field Depot Location Based on the Centrobatic Method and Analytic Hierarchy Process (AHP). *International Journal of Business and Managment*, 4, 71–75.
10. Karmaker, C.L., Saha, M. (2015). Optimization of warehouse location through fuzzy multi-criteria decision making methods. *Decision Science Letters*, 4, 315–334.
11. Jaberidoost, M., Olfat, L., Hosseini, A., Kebriaeezadeh, A., Abdollahi, M., Alaeddini, M., Dinarvand, R. (2015). Pharmaceutical supply chain risk assessment in Iran using analytic hierarchy process (AHP) and simple additive weighting (SAW) methods. *Journal of Pharmaceutical Policy and Practice*, 8(1), 9.

12. Velmurugan, R., Selvamuthukumar, S. (2012). The analytic network process for the pharmaceutical sector: Multi-criteria decision making to select the suitable method for the preparation of nanoparticles. *DARU Journal of Pharmaceutical Sciences*, 20(1), 59.
13. Bahmani, N., Blumberg, H. (1987). Consumer Preference and Reactive Adaptation to a Corporate Solution of the Over-The-Counter Medication Dilemma-An Analytic Hierarchy Process Analysis. *Math. Modelling*, 9(6), 293-298.
14. Elahi, F., Muqtadir, A., Anam, S., Mustafiz, K. (2017). Pharmaceutical Product Selection: Application of AHP. *International Journal of Business and Management*, 12(8), 193-200.
15. Oey, E., Nitihardjo, E.C. (2016). Selecting Regional Postponement Centre Using PESTLE-AHP-TOPSIS Methodology: A Case Study in a Pharmaceutical Company. *Global Business Review*, 17(5), 1250-1265.
16. Enyinda, E.A. (2010). A Model for Quantifying Strategic Supplier Selection: Evidence from a Generic Pharmaceutical Firm Supply Chain. *International Journal of Business, Marketing and Decision Sciences*. 3(2), 23-44.
17. Yıldırım, B.F. (2018). Çok kriterli karar verme yöntemlerine giriş. İçinde: E. Önder ve B.F. Yıldırım (Eds.), Sağlık yönetiminde karar verme-I, (s. 1-8). Bursa: Dora Yayıncılık.
18. Önder G., Önder E. (2018). Analitik Hiyerarşi süreci. İçinde: B.F. Yıldırım, E. Önder. (Eds.), Çok Kriterli Karar verme yöntemleri, (s. 21-64). Bursa: Dora Yayıncılık.
19. Saaty, T.L. (2000). Fundamentals of Decision Making ve Priority Theory with The Analytic Hierarchy Process. RWS Publications.
20. Kuruüzüm A., Atsan N. (2001). Analitik Hiyerarşi Yöntemi ve İşletmecilik Alanındaki Uygulamaları. *Akdeniz İİBF Dergisi*, 1(1), 83-105.
21. Chandran B., Golden B., Wasil E. (2005). Linear Programming Models For Estimating Weights in The Analytic Hierarchy Process. *Computers and Operations Research*. 32(9), 2235-2254.
22. Ömürbek N., Şimşek A. (2014). Analitik Hiyerarşi Süreci ve Analitik Ağ Süreci Yöntemleri ile Online Alışveriş Site Seçimi. *Yönetim ve Ekonomi Araştırmaları Dergisi*, 12(22), 306-327.
23. Saaty, T.L. (1980). The Analytic Hierarchy Process, New York: McGraw-Hill.
24. T.C. Sağlık Bakanlığı İlaç ve Eczacılık Genel Müdürlüğü Geneşgesi Sayı: 48196. Tarih: 22 Ekim 1999. İlaçlar ve Ecza Deposunda Bulundurulanan Ürünler İle İlgili İyi Dağıtım ve Muhafaza Uygulamaları Kılavuzu.
25. Fechner, I. (2009). Determinants of warehouse space market development in Poland. *LogForum*. 5(1), 3.
26. Kuo, R.J., Chi, S.C., Kao, S.S. (2002). A decision support system for selecting convenience store location through integration of fuzzy AHP and artificial neural network. *Computers in industry*. 47(2), 199-214.



İSTANBUL AKTARLARINDA SATILAN *HYPERICUM PERFORATUM* ÖRNEKLERİNİN FARMAKOGNOZİK AÇIDAN İNCELENMESİ

*PHARMACOGNOSTIC RESEARCH ON HYPERICUM PERFORATUM SAMPLES SOLD BY
HERBALISTS IN ISTANBUL*

Ömerül Faruk TAVLI¹, Ömer HAZMAN², Ahmet BÜYÜKBEN³, Fatma Nur YILMAZ⁴,
Berna ÖZBEK ÇELİK⁴, Esra EROĞLU ÖZKAN^{1*}

¹İstanbul Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmakognozi Anabilim Dalı, 34116, İstanbul, Türkiye

²Afyon Kocatepe Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Kimya Bölümü, Biyokimya ABD, 03204,
Afyonkarahisar, Türkiye

³Afyon Kocatepe Üniversitesi, Çay Meslek Yüksek Okulu, Kimya Teknolojisi Programı, 03700,
Afyonkarahisar, Türkiye

⁴İstanbul Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, 34116, İstanbul,
Türkiye

ÖZ

Amaç: Ülkemizde, halk arasında tedavi amacıyla kullanılan bitkisel droglar genellikle aktarlardan temin edilmektedir. Aktarlarda satılan drogların kalitesi ve güvenilirliği uzun yıllardır tartışılmaktadır. Bu çalışma ile önemli tıbbi bitkilerimizden biri olan ve halk arasında yaygın olarak kullanılan *Hypericum perforatum* türünün İstanbul aktarlarından satın alınan örnekleri incelenmiştir.

Gereç ve Yöntem: Sarı Kantaron adı ile satılan droglar, İstanbul'da faaliyet gösteren, rastgele seçilmiş 12 farklı aktardan temin edilmiştir. Bitkinin toplanan kısmının (drog) ve toplanma zamanının kontrolü makroskobik ve mikroskobik incelemelerle; saklama koşullarının uygunluğu ise mikrobiyolojik test ile araştırılmıştır. Drogların küllü ve nem miktarı, total antioksidan statü (TAS) ve total oksidan statü (TOS) değerleri, oksidatif stres indeksi (OSI), mineral ve ağır metal düzeyleri tespit edilmiştir. Droglardan hazırlanan metanol ekstraktlarının hiperisin içeriği Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (YPSK) ile analiz edilmiştir.

Sonuç ve Tartışma: Bu çalışma ile örneklerin çoğunun gözle görülebilen kirlilikler ile kontamine olduğu, 6 tanesinin hiperisin içermediği, 2 tanesinin çok yüksek oranda alüminyum (Al) içerdiği belirlenmiştir. Sonuç olarak tıbbi bitkilerin gerekli denetimlere tabi tutulmadan aktarlarda satılmasının halk sağlığı açısından uygun

* Sorumlu Yazar / Corresponding Author: Esra Eroğlu Özkan
e-posta / e-mail: eseroglu@istanbul.edu.tr, Tel. / Phone: +90 212 4400000/13582

olmadığı bir kez daha anlaşılmıştır. Mevcut bu durumun önüne geçilmesi, halkın doğru ve standart kalitede droglara ulaşabilmesi sağlanmalıdır.

Anahtar Kelimeler: ağır metal, aktarlar, halk sağlığı, hiperisin, *Hypericum perforatum*

ABSTRACT

Objective: In our country, herbal drugs used for medical purposes by the folk are generally purchased from the herbal stores. The quality and reliability of the plants sold in the herbal stores have been discussed for many years. The present study aims to investigate samples of *Hypericum perforatum*, which is one of the important medicinal plants and widely used by the folk.

Material and Method: The drugs sold as “St John’s Wort” were purchased from 12 different herbal stores which were randomly chosen in Istanbul. Quality control of the collected part and collection time of the plant were examined by using macroscopic and microscopic methods. The suitability of the plant storage conditions were investigated by microbiological test. The ash and moisture contents, total antioxidant status (TAS), total oxidant status (TOS), oxidative stress index (OSI), mineral and heavy metal levels of the plant were determined. Hypericin contents of the methanol extracts prepared from the plant samples were analyzed by High Performance Liquid Chromatography (HPLC).

Result and Discussion: In this study, it was determined that most of the samples were contaminated by impurities, 6 of them did not contain hypericin, and 2 of them contained high levels of aluminium (Al). As a result, it was once again understood that it might be inconvenient to sell the medicinal plants in the herbal stores unless inspected for public health. Sale of the medicinal plants in herbal stores should be prevented, and it should be ensured that the public can reach the high quality medicinal plants.

Keywords: heavy metal, herbalists, hypericin, *Hypericum perforatum*, public health

GİRİŞ

Günümüz modern tıbbında sentetik ilaçların yaygın kullanımına karşın halk arasında bitkisel drogların kullanımının tercih edildiği bilinmektedir. Özellikle endüstriyel olarak gelişmekte olan ülkelerde sentetik ilaçlara göre bitkisel drogların daha ucuz ve ulaşılabilir olmaları, geleneksel tedavide çok uzun yıllardır biliniyor olmaları, yan etki ve ilaç etkileşimlerinin sentetik ilaçlara göre daha az bilinir olması nedeniyle halk arasında yaygın olarak kullanıldıkları bir gerçektir [1-4].

Anadolu halkı, yaşadığı coğrafi bölgenin florasının zenginliği nedeniyle bitkiler ile yakından ilgili olmuştur. Kırsaldaki insanların doğadan topladığı, kentlerdekilerin ise aktarlardan temin ettiği bitkileri tıbbi amaçla kullandığı görülmektedir. Bitkilerin temin edildiği aktarların tarihi yüzyıllar öncesine dayanmaktadır. Osmanlı Dönemi’nde ilaç yapımında kullanılan bitkisel ve hayvansal kaynaklı hammaddeleri ve mineralleri (drog) satanlar için; Arapça “akkar” kelimesinden türeyen “aktar” kelimesi kullanılmıştır. Günümüzde de benzer dükkanlar için bu kelime kullanılmaya devam etmektedir [1].

Hypericum perforatum L.; Hypericaceae familyasına ait, yaklaşık olarak 30-100 cm boylarında çok yıllık otsu bir bitkidir. Avrupa, Asya, Kuzey Afrika ve Kuzey Amerika’da geniş yayılış gösteren *H. perforatum* türünün taze ve çiçekli dallarından elde edilen “Hyperici herba” drogu Avrupa Farmakopesi’ne kayıtlıdır [5-7].

Anadolu’da; binbirdelik otu, kan otu, kılıç otu, koyun kıran, kuzu kıran, mayasıl otu, püren, sarı kantaron, yara otu, gibi isimlerle bilinen *H. perforatum* türünün; tarihçesi, etnobotanik kullanımı, kimyasal bileşimi ve aktiviteleri ile ilgili birçok çalışma bulunmaktadır [8, 9].

Dünyada St. John's Wort olarak tanınan *H. perforatum* türünün tıbbi amaçla 2000 yılı aşkın süredir kullanıldığı bilinmektedir. Antik çağlarda doğaüstü özelliklere sahip olduğuna inanılan *H. perforatum* türünün cins ismi olan “*hypericum*”; Latince “hyper” ve “ikon” anlamına gelen kelimelerin birleşiminden oluşmuştur. Epiteti olan “*perforatum*” ise bitki ışığa tutulduğunda yaprak ve çiçeklerinde görülen saydam salgı bezlerinin oluşturduğu delikli görünümünden dolayı “delikli” anlamına gelen “perforated” kelimesinden türemiştir [3, 5, 10, 11].

Uzun yıllardır yapılan çalışmalar sonucunda *H. perforatum* bitkisinin kimyasal bileşimi aydınlatılmış; bitkinin, naftodiantron türevleri (hiperisin, psödohiperisin), flavonoidler (rutin, hiperozit, izokersitrin, kersitrin, luteolin, kempferol, mirsetin, amentoflavon ve I3, II8 biapigenin), floroglusinoller (hiperforin, adhiperforin), biflavonlar, prosiyanidinler, ksanton türevleri, tanenler, uçucu yağ bileşikler, fenolik asit türevleri, amino asitler, ayrıca; organik asitler, peptidler, polisakkaritler gibi hidrofilik maddeler ile bazı lipofilik maddeleri taşıdığı saptanmıştır [6, 10, 12, 13].

Aktarlardan alınan bitkisel droglar, teşhisi, standardizasyonu, toplama ve saklama koşulları gibi parametrelerde yeterli denetime tabi tutulmadıklarından halk sağlığı açısından tehdit oluşturmaktadırlar. Birbirlerine benzer anatomiye sahip türlerin birbirlerinden ayırt edilmesi ve teşhisi oldukça önemli bir konudur. Bitkilerin toplanan kısmına, toplanma zamanına, kurutma ve saklama koşullarına göre kimyasal içeriği değişebilmektedir. Ayrıca, uygun olmayan saklama koşullarında bitkide mikrobiyolojik üreme de görülebilir. Bu nedenlerle, doğru bitkinin toplanması, toplanan kısmı, toplanma zamanı, teşhisi, kurutma ve saklama koşulları, tüm bunların denetlenmesi halk sağlığının korunması için çok önemli parametrelerdir ve uzman kişilerce yapılmalıdır.

Bu çalışma ile İstanbul'da faaliyet gösteren rastgele seçilmiş 12 aktardan, “Sarı Kantaron” olarak satılan örnekler temin edilmiştir, örneklerin doğru bitkiye ait olup olmadığını, drog olarak toplanan kısmının, toplama zamanının, kurutma ve saklama koşullarının uygunluğunu belirlemek amaçlanmıştır. Droglar üzerinde makroskobik ve mikroskobik incelemeler, mikrobiyolojik analiz, mineral ve ağır metal miktar tayini yapılmış, total antioksidan statü (TAS), total oksidan statü (TOS) ve oksidatif stres indeksi (OSI) belirlenmiştir, ayrıca droglardan hazırlanan metanol ekstralarında YPSK ile kalitatif hiperisin analizi yapılmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEM

Kullanılan Droglar

Bu çalışmada kullanılan Hyperici herba droğu, İstanbul'da faaliyet gösteren ve rastgele seçilmiş 12 aktardan, 20.11.2018- 15.03.2019 tarihleri arasında, “Sarı Kantaron” adı ile sorularak temin edildi. Droglar A, B, C, D, E, F, G, H, I, J, K, L olarak kodlandı.

Genel Metotlar

Makroskopik ve Mikroskopik İnceleme

12 farklı aktardan temin edilen Hyperici herba droğu örneklerinin makroskopik incelemesi, temiz bir süzgeç kağıdı üzerine yayılarak göz ile yapıldı, içeriğindeki yabancı maddeler tespit edildi, ayrıldı ve fotoğrafı çekildi [7].

Mikroskopik inceleme için, drog örnekleri blender (Waring) yardımıyla toz edildi ve 40 no'lu elekten geçirildi. Kloralhidrat ve sartur reaktifleri ile ayrı ayrı hazırlanan preparatları mikroskop (Olympus) aracılığıyla, 10x ve 40x ölçekli mercekler kullanılarak incelendi, polen ve hiperisin taşıyan salgı bezi arandı [7].

Mikrobiyal Üreme Testi

Mikrobiyal üreme testi için, drog örnekleri blender (Waring) yardımıyla toz edildi, 1 gram tartıldı ve 10 mL steril distile su ile karıştırıldı. Daha sonra steril tuzlu su kullanılarak on katlı seri dilüsyonları yapılarak 10^{-1} ve 10^{-8} 'lik örnekler elde edildi. Yapılan dilüsyonlardan 10 µl alınarak, bakteriler için Triptik Soy Agar (TSA) ve mantarlar için Saboroud Dekstroz Agar (SDA) katı besiyeri yüzeyine yayıldı ve etüvde bakteriler için 37 °C'de, mantarlar için 25 °C'de bir gece inkübasyona bırakıldı. Canlı total bakteri sayısını belirlemek için ertesi gün oluşan koloniler sayıldı ve seyreltme faktörü dikkate alınarak örneklerin bir gramında bulunan total aerob bakteri ve mantar sayıları koloni oluşturan birim (KOB) cinsinden hesaplandı [14].

Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (YPSK) ile Hiperisin Analizi

Örneklerden hazırlanan metanol ekstrelerindeki "hiperisin" varlığı YPSK ile belirlendi. SCL – 10A SHIMADZU cihazı (Pompa: LC – 10 AD; Enjektör: SIL – 10 AD; Dedektör: SPD – M10A; Kolon Fırını: CTO – 10AS) kullanıldı. Avrupa Farmakopesi'ndeki Hyperici herba drogunda hiperisin analizi için verilen izokratik metot uygulandı. Phenomenex 5 µm C18 (250 x 4,6 mm) kolon kullanıldı. Ekstreler ve hiperisin metanolde çözüldü, filtreden geçirilerek viallere alındı. Mobil faz (Etil asetat : 15,6 g/l sodyum dihidrojen fosfat çözeltisi (Fosforik asit ile pH 2) : Metanol (39:41:160)) karışımı 1 mL/dak akış hızıyla geçirildi. Enjeksiyon hacmi 10 µl; kolon sıcaklığı 40 °C, hiperisin için izlenen dalga boyu 590 nm olarak ayarlandı [15].

Ekstrelerin ve Örnek Çözeltilerin Hazırlanması

10 g drog 100 mL metanol (Merck 1.06007.2500) ile oda ısısında ve ışıktan korunarak 24 saat shaker (N-BIOTEK) aletinde maserasyona bırakıldı. Bu işlem aynı drog ile drog tamamen tüketilinceye kadar tekrar edildi. Maserat, rotary evaporatör (Buchi) ile 45 °C'yi geçmeyen ısıda alçak basınç altında

kuruluğa kadar yoğunlaştırıldı. Droglardan bu şekilde hazırlanan ekstreler -20 °C’de muhafaza edildi [16, 17].

Standart Çözeltilerin Hazırlanması

Hiperisin (Fluka – 56690) metanol (Merck 1.06007.2500) ile çözüldü, uygun konsantrasyona seyreltildi ve 0,45 µm’lik filtrelerden süzülerek viallere alındı. Standart çözelti enjeksiyon öncesi taze olarak hazırlandı.

Nem ve Kül Miktar Tayini

Nem miktar tayini için; sabit vezne getirilmiş ve darası alınmış bir cam tartı kabı içine 2 gram kaba toz edilmiş drog konulup tam olarak tartıldı (P). Numune etüve yerleştirilip sıcaklık ve zaman ayarı yapılarak 105 °C sıcaklıkta sabit ağırlığa ulaşınca kadar (2-3 saat) kurutuldu. Bu sürenin sonunda kurutma kabı maşa ile tutularak desikatöre alındı. Desikatörde oda sıcaklığına kadar soğutulduktan sonra hassas terazide tartıldı. Tartım değerlerinden kuru madde ve nem miktarı hesaplandı. Kuru drogun ağırlığı (p) bulunduktan sonra aşağıdaki formüle göre drogdaki yüzde su miktarı hesaplandı [7, 18, 19].

$$\% \text{ su} = (P-p)/P \times 100$$

Kül miktar tayini için; 1 gram drog sabit ağırlığa getirilmiş ve darası alınmış bir porselen krozede tam olarak tartıldı. Önce düşük ısıda (300 °C) daha sonra 800 °C’yi geçmeyen bir ısıda 45 dakika yakıldı. Elde edilen külün numune miktarına oranlanması ile yüzde kül miktarı hesaplandı [7, 19, 20].

Total Antioksidan Statü (TAS), Total Oksidan Statü (TOS) ve Oksidatif stres indeksinin (OSI) ve Mineral Madde Düzeylerinin Belirlenmesi

Drog örneklerinin TAS, TOS analizleri için hazırlanması

Hyperici herba droglarında TAS ve TOS değerlerini belirlerken ham örnekler kullanıldı. Bu amaçla toz haline getirilmiş bitkinin yaprak, dal ve çiçek bölümleri iyice karıştırıldıktan sonra 1 g tartılarak bir tüpe kondu. Üzerine 1:10 (w/v) oranında buz soğukluğunda PBS (pH:7,4) eklendi. Vorteks ile karıştırılarak buz içinde 10 kez sonikasyona tabi tutuldu. Her bir sonikasyon 20 saniye süreyle uygulandıktan sonra 1 dakika sonikatör (Bandelin, UW 2070) dinlendirildi. Böylelikle bitkinin hücresel boyutta da iyice parçalanarak örneklerin daha da homojen hale gelmesi hedeflendi. Sonikasyonla oluşan PBS-bitki süspansiyonu santrifüj edilerek örneklere ait süpernatantlar elde edildi. Bu şekilde her bir ham örnekten 3 adet temsili örnek hazırlandı. TAS, TOS analizlerinde hazırlanan bu temsili örnekler kullanıldı [21].

Total Antioksidan Statü (TAS) Düzeylerinin Belirlenmesi

Farklı aktarlardan alınan Hyperici herba droglarından hazırlanan temsili örneklerde TAS seviyeleri spektrofotometrik yöntemle çalışan ticari kit (Rell Assay, Gaziantep, Türkiye) kullanılarak ölçüldü. Yapılan analizlerde kör olarak PBS kullanıldı. Örneklerdeki TAS seviyeleri, vitamin E'nin suda çözünür bir formu olarak kabul edilen troloks ile kıyaslama yapılarak tespit edildi. Böylelikle numunelerdeki total antioksidan miktarı troloks eşdeğeri (ekivalan) şeklinde belirlendi. TAS seviyeleri belirlenirken troloks antioksidanı ile farklı konsantrasyonlarda (2, 1, 0.5 mmolTroloks/L) hazırlanan standartlar kullanılarak bir kalibrasyon eğrisi oluşturuldu. Elde edilen kalibrasyon eğrisi kullanılarak bitki süpernatantlarında TAS seviyeleri belirlendi. TAS düzeyleri mmolTroloks Ekivalan/L olarak ifade edildi [21].

Total Oksidan Statü (TOS) Düzeylerinin Belirlenmesi

Bir bitkide olan oksidan moleküllerin seviyelerinin belirlenmesi, o türün antioksidan olarak etkinliğini açıklamak adına yararlı olabilmektedir. Ayrıca fitoterapötik amaçla kullanılacak olan bitkilerin TOS düzeylerinin yüksek olması, bitkiden sağlanması düşünülen antioksidatif faydanın azalacağı anlamına gelmektedir. Bu bağlamda sunulan çalışmada total antioksidan kapasite (TOS) belirlenmiştir. TOS seviyeleri belirlenirken standart olarak 20 µmol/L hidrojenperoksit (H₂O₂) kullanılmıştır. Bitkideki total antioksidan miktarı H₂O₂ ile kıyaslama yapılarak bulunduğu için sonuçlar H₂O₂ eşdeğeri (ekivalan) olarak belirlenmiştir. Bulunan TOS sonuçları ise hidrojenperoksit ekivalan litre (µmol H₂O₂ ekivalan/L) olarak ifade edildi.

Bitki örneklerinin sonikasyonu sonrasında elde edilen süpernatantlardan alınan uygun miktardaki hacim üzerine kit protokolüne uygun reaktifler katıldıktan sonra yapılan spektrofotometrik okuma (540 nm) sonucunda elde edilen optik dansitelerden hareketle numunelerdeki TOS seviyeleri belirlendi. TOS seviyeleri analizinde kullanılan ticari kitte (Rell Assay, Gaziantep, Türkiye) belirtilen ve aşağıda sunulan formül aracılığı ile hesaplandı [21].

$$\text{TOS } (\mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ Ekivalan/L}) = [(\Delta\text{Abs Sample}/\Delta\text{Abs standart}) \times 20]$$

Oksidatif Stres İndeksinin (OSI) Belirlenmesi

Analizlerden elde edilen TAS ve TOS verileri kullanılarak hesaplanan oksidatif stres indeksi (OSI) kit protokollerinde (Rell Assay) ifade edildiği gibi, aşağıda verilen formül yardımıyla hesaplandı. Elde edilen OSI değerleri, OSI seviyeleri düşük olan örneğin fitoterapötik etkinliğinin daha yüksek olabileceği şeklinde değerlendirildi [22].

$$\text{OSI}=[(\text{TOC}/\text{TAC}) \times 100]$$

Mineral Madde Düzeylerinin Belirlenmesi

Hyperici herba droglarındaki organik bileşenleri bozundurmamak, inorganik bileşenleri ise çözünür forma dönüştürmek amacıyla mikrodalga fırında yakma yöntemi kullanıldı. Bu amaçla 0.5 g ham örnek teflon godelere alındı. Numune üzerine 3 mL nitrik asit, 1 mL hidrojen peroksit ve 0.5 mL perklorik asit eklendi. Teflon godelerin kapağı kapatıldı. Mikrodalga fırına (Berghof, Speedwave Two) yerleştirilerek ısıtıldı. Mikrodalga fırın içinde godeler 75 °C/5 dak, 160 °C/15 dak, 75°C/5 dak tutuldu. Fırından çıkan godeler oda sıcaklığına geldikten sonra örnekler 10 mL'lik balon jodelere aktarıldı. 18.2 MΩxcm ultra saf su ile 10 mL'ye tamamlanarak balon jodelere alınan örneklerdeki minör ve major element konsantrasyonları Endüktif Eşleşmiş Plazma-Optik Emisyon Spektroskopisi (ICP-OES; Spectro Genesis, Germany) cihazı kullanılarak ölçüldü. Metot kalibrasyonu için çoklu element standartları (Merck, ICP multi-element standart solution XVI; Merck, ICP multi-element standart solution IV) kullanıldı. Standartlarda bulunan elementlere (Sb, As, Be, Cd, Ca, Cr, Co, Cu, Fe, Pb, Li, Mg, Mn, Mo, Ni, Se, Sr, Tl, Ti, V, Zn, Ag, Al, B, Ba, Bi, Ga, In, K) ait kalibrasyon eğrileri oluşturuldu. Sonrasında mikrodalga fırında yaş yakma metodu ile yakılan örneklerdeki element düzeyleri belirlendi. Örneklerde varlığı tespit edilebilen element düzeyleri mg/L (ppm) şeklinde ifade edildi [23].

İstatistiki değerlendirme

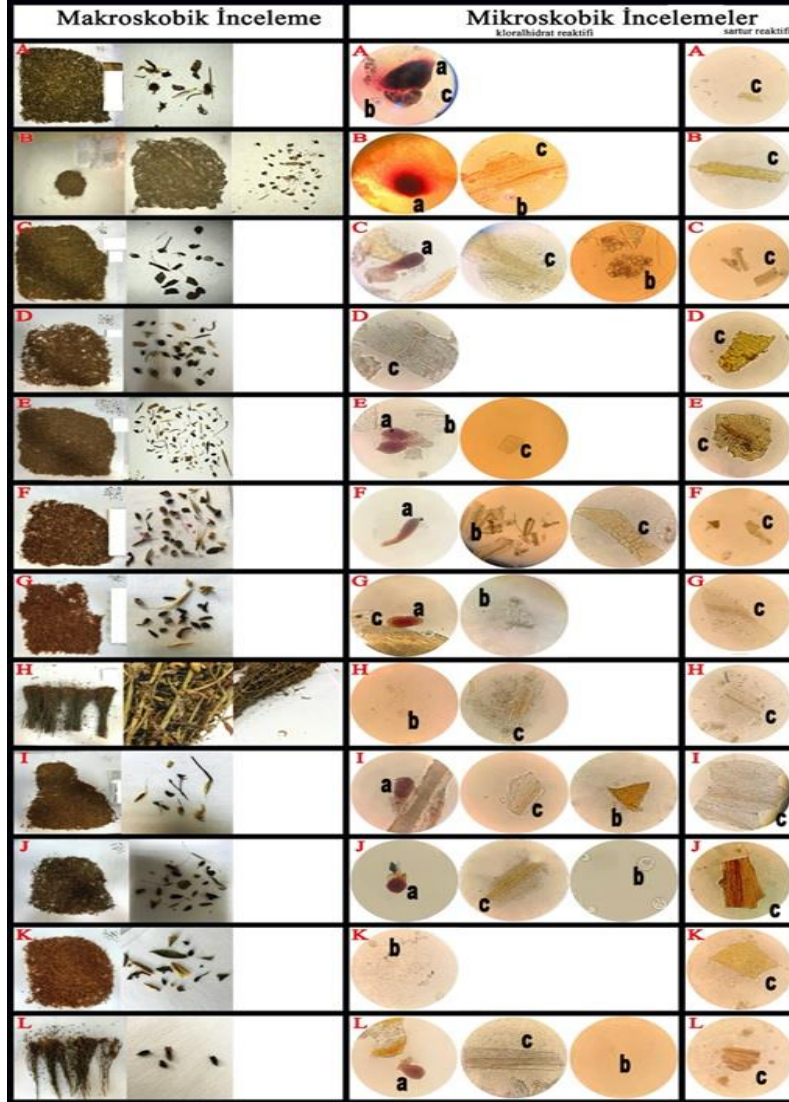
Elde edilen veriler ortalama±standart sapma şeklinde tanımlandı. Verilerin değerlendirilmesinde SPSS 18 paket program kullanıldı. Farklı aktarlardan tedarik edilen Hyperici herba droglarındaki TAS, TOS, OSİ ve element düzeyleri arasındaki istatistiki farklılıklar ($p<0.05$) tek yönlü varyans analizi (ANOVA) kullanılarak belirlendi. İstatistiki farklılıkların olduğu belirlenen parametrelerde hangi bitki türleri arasında istatistiki düzeyde anlamlı fark olduğu ise Duncan post testi kullanılarak tespit edildi ($p<0.05$). Analizi yapılan bir parametrede bitki numuneleri arasındaki kıyaslamalar sonucu olarak ortaya çıkan istatistiki farklılıklar üst simge (^{a, b, c, ...}) halinde verilerin sağ üst kısmında gösterildi.

SONUÇ VE TARTIŞMA

Makroskobik ve Mikroskobik İnceleme Sonuçları

Yapılan makroskobik inceleme sonucunda; A, F ve G örneklerinin küflenmiş; C ve H örneklerinin böceklenmiş olduğu; A, C, D, E, F, G, I, J ve K örneklerinin bitkinin meyve durumlarını içerdiği (önceki yıldan kalma meyveli dallar); A, D, E, F, G, I, J ve K örneklerinin farklı bitkilere ait parçalar içerdiği; A, B, C, G, J, K ve L örneklerinin taş parçaları içerdiği saptanmıştır (Şekil 1).

Yapılan mikroskobik incelemede; kloralhidrat reaktifi ile incelenen A, B, C, E, F, G, I, J ve L örneklerinde hiperisin taşıyan salgı bezi görülürken, D, H ve K örneklerinde rastlanmamıştır. Tüm örneklerde polen görülmüştür. Buna ek olarak örneklerdeki odun borusu hem kloralhidrat reaktifi ile hem de Sartur reaktifi ile incelenmiştir (Şekil 1).



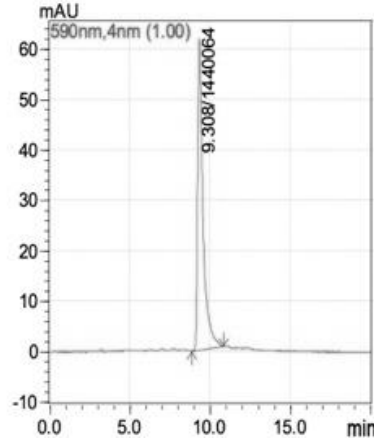
Şekil 1. Örneklerin makroskobik ve mikroskobik görüntüsü. a: hiperisin taşıyan salgı bezi; b: polen hücresi; c: odun borusu

Mikrobiyal Üreme Testi

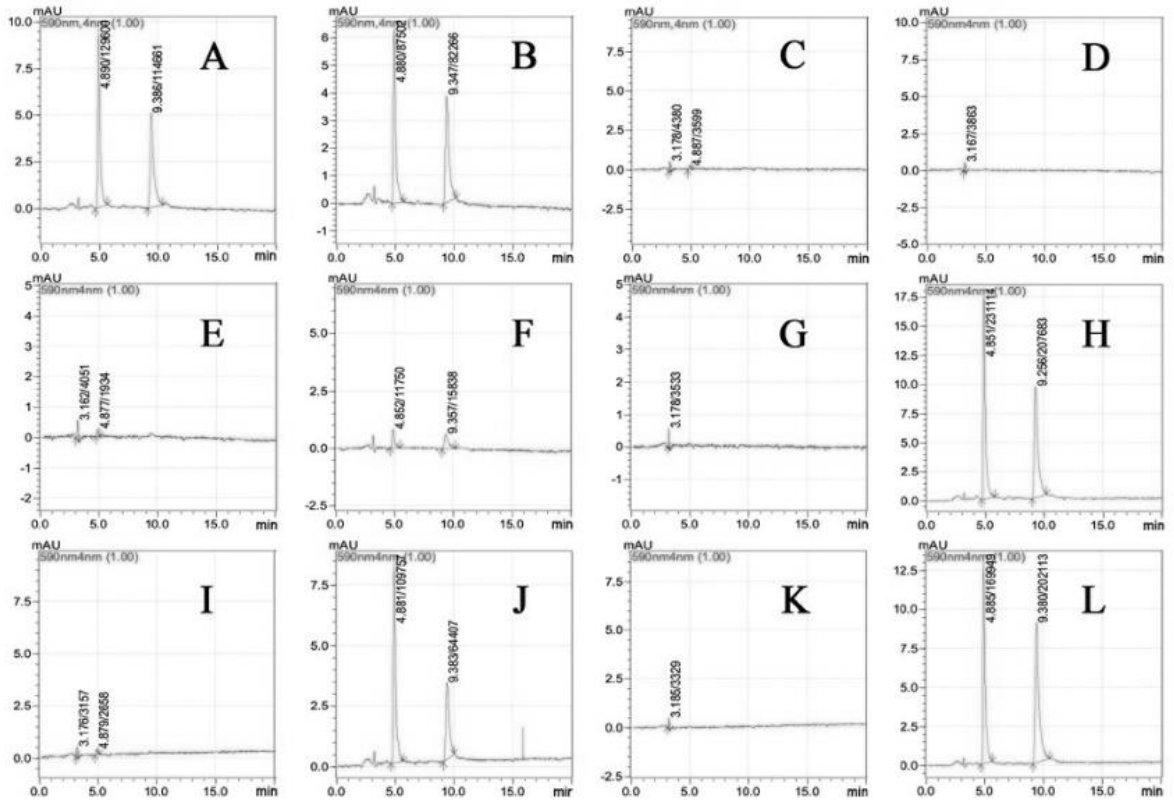
Yapılan test sonuçlarında TSA ve Saboroud besiyerlerinde mikroorganizma üremesine rastlanmamıştır. Bu durumun test edilen bitkisel drogların antimikrobiyal etkisinden kaynaklanabileceği ya da olası bir koruyucu maddenin depolanma süresini uzatmak amacıyla bitkisel droglara ilave edildiği şeklinde yorumlanmıştır [14].

Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografisi ile Hiperisin Analizi Sonuçları

Hiperisin standardının retansiyon zamanı 9.3 dak olarak belirlenmiştir (Şekil 2). Örnekler ait ekstraktların içeriğinde hiperisin varlığı bu retansiyon zamanı ve hiperisinin (PDA) kromatogramı esas alınarak kalitatif olarak değerlendirilmiştir (Şekil 3).



Şekil 2. Hiperisin standardına ait PDA kromatogramı (Hiperisin standardına ait retansiyon zamanı: 9.308 dak)



Şekil 3. Örneklere ait PDA kromatogramı (Örneklere ait retansiyon zamanları; A için 9,386 dk.; B için 9,347 dk.; C için tespit edilemedi; D için tespit edilemedi; E için tespit edilemedi; F için 9,357 dk.; G için tespit edilemedi; H için 9,256 dk.; I için tespit edilemedi; J için 9,383 dk.; K için için tespit edilemedi; L için 9,380 dk. olarak hesaplanmıştır.)

Kül ve Nem Miktar Tayini Sonuçları

Yapılan analiz sonucunda elde edilen veriler Tablo 1’de verilmiştir.

Tablo 1. Kül ve nem miktar tayini sonuçları

ÖRNEK	KÜL MİKTAR TAYİNİ SONUCU	NEM MİKTAR TAYİNİ SONUCU	ÖRNEK	KÜL MİKTAR TAYİNİ SONUCU	NEM MİKTAR TAYİNİ SONUCU
A	%3,66	%8,55	G	%6,28	%7,87
B	%7,48	%17,02	H	%4,13	%7,74
C	%6,81	%8,70	I	%5,58	%7,58
D	%7,12	%7,95	J	%5,44	%7,61
E	%5,87	%8,10	K	%6,52	%7,97
F	%4,95	%7,82	L	%3,18	%7,49

Total Antioksidan Statü (TAS), Total Oksidan Statü (TOS) ve Oksidatif stres indeksinin (OSI) ve Mineral Madde Düzeylerinin Belirlenmesi

Elde edilen bulgular farklı aktarlardan alınan 12 farklı Hyperici herba drogunun TAS düzeyleri arasında istatistiki farklılık olmadığını göstermektedir. Bununla birlikte bir bitkideki oksidan madde miktarının göstergesi olarak ifade edilebilecek TOS düzeylerinde ise istatistiki düzeyde farklılıklar olduğu söylenebilir (Tablo 2). Fitoterapötik bitkilerde her ne kadar antioksidan etkili bileşikler bulunsa da, stres oluşturabilecek oksidanlar da belirli miktarda bulunmaktadır. Fitoterapötik amaçla kullanılacak olan bitkide oksidan madde seviyelerinin az olması, bitkinin fitoterapötik amaçla kullanan organizma tarafından kolayca tolere edilebilmesini sağlar. Bu da bitki türlerinin antioksidan etkili bileşenlerinin etkilerinin daha güçlü bir şekilde ortaya çıkması açısından önemlidir.

Tablo 2. Örneklerin TAS, TOS, OSI seviyeleri

Örnek	TAS (mmol Troloks Ekvivalan/L)	TOS ($\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ Ekvivalan/L)	OSI (keyfi birim)
A	2,39 \pm 0,04	88,62 \pm 3,48 ^e	3718,33 \pm 193,35 ^e
B	2,34 \pm 0,09	200,51 \pm 7,86 ^f	8562,47 \pm 43,20 ^g
C	2,37 \pm 0,08	33,64 \pm 6,08 ^a	1418,47 \pm 222,95 ^{a,d}
D	2,20 \pm 0,15	76,10 \pm 3,92 ^d	3469,51 \pm 190,77 ^e
E	2,22 \pm 0,18	93,90 \pm 4,50 ^e	4249,03 \pm 490,29 ^f
F	2,30 \pm 0,03	41,85 \pm 0,31 ^a	1824,46 \pm 35,43 ^{a,b}
G	2,21 \pm 0,05	71,28 \pm 5,42 ^{b,c,d}	3229,04 \pm 294,21 ^{c,d}
H	2,27 \pm 0,05	33,74 \pm 0,58 ^a	1486,58 \pm 28,20 ^{a,b}
I	2,29 \pm 0,04	74,00 \pm 10,27 ^{c,d}	3237,67 \pm 462,41 ^{c,d}
J	2,26 \pm 0,08	43,85 \pm 4,27 ^a	1940,49 \pm 196,92 ^b
K	2,28 \pm 0,04	63,03 \pm 8,92 ^b	2758,20 \pm 369,60 ^c
L	2,32 \pm 0,08	65,64 \pm 1,86 ^{b,c}	2839,32 \pm 115,65 ^c
p	0,23	0,000	0,000

Veriler ortalama \pm standart sapma şeklinde sunulmuştur (n=3).

a,b,c,d,e,f,g :Aynı sütunda farklı üslü ifadeleri taşıyan ortalamalar arasındaki fark istatistiksel olarak önemlidir (p < 0,05).

OSI değerleri de TOS düzeyleri yüksek olan bitki örneklerinde istatistiki olarak farklı bulunmuştur. C, F, H ve J örneklerinin TOS ve OSI değerleri diğer örneklere oranla düşük bulunmuştur. Bu nedenle bu örneklerin fitoterapötik kullanımından beklenen olası fayda düzeyi daha yüksek olacaktır. Özellikle A, B ve E örneklerinde ise TOS düzeylerinin dolayısı ile OSI düzeylerinin diğer örneklere göre istatistiki düzeyde yüksek çıktığı ve bu nedenle bu örneklerin fitoterapötik kullanımından beklenen olası fayda düzeyinin düşük olabileceği düşünülebilir.

Gerçekleştirilen element analizleri sonucunda deteksiyon limiti üzerinde tespit edilebilen elementler Tablo 4 ve Tablo 5'te gösterilmiştir. Tüm örneklerde 10 elementin (Ca, Cu, Li, Mg, Mn, Sr, Ti, V, Zn, K) farklı konsantrasyonlarda bulunduğu belirlenmiştir (Tablo 4). 4 element (Cd, Cr, Ni, Al) ise bazı örneklerde var olduğu tespit edilirken bazı numunelerde ise olmadığı veya varsa bile dedeksiyon limitinin altında kaldığı belirlenmiştir (Tablo 5). Örneklerde analizi gerçekleştirilen 15 elementin (Sb, As, Be, Co, Fe, Pb, Mo, Se, Tl, Ag, B, Ba, Bi, Ga, In) ise örneklerde olmadığı veya varsa bile dedeksiyon limitinin altında kaldığı görülmüştür.

Cu, Mn ve Zn elementleri canlı vücudunda pek çok önemli biyolojik işlevleri yerine getiren eser elementlerdendir. Cu ve Zn çoğunlukla sitozolde bulunan süperoksit dismutaz (SOD1) enziminin bileşenleri iken, Mn ise mitokondriyal süperoksit dismutazın (SOD2) bir bileşenidir. Her iki enzim de oksidan/antioksidan dengenin korunmasında görev almaktadır. Cu ayrıca kemik oluşumunda Ca elementine destek olurken, demir metabolizmasında ve sentezinde rol oynamakta, sinir sisteminin düzgün olarak çalışmasında da etkisi bulunmaktadır. Zn antioksidan fonksiyonuna ek olarak endokrin sistemin düzgün çalışmasına pozitif olarak etki etmekte, özellikle tiroid ve pankreas hormonlarının metabolizmasında çeşitli görevler almaktadır. J örneğinin Mn düzeyinin diğer tüm örneklerden, yine aynı örneğin Zn seviyesinin (en yüksek Zn derişimi) diğer pek çok örnekten anlamlı şekilde yüksek olduğu belirlenmiştir. H örneğinin ise pek çok diğer bitki örneği ile anlamlı bir fark bulundurmamasına rağmen en yüksek Cu derişimine sahip olduğu gözlemlenmiştir. Bu örneğe ait Zn ve Mn düzeylerinin diğer pek çok örnekten daha yüksek olduğu belirlenmiştir. TOS ve OSI değerlerine paralel olarak H ve J örneklerinin fitoterapideki etkilerinin eser element temelinde de gerçekleşebileceğini ortaya koymaktadır. Ayrıca aynı örneklerin Al konsantrasyonlarının düşük olması, Cd seviyelerinin ve diğer ağır metallere ait derişimlerin dedeksiyon limitinin altında olması bu elementlerden kaynaklanabilecek ağır metal toksisite riskinin daha az olabileceğini de göstermektedir. B ve C örneklerine ait Al seviyesinin diğer drog örneklerinden çok daha fazla olduğu belirlenmiştir ve bu drogların uzun süreli kullanımının ağır metal toksikasyonuna neden olabileceği düşünülmektedir [24-27].

İstanbul aktarlarından alınan 12 farklı *Hypericum perforatum* örneği üzerinde yapılan makroskobik inceleme ile neredeyse tamamında gözle görülür kontaminasyona rastlandığı, bazılarının böceklenmiş olduğu, dolayısıyla drogların doğru şekilde toplanıp saklanmadığı anlaşılmıştır. Örneklerden 6 tanesinin meyveli bitkiden oluşması nedeniyle drogun yanlış zamanda toplandığı

saptanmıştır. Mikrobiyolojik analiz sonucunda besiyerinde üreme tespit edilememiştir. Bu sonuç bitkisel drogların antimikrobiyal etkisinden kaynaklanabileceği gibi, depolanma süresini uzatmak amacıyla olası bir koruyucu maddenin ilave edilme olasılığını da düşündürmektedir. Hiperisin taşıyan salgı bezlerinin mikroskopik incelemeyle görülmediği örneklerde, yüksek performanslı sıvı kromatografisi (YPSK) ile hiperisin tespit edilememiştir. Hiperisin, 12 örneğin yalnızca 6'sında saptanabilmiştir (Tablo 3). İki örneğin Al seviyesinin çok fazla olması bu drogların uzun süreli kullanımının ağır metal toksikasyonu ile sonuçlanabileceğini düşündürmektedir. Bununla birlikte aynı türe ait örneklerde TAS, TOS düzeylerinin, ağır metal ve mineral içeriğinin farklılığı, bitki türlerinin farklı bölgelerden toplanmış olması, toplanma dönemi, toplama sonrası kurutulma sürecinde yapılan muhtemel farklı uygulamalar, saklama koşullarının farklılığı gibi nedenlerle açıklanabilir.

Sonuç olarak, yapılan bu çalışma ile aktarlardan temin edilen ve analizleri yapılan drog örneklerinin standart bir kalitede olmadığı belirlenmiştir. İnsan sağlığı açısından tehdit oluşturan bu durumun önüne geçilmesi için gerekli denetimlerin yapılması ve halk sağlığının korunması adına uygun olmayan drogların satışına izin verilmemesi gerekmektedir. Halkın doğru ve kaliteli droglara ulaşabilmesi sağlanmalıdır.

Tablo 3. Makroskopik, mikroskopik inceleme ve YPSK ile hiperisin analizi sonuçları

Örnek	Mikroskopik İnceleme (Kloralhidrat ile)		YPSK ile Kalitatif Hiperisin Analizi
	Hiperisin Taşıyan Salgı Bezi	Polen	
A	+	+	+
B	+	+	+
C	+	+	-
D	-	+	-
E	+	+	-
F	+	+	+
G	+	+	-
H	-	+	+
I	+	+	-
J	+	+	+
K	-	+	-
L	+	+	+

Tablo 4. Örneklerin element seviyeleri-1

Örnek	Ca (ppm)	Cu (ppm)	K (ppm)	Li (ppm)	Mg (ppm)	Mn (ppm)	Sr (ppm)	Ti (ppm)	V (ppm)	Zn (ppm)
A	119,13 ± 15,35 ^a	9,41 ± 0,95 ^{a,b,c,d}	93,74 ± 5,02 ^a	1,85 ± 0,95 ^a	78,16 ± 3,20 ^c	70,24 ± 2,60 ^d	22,97 ± 2,28 ^{a,b}	8,02 ± 7,89 ^{a,b}	1,30 ± 1,13 ^a	44,94 ± 15,80 ^{a,b}
B	254,59 ± 3,65 ^e	8,08 ± 0,37 ^a	152,18 ± 2,49 ^{b,c,d}	5,58 ± 0,12 ^b	49,84 ± 1,0 ^b	24,16 ± 0,06 ^a	132,54 ± 2,43 ^e	20,64 ± 0,71 ^c	4,41 ± 0,02 ^d	28,87 ± 8,53 ^a
C	208,95 ± 11,80 ^{b,c,d,e}	8,61 ± 0,41 ^{a,b}	121,16 ± 8,12 ^{a,b,c}	4,94 ± 0,50 ^b	43,55 ± 3,41 ^{a,b}	39,13 ± 2,69 ^c	36,23 ± 1,98 ^{b,c}	30,37 ± 2,01 ^d	2,82 ± 0,12 ^{b,c}	42,86 ± 1,38 ^{a,b}
D	243,53 ± 0,44 ^{d,e}	8,14 ± 0,27 ^a	158,83 ± 3,23 ^{c,d}	2,52 ± 0,25 ^a	38,97 ± 2,74 ^{a,b}	29,92 ± 2,25 ^{a,b}	46,20 ± 1,38 ^c	6,43 ± 1,26 ^{a,b}	2,70 ± 0,19 ^{b,c}	33,07 ± 15,92 ^a
E	235,07 ± 12,61 ^{d,e}	9,55 ± 0,66 ^{a,b,c,d}	145,28 ± 8,75 ^{b,c,d}	2,51 ± 0,16 ^a	31,72 ± 0,62 ^{a,b}	42,38 ± 0,38 ^c	25,45 ± 0,55 ^{a,b}	12,00 ± 2,56 ^b	2,88 ± 0,01 ^{b,c}	33,03 ± 1,96 ^a
F	179,89 ± 1,95 ^{a,b,c,d}	10,00 ± 0,54 ^{a,b,c,d}	122,46 ± 2,90 ^{a,b,c}	2,42 ± 0,24 ^a	38,09 ± 3,80 ^{a,b}	37,43 ± 2,16 ^{b,c}	27,65 ± 1,43 ^{a,b}	9,35 ± 1,29 ^{a,b}	2,42 ± 0,10 ^{a,b,c}	30,23 ± 1,63 ^a
G	236,92 ± 4,33 ^{d,e}	12,42 ± 0,37 ^{c,d}	161,62 ± 4,34 ^d	2,33 ± 0,12 ^a	31,58 ± 0,59 ^{a,b}	22,75 ± 0,45 ^a	35,29 ± 0,72 ^{b,c}	7,31 ± 1,07 ^{a,b}	3,21 ± 0,05 ^c	42,37 ± 0,76 ^{a,b}
H	137,03 ± 8,94 ^{a,b}	12,54 ± 0,08 ^d	114,65 ± 4,23 ^{a,b}	1,49 ± 0,19 ^a	48,33 ± 7,43 ^{a,b}	43,60 ± 3,87 ^c	17,71 ± 0,63 ^a	5,66 ± 0,66 ^{a,b}	2,01 ± 0,07 ^{a,b,c}	44,50 ± 3,11 ^{a,b}
I	219,78 ± 13,64 ^{c,d,e}	11,21 ± 0,89 ^{a,b,c,d}	140,99 ± 8,53 ^{b,c,d}	1,99 ± 0,20 ^a	26,87 ± 2,88 ^a	37,75 ± 2,39 ^{b,c}	26,77 ± 1,39 ^{a,b}	9,77 ± 0,69 ^{a,b}	2,75 ± 0,18 ^{b,c}	36,13 ± 8,75 ^a
J	184,21 ± 17,33 ^{a,b,c,d,e}	9,17 ± 1,04 ^{a,b,c}	124,56 ± 8,72 ^{a,b,c,d}	2,44 ± 0,27 ^a	34,32 ± 10,50 ^{a,b}	114,91 ± 12,64 ^e	59,97 ± 7,10 ^d	9,41 ± 0,88 ^{a,b}	2,84 ± 0,20 ^{b,c}	53,98 ± 7,87 ^b
K	193,14 ± 90,31 ^{b,c,d,e}	9,17 ± 3,54 ^{a,b,c}	149,86 ± 51,62 ^{b,c,d}	2,48 ± 1,29 ^a	38,79 ± 30,67 ^{a,b}	30,29 ± 7,16 ^{a,b}	32,16 ± 18,32 ^{a,b,c}	9,05 ± 6,42 ^{a,b}	2,77 ± 1,62 ^{b,c}	30,29 ± 6,05 ^a
L	150,12 ± 90,12 ^{a,b,c}	11,62 ± 4,31 ^{b,c,d}	119,74 ± 39,33 ^{a,b}	1,65 ± 1,24 ^a	49,34 ± 21,44 ^{a,b}	26,72 ± 3,54 ^a	22,64 ± 19,45 ^{a,b}	3,97 ± 3,11 ^a	1,66 ± 1,13 ^{a,b}	36,06 ± 10,45 ^a

Veriler ortalama ± standart sapma şeklinde sunulmuştur (n=3).

a,b,c,d,e :Aynı sütunda farklı üslü ifadeleri taşıyan ortalamalar arasındaki fark istatistiksel olarak önemlidir (p < 0,05). Numunelerde analizi gerçekleştirilen 15 elementin (Sb, As, Be, Co, Fe, Pb, Mo, Se, Tl, Ag, B, Ba, Bi, Ga, In) ise numunelerde olmadığı veya varsa bile deteksiyon limitinin altında kaldığı belirlenmiştir.

Tablo 5. Örneklerin element seviyeleri-2

Örnek	Al (ppm)	Cd (ppm)	Cr (ppm)	Ni (ppm)
A	3,27 ± 4,77	-	-	1,73 ± 1,19
B	24,97 ± 2,05	-	1,66 ± 0,15	3,18 ± 0,21
C	20,88 ± 1,41	2,01 ± 0,13	1,51 ± 0,08	1,43 ± 0,27
D	3,32 ± 1,23	-	-	2,60 ± 0,35
E	6,97 ± 1,71	0,48 ± 0,04	0,63 ± 0,13	2,25 ± 2,11
F	6,74 ± 1,81	-	-	-
G	2,84 ± 0,41	0,75 ± 0,09	1,54 ± 0,20	3,34 ± 0,46
H	1,83 ± 0,61	-	0,52 ± 0,04	1,11 ± 0,13
I	2,99 ± 0,30	-	0,58 ± 0,09	0,75 ± 0,08
J	3,87 ± 0,88	-	0,48 ± 0,01	0,82 ± 0,09
K	7,44 ± 1,24	-	0,81 ± 0,18	1,08 ± 0,04
L	-	-	-	0,74 ± 0,18

Veriler ortalama ± standart sapma şeklinde sunulmuştur (n=3). Numunelerde analizi gerçekleştirilen 15 elementin (Sb, As, Be, Co, Fe, Pb, Mo, Se, Tl, Ag, B, Ba, Bi, Ga, In) ise numunelerde olmadığı veya varsa bile deteksiyon limitinin altında kaldığı belirlenmiştir.

TEŞEKKÜR

Bu çalışmamız, konunun önerilmesinden tezin sonuçlanmasına kadar Sevgili Hocamız Prof. Dr. Afife MAT'ın desteğiyle yürütülmüştür. Hocamıza, bilimsel ve manevi katkılarından ötürü çok teşekkür ediyor, bilgi birikiminden ve tecrübelerinden birçok öğrencinin faydalanacağı güzel bir emeklilik hayatı diliyoruz.

KAYNAKLAR

1. Baytop, T. (1999). Türkiye'de Bitkilerle Tedavi, Nobel Tıp Kitabevi, İstanbul, p. 13-62.
2. Baytop, T. (2001). Türk Eczacılık Tarihi, İstanbul Üniversitesi Yayınları, İstanbul, p. 9-29.
3. Eroğlu Özkan, E. (2011). Drosanthe ve Taeniocarpium Seksiyonlarına ait bazı endemik *Hypericum* türlerinin kimyasal bileşimi ve biyolojik aktivite yönünden incelenmesi. (Doktora). İstanbul Üniversitesi, İstanbul.
4. Verpoorte, R. (2009). Medicinal plants: a renewable resource for novel leads and drugs In Ramawat, K.G., Sukhadia, M.L. (Eds.), Herbal drugs: Ethnomedicine to Modern Medicine (pp. 1-5). Berlin Heidelberg: Springer-Verlag.
5. Bilia, A.R., Gallori, S., Vincieri, F.F. (2002). St. John's wort and depression: efficacy, safety and tolerability-an update. *Life Sciences*, 70(26), 3077-3096.
6. Patocka, J. (2003). The chemistry, pharmacology, and toxicology of the biologically active constituents of the herb *Hypericum perforatum* L. *Journal of Applied Biomedicine*, 1(2), 61-70.
7. European Pharmacopoeia (7th edition) (2011). St. John's Wort (*Hyperici herba*), volume 1, 1241-1244. Council of Europe, Strasbourg, France.

8. Baytop, T. (1980). Farmakognozi Ders Kitabı, Fatih Yayınevi Matbaası, İstanbul, p. 202.
9. Baytop, T. (2007). Türkçe Bitki Adları Sözlüğü, Türk Dil Kurumu Yayınları, Ankara, p. 152.
10. Hostettmann, K., Wolfender, J.L. (2005). Phytochemistry. In Müller, W.E. (Ed.), St. John's Wort and its active principles in depression and anxiety. Frankfurt: Birkhäuser Verlag.
11. Robson, N.K.B. (2003). Hypericum botany. In Ernst, E. (Ed.), Hypericum–The genus Hypericum (pp. 1–22). London, New York: Taylor and Francis.
12. Greeson, J.M., Sanford, B., Monti, D.A. (2001). St. John's wort (*Hypericum perforatum*): A review of the current pharmacological, toxicological, and clinical literature. *Psychopharmacology*, 153(4), 402-414.
13. Barnes, J., Anderson, L.A., Phillipson, J.D. (2007). St John's Wort. In Barnes, J., Anderson, L.A., Phillipson, J.D. (Eds.), Herbal Medicines (3. Baskı ed.). London: Pharmaceutical Press.
14. Harrigan, W.F., McCance, M.E. (2014). Laboratory Methods In Microbiology, Academic Press, p. 1-374.
15. Ozkan, E.E., Ozden, T.Y., Ozsoy, N., Mat, A. (2018). Evaluation of chemical composition, antioxidant and anti-acetylcholinesterase activities of *Hypericum neurocalycinum* and *Hypericum malatyanum*. *South African Journal of Botany*, 114, 104-110.
16. Radulović, N., Stankov-Jovanović, V., Stojanović, G., Šmelcerović, A., Spiteller, M., Asakawa, Y. (2007). Screening of in vitro antimicrobial and antioxidant activity of nine *Hypericum* species from the Balkans. *Food Chemistry*, 103(1), 15-21.
17. Trovato, A., Raneri, E., Kouladis, M., Tzakou, O., Taviano, M.F., Galati, E.M. (2001). Anti-inflammatory and analgesic activity of *Hypericum empetrifolium* Willd. (Guttiferae). *Il Farmaco*, 56(5-7), 455-7.
18. European Pharmacopoeia (7th edition) (2011). Loss on Drying, volume 1, 51. Council of Europe, Strasbourg, France.
19. Council of Europe. (2007). Guide for the Elaboration of Monographs on Herbal Drugs and Herbal Drug Preparations, 13-14. Strasbourg, France.
20. European Pharmacopoeia (7th edition) (2011). Total Ash, volume 1, 118. Council of Europe, Strasbourg, France.
21. Hazman, Ö., Aksoy, L., A, B. (2016). Effects of crocin on experimental obesity and type-2 diabetes. *Turkish Journal of Medicinal Sciences*, 46(5), 1593-1602.
22. Hazman, Ö., Bozkurt, M.F. (2015). Anti-inflammatory and antioxidative activities of safranal in the reduction of renal dysfunction and damage that occur in diabetic nephropathy. *Inflammation*, 38(4), 1537-1545.

23. Cemek, M., Büyükokuroğlu, M.E., Hazman, Ö., Bulut, S., Konuk, M., Birdane, Y. (2011). Antioxidant enzyme and element status in heroin addiction or heroin withdrawal in rats: effect of melatonin and vitamin E plus Se. *Biological Trace Element Research*, 139(1), 41-54.
24. Baltacı, A.K., Mogulkoc, R., Baltacı, S.B. (2019). The role of zinc in the endocrine system. *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences*, 32(1), 231-239.
25. Hordyjewska, A., Popiołek, Ł., Kocot, J. (2014). The many “faces” of copper in medicine and treatment. *Biometals*, 27(4), 611-621.
26. Li, L., Yang, X. (2018). The essential element manganese, oxidative stress, and metabolic diseases: links and interactions. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2018.
27. Olechnowicz, J., Tinkov, A., Skalny, A., Suliburska, J. (2018). Zinc status is associated with inflammation, oxidative stress, lipid, and glucose metabolism. *The Journal of Physiological Sciences*, 68(1), 19-31.



APOPTOTIC AND CYTOTOXIC EFFECT OF *ORIGANUM MINUTIFLORUM* ON NB2A NEUROBLASTOMA CELLS

ORIGANUM MINUTIFLORUM'UN NB2A NÖROBLASTOMA HÜCRELERİNE
APOPTOTİK VE SİTOTOKSİK ETKİSİ

İsmail SARI^{1*}, Gonca DONMEZ ARAT², Oktay OZKAN³, Işıl AYDEMİR⁴, Caner OZBEY⁵,
M. İbrahim TUĞLU⁶

¹Department of Medicinal Biochemistry, Faculty of Medicine, Niğde Ömer Halisdemir University,
Niğde, 51000, Turkey

²Department of Medicinal Biology, Faculty of Medicine, Niğde Ömer Halisdemir University, Niğde,
51000, Turkey

³Department of Medicinal Pharmacology, Faculty of Medicine, Niğde Ömer Halisdemir University,
Niğde, 51000, Turkey

⁴Department of Histology and Embryology, Faculty of Medicine, Niğde Ömer Halisdemir University,
Niğde, 51000, Turkey

⁵Department of Pathology, Faculty of Medicine, Faculty of Medicine, Niğde Ömer Halisdemir
University, Niğde, 51000, Turkey

⁶Department of Histology and Embryology, Faculty of Medicine, Manisa Celal Bayar University,
Manisa 45000, Turkey

ABSTRACT

Objective: *The aim of the present study is to investigate the cytotoxic and apoptotic effects of oregano oil from *Origanum minutiflorum*, which is an endemic medicinal plant in Turkey, on NB2a neuroblastoma cells.*

Material and Method: *Cell proliferation, apoptosis, and expression of inducible and endothelial nitric oxide synthase have been determined by MTT, TUNEL, and immunohistochemistry, respectively.*

Result and Discussion: *The cell viability was significantly decreased gradually in NB2a cells when the concentrations of both oregano oil and doxorubicin were increased. IC₅₀ doses were found to be 10.75 µl/ml for oregano oil and 5 µM for doxorubicin. Furthermore, expression of inducible and endothelial nitric oxide*

* **Corresponding Author / Sorumlu Yazar:** İsmail Sari
e-mail / e-posta: smlsr@hotmail.com, **Phone / Tel.:** +90 388 225 25 83

synthase, also the number of apoptotic cells was significantly enhanced in NB2a cells after treatment with oregano oil and doxorubicin. There was a remarkable increase in inducible and endothelial nitric oxide synthase expression levels and in the number of apoptotic cells by the dual application of these agents. In addition, oregano oil enhanced the apoptotic effect of doxorubicin. In conclusion, our results indicated that oregano oil of *O. minutiflorum* has a cytotoxic and apoptotic effect on NB2a cells and these effects may be related to its enhancing effects on inducible and endothelial nitric oxide synthase levels.

Keywords: apoptosis, cytotoxicity, neuroblastoma, nitric oxide synthase, *Origanum minutiflorum*

ÖZ

Amaç: Bu çalışmanın amacı, Türkiye'de endemik bir tıbbi bitki olan *Origanum minutiflorum*'dan elde edilen Oregano yağının NB2a nöroblastoma hücrelerine sitotoksik ve apoptotik etkilerini incelemektir.

Gereç ve Yöntem: Hücre proliferasyonu, apoptoz, İndüklenebilir ve endotelial nitrik oksit sentazın ekspresyonu sırasıyla MTT, TUNEL ve immünohistokimya ile belirlendi.

Sonuç ve Tartışma: Hem Oregano yağı hem de doksorubisin derişimleri artırıldığında NB2a hücrelerinin canlılığı kademeli olarak azaldı. IC50 dozu Oregano yağı için 10.75 ul / ml doksorubisin için 5µM olarak belirlendi. Ayrıca, Oregano yağı ve doksorubisin ile muamele edildikten sonra NB2a hücrelerinde indüklenebilir ve endotelial nitrik oksit sentazın ekspresyonu ve apoptotik hücre sayısı anlamlı olarak yükseldi. Bu ajanların ikili uygulaması ile indüklenebilir ve endotelial nitrik oksit sentaz ekspresyon seviyelerinde ve apoptotik hücre sayısında dikkate değer bir artış olmuştur. Ek olarak, Oregano yağı, doksorubisinin apoptotik etkisini arttırmıştır. Sonuç olarak, bulgularımız *O. minutiflorum*'a ait Oregano yağının NB2a hücreleri üzerinde sitotoksik ve apoptotik bir etkiye sahip olduğuna ve bu etkilerin Oregano yağının indüklenebilir ve endotelial nitrik oksit sentaz düzeylerini artırıcı etkileri ile ilişkili olabileceğine işaret etmektedir.

Anahtar Kelimeler: apoptoz, sitotoksisite, nöroblastom, nitrik oksit sentaz, *Origanum minutiflorum*.

INTRODUCTION

Origanum minutiflorum (O. Schwarz and P.H. Davis), is an endemic species growing in the eastern Mediterranean and southwestern Anatolia region in Turkey, especially in Isparta [1,2]. This species is mostly used as a spice, herbal tea, and also traditional medicinal herb for cold and stomach aches [3]. The herbal parts of *Origanum* species are rich in essential oils that have antioxidant, antibacterial, antiviral and antifungal activities. In this context, this genus has been gained a great deal of interest in the pharmaceutical and medicinal areas [4] and these plants are largely exported to Europa [5]. In recent years, a lot of studies have been done about the chemical composition and biological activity of the *O. minutiflorum* [6-8]. Previous studies have revealed that extracts of *O. minutiflorum* have many biological and pharmacological properties, such as analgesic [9], antifungal [10], antimicrobial [8], antioxidant [11] anticancer [12] and antidiabetes [13] properties. However, few studies have focused on the cytotoxic properties of *Origanum* species [14]. To our knowledge, there are no studies that evaluate the cytotoxic effects of the extracts from *O. minutiflorum* on neuroblastoma cells. Furthermore, there are no available reports on its effects on apoptosis, inducible nitric oxide synthase (iNOS) and endothelial nitric oxide synthase (eNOS) levels.

Therefore, the main objectives of the present study are (i) to evaluate the cytotoxic activity of the extracts from *O. minutiflorum* in *in vitro* conditions (ii) to investigate the effect of its extracts on apoptosis, e-NOS and iNOS levels in neuroblastoma cells.

MATERIAL AND METHOD

Plant materials

O. minutiflorum plants used in this study were obtained from the Agriculture Faculty, Süleyman Demirel University, Isparta, Turkey. Dried oregano leaves (50 g) and tap water (250 ml) were placed in the flask (500 ml) connected to the condenser of a Clevenger hydrodistillation apparatus according to the standard procedure described in the European Pharmacopoeia [15]. The extracted oil was dried over anhydrous sodium sulfate. The extraction yield was $2.50\% \pm 0.09\%$. All kinds of essential oil were kept at refrigerator temperature (4°C) and stored in the dark when they were not in use. Before cell culture experiments, the essential oil was dissolved in 0.5% (v/v) dimethylsulfoxide (DMSO) (Sigma, USA), then filtered by sterile acrodisc filter (pore size: $0.2\ \mu\text{m}$), and further dilutions were made in 0.5% DMSO. The appropriate amount of DMSO (0.5 %) was added to DMEM in control and doxorubicin flasks.

The NB2a neuroblastoma cell line was provided from the European Collection of Cell Cultures (ECACC; cell line: 89121404). Cells were cultured in 5 % (v/v) horse serum, 5 % (v/v) fetal bovine serum (FBS), 100 units/ml penicillin, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ streptomycin and 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ gentamicin containing high glucose Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM) at 37° and 5 % CO_2 [16]. The culture media was changed once every two days.

Determination of IC_{50} dose

The IC_{50} doses of oregano oil and doxorubicin (KOCAK Farma) were defined by 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT, M5655, Sigma, Steinheim, Germany) assay. NB2a cells were seeded into 96-well (2.5×10^5 cells/well) plate for 24 h. Then, oregano oil (0, 0.1, 1, 10, 30, 100 $\mu\text{l}/\text{ml}$) and doxorubicin (0, 0.1, 1, 10, 30, 100 μM) were directly applied to the cells for 24 h. The media was removed and 100 μl of fresh media and 10 μl MTT (5 mg/ml in distilled water) was pipetted into all well and incubated for 4 h at 37°C . After incubation media with MTT was thrown away and 100 μl dimethyl sulphoxide (DMSO, A3672, AppliChem, Darmstadt, Germany) was pipetted into all well. The IC_{50} doses of agents were calculated by measuring the absorbance at 570 nm using a UV/Vis spectrophotometer multi-plate reader (ELx800UV, BioTek) [17]. Each experiment was performed at least three times.

Agents' treatments and immunocytochemistry

NB2a cells were passaged into 8-well plates at a density of 2.5×10^5 cells/per well and allowed to seed for 24 h. Cells were randomly allocated to four groups to treat with the oregano oil (IC_{50} dose, 10,75 $\mu\text{l}/\text{ml}$), doxorubicin (IC_{50} dose, 5 μM), a dual combination of these agents, and 0.5% DMSO

(Control). After 24 h of application with these agents, cells were fixed with 4 % paraformaldehyde in PBS at +4°C for 30 min. Following washing in PBS three times for 5 min, the permeabilization of cells was performed with 0.1 % Triton X-100 (A4975, AppliChem, Darmstadt, Germany) in PBS at +4° for 15 min. The 3 % hydrogen peroxide (1 08600, Merck, Darmstadt, Germany) was used to inhibit endogenous peroxidase activity. After washing in PBS, cells were incubated with primary antibodies: anti-endothelial nitric oxide synthase (eNOS, sc-654, Santa Cruz Biotechnology) and anti-inducible nitric oxide synthase (iNOS, GTX15322, Gene Tex) at +4°C overnight. Then, primary antibodies were then removed from the cells and washed with PBS.. The secondary antibodies, biotinylated secondary antibodies and peroxidase conjugated with streptavidin (Histostain kit, , Zymed, Carlsbad, USA), were applied to the cells. To make the immunoreactivities visible, the cells were incubated with diaminobenzidine/hydrogen peroxide (DAB, 00-2014, Invitrogen, CA, USA). Cells were stained with Mayer's hematoxylin (800-729-8350, ScyTek, UT, USA) for counterstaining and were covered by mounting medium (DBS, Pleasanton, USA). The images of dyed cells were taken using a camera attached (SC50, Olympus, Germany) light microscope (IX71 inverted-florescence-phase microscope) (Olympus, Japan). Antibodies were not applied to the cells for staining control. Each experiment was performed at least three times [18].

Apoptosis assay

After the application of the agents, the terminal Transferase dUTP Nick End Labeling (Promega G7130) kit was used to detect the apoptotic cells. The cells were fixed in 4 % paraformaldehyde for 30 min and washed in three times in PBS for 5 min. Then they were incubated with 0.1 % Triton X-100 (A4975, AppliChem, Darmstadt, Germany) for 15 min and washed three times in PBS. Cells were treated with 3 % hydrogen peroxide to eradicate endogenous activity and rinsed in PBS. Following the equilibration buffer for 5 min, cells were incubated with Tdt-enzyme for 1 hours at 37°C and treated with 2×SCC solution for 15 min. Secondary antibodies were performed for 45 min. DAB and Mayer's hematoxylin stainings were done, and the cells were mounted using mounting medium. An experiment was performed in triplicate and staining was examined independently by 2 histologists [19]. TUNEL positive cells were counted under an Olympus BX40 light microscope with 100 cells from randomly chosen fields. The percentage of apoptotic cells was calculated by a blinded observer as follows: 0: no apoptosis; 1: 1%–10% apoptosis; 2: 11%–25% apoptosis; 3: 26%–50% apoptosis; 4: 51%–75% apoptosis; and 5: more than 75% apoptosis [20].

Statistical analysis

The immunocytochemical staining of the cells was evaluated by two observers. In grading the staining intensity, three categories were used: weak (+), moderate (++) and, strong (+++). For iNOS

and eNOS expression, immunohistochemical reactions were assessed in three different microscopic areas of the cells. To evaluation of the expression of iNOS, eNOS in the investigated cells, the H-Score obtained by multiplying the staining intensity by the percentage of immunoreactive cells (0-100 %). The data was statistically analyzed by repeated-measures ANOVA, the Tukey-Kramer multiple comparisons test, and was given mean \pm SD. Significance level was set at $p < 0.05$.

RESULT AND DISCUSSION

To detect the IC₅₀ doses of oregano oil and doxorubicin MTT assay was performed with oregano oil (0, 0.1, 1, 10, 30, 100 μ l/ml) and doxorubicin (0, 0.1, 1, 10, 30, 100 μ M) for 24 h. Cell proliferation was decreased with increasing concentrations of agents when compared with control (non-treated group; medium with 0 μ L/mL oregano oil, 0 M doxorubicin and an appropriate amount of DMSO which is used to dissolve the essential oil). IC₅₀ doses of agents were calculated as 10.75 μ l/ml, and 5 μ M for oregano oil and doxorubicin, respectively (fig. 1).

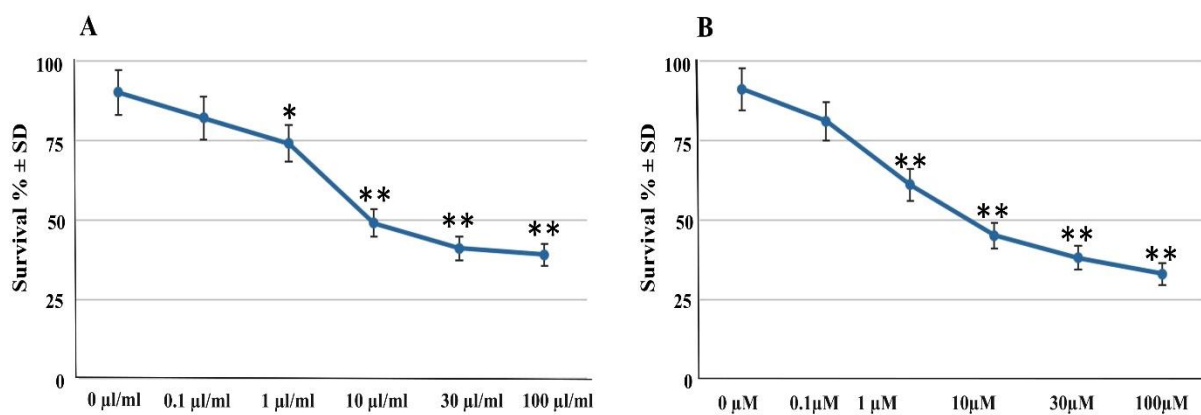


Figure 1. The percentage of cell survival of NB2a neuroblastoma cells after the application of oregano oil (A) and doxorubicin (B). Each point represents a mean \pm SD of three experiments. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ compared to control.

Immunocytochemistry and apoptosis

The immunocytochemical stainings of eNOS and iNOS were evaluated by H-score (fig. 2). The immunoreactivity of eNOS was increased in the presence of oregano oil and doxorubicin alone, a dual combination of these agents enhanced the eNOS staining significantly ($p < 0.001$) when compared with the control group (non-treated group). iNOS was notably raised by the dual application of these agents. The staining level of eNOS was lower than iNOS staining in the dual combination group (figs. 2 and 3).

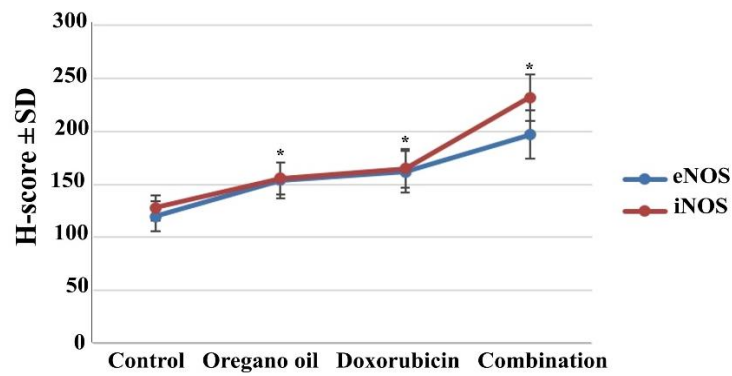


Figure 2. Immunoreactivities of eNOS and iNOS were evaluated by H-score method. —●— eNOS; —●— iNOS. H-score results were analyzed using one-way ANOVA, and asterisks indicate significant difference ($*p < 0.05$) for both iNOS and eNOS compared with control.

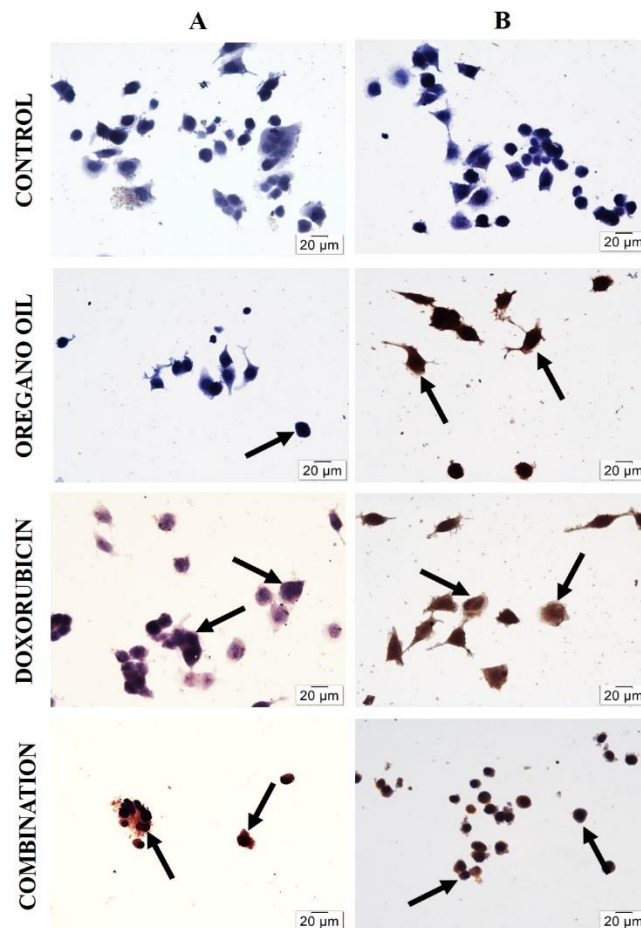


Figure 3. The distributions of eNOS (A) and iNOS (B) immunoreactivities in the NB2a neuroblastoma cells after the application of oregano oil, doxorubicin and dual combination of these agents. Arrows: immunopositive cells. Scale bars: 20 μ m.

After the TUNEL assay, the apoptotic index was calculated to determine the number of dead cells. Both the oregano oil and doxorubicin caused cell death in NB2a neuroblastoma cells. The numbers of apoptotic cells were increased significantly in the group of oregano oil and doxorubicin in comparison with the control group (non-treated group) ($p < 0.05$). In parallel with the findings of immunocytochemistry, the numbers of the apoptotic cells were the highest in the group of dual combinations of these agents (fig. 4 and Table 1).

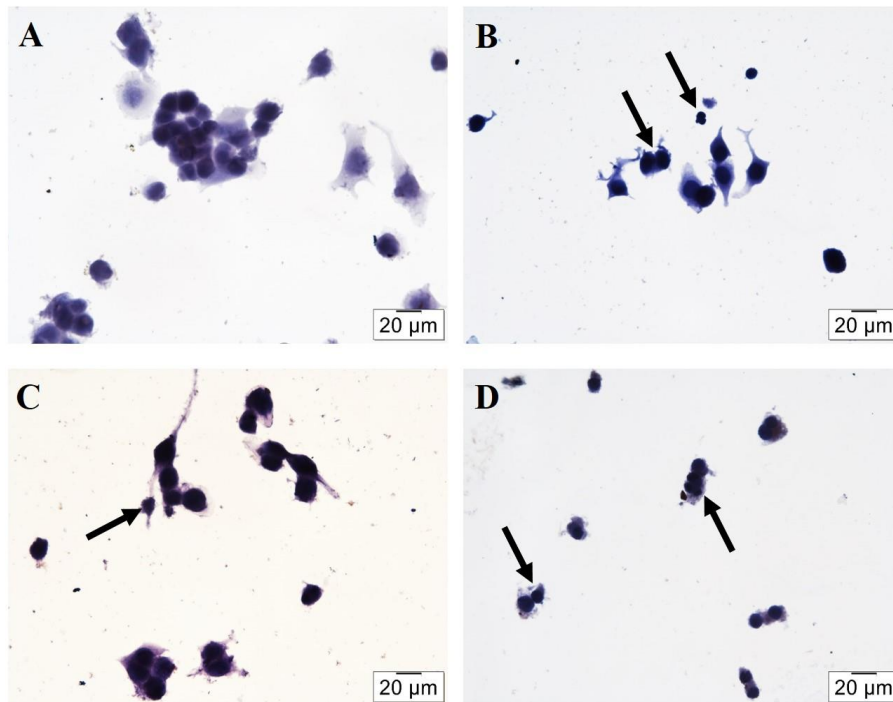


Figure 4. Apoptotic cells in different groups TUNEL staining image in the control (A), of oregano oil (B), doxorubicin (C) and combination (D) groups. Arrows: apoptotic cells. Scale bars: 20 μ m.

Table 1. Apoptotic Index After The Application Of Oregano Oil, Doxorubicin And Dual Combination Of These Agent

Group	Apoptotic index
Control	7.2 \pm 0.8
Oregano Oil	10.4 \pm 1.2*
Doxorubicin	11.1 \pm 1.4*
Combination	14.6 \pm 1.5*

* $p < 0.05$

Cancer is a leading cause of mortality worldwide and its incidence is expected to increase continuously due to the aging population [21]. Therefore, the number of studies related to the treatment, diagnosis, and prevention of cancer is increasing. In this field, researches attempting to demonstrate the anticancer, antiproliferative and apoptotic activities of different plant species' extracts are also growing progressively due to their potential applications in biological systems [22,23].

Origanum species used in folk medicine have also been widely investigated and it is found that their extracts and/or their essential oils have an antioxidant [5], anticarcinogenic [24], antigenotoxic [22], antibacterial [3] and antifungal [10] properties. *Origanum minutiflorum* is an endemic plant in Turkey among these species. Although we have knowledge about antibacterial, antifungal, antioxidant properties of *O. minutiflorum* from the data obtained from many different studies, cytotoxic effects of the extracts from *O. minutiflorum* on neuroblastoma cells has not been investigated previously. Therefore, this study was aimed to evaluate the cytotoxic effect of *O. minutiflorum* extracts on neuroblastoma cells.

Our data from the MTT assay showed that proliferation of NB2a neuroblastoma cells decreased gradually and significantly when the concentrations of both oregano oil and doxorubicin (a drug that is used in cancer therapy since long) were increased and IC₅₀ doses were 10.75 and 5 µl/ml for oregano oil and doxorubicin, respectively. These results suggested that Oregano oil of *O. minutiflorum* has a cytotoxic effect on NB2a neuroblastoma cells.

Erenler *et al.* demonstrated that *Origanum majorana*, another species of *Origanum* genus, has an anticancer activity on C6 and HeLa cell lines [25]. Furthermore, Demir *et al* reported that essential oil from *Origanum onites*, *Origanum minutiflorum* has an antigenotoxic effect and this observed effect was associated with antioxidant properties of the essential oils [22]. In addition, in many researches, it was found that the major component of the essential oil from *O. minutiflorum* was carvacrol (68.23 - 92.3 %) and the ratio of carvacrol differs according to its habitat or the subspecies of *O. minutiflorum* [6, 26]. It is suggested that the different biological effects of essential oils such as antioxidant and tumor-suppressive activities may result from the main components of *Origanum* species, especially carvacrol, thymol, p-cymene, and γ-terpinene [27, 28].

In summary, our results are consistent with previous studies [22, 25] and the cytotoxic effect of Oregano oil on NB2a neuroblastoma cells may be attributed to the primary compounds in the Oregano oil, mainly carvacrol.

In addition, we have also investigated the effect of the Oregano oil on apoptosis, eNOS and iNOS levels in NB2a neuroblastoma cells, because there is a lack of information about its effect on these parameters in NB2a neuroblastoma cells. Our results have indicated that expression of iNOS and eNOS, also the numbers of apoptotic cells have been significantly increased in NB2a neuroblastoma cells after treatment with oregano oil and doxorubicin, which is an anticancer drug that induces apoptosis. iNOS,

eNOS expression levels and the number of apoptotic cells have notably been increased by the dual application of these agents, as well. Although there is no study about the apoptotic effect of oregano oil obtained from *Origanum minutiflorum* on Nb2A cells, in some studies, it has been shown that oregano oil from different plant species induces apoptosis in different cancer cell lines such as 5RP7 and MCF-7 cells [29-31]. The results of these studies are consistent with our study results.

Nitric oxide synthases are a family of proteins catalyzing the generation of nitric oxide (NO) from L-arginine, and especially iNOS and eNOS are known to play a central role in the production of NO. NO is involved in several biological processes such as modulation of vascular tonus, regulation of immune response and nervous systems [32,33]. On the other hand, NO is a gaseous free radical, and it becomes hazardous if it is synthesized in excess. Thus, increased production of NO can cause oxidative stress and finally cellular damage [34]. From this point of view, we consider that the Oregano oil induces apoptosis via elevated levels of iNOS and eNOS, which may promote the production of NO, is a reactive nitrogen species.

In several studies, it has been reported that increased NO levels cause the induction of apoptosis and cytotoxicity. Furthermore, it has been shown that above physiological limits NO, give rise to loss of mitochondrial membrane potential and for this reason induces cytochrome c release to the cytosol [35-37]. These results support our hypothesis of a link between the cytotoxic, apoptotic effect of Oregano oil on NB2a neuroblastoma cells and elevated levels of eNOS, iNOS.

In conclusion, the current study firstly has demonstrated that Oregano oil of *O. minutiflorum* has a cytotoxic and apoptotic effect on NB2a neuroblastoma cells. Furthermore, oregano oil has enhanced the apoptotic effect of doxorubicin. In addition, oregano oil-induced the expression of iNOS and eNOS, which may produce more NO, and, finally may lead to increasing the level of reactive nitrogen species in the neuroblastoma cells. Therefore, cytotoxic and apoptotic effects of oregano oil may be attributed to its enhancing effects on iNOS and eNOS levels. Collectively, it is suggested that Oregano oil of *O. minutiflorum* may be used with doxorubicin in the treatment of cancer in order to enhance its apoptotic effect. However, further *in vivo* and *in vitro* studies are needed to evaluate the effects and underlying molecular mechanisms of the Oregano oil.

DECLARATION OF INTEREST

All authors declare that they have no conflict of interest.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors wish to thank Associate Prof. Dr. Sabri Erbaş, Agriculture Faculty, Suleyman Demirel University, Isparta, Turkey, for providing the plant material. The abstract of this work has been previously presented at the 2nd International Conference on Natural Products for Cancer Prevention and

Therapy and published in the Multidisciplinary Digital Publishing Institute Proceedings Journal, vol.1 number 10 (<https://www.mdpi.com/2504-3900/1/10/1026>).

REFERENCES

1. Oke, F., Aslim, B. (2010). Biological potentials and cytotoxicity of various extracts from endemic *Origanum minutiflorum* O. Schwarz & PH Davis. *Food and Chemical Toxicology*, 48(6), 1728-1733.
2. Kiliçgün, H., Korkmaz, M., Kılıçgün, H. (2014). Hepatoprotective and antidiabetic activity of *Origanum minutiflorum* grown wild in Turkey. *Bothalia Journal*, 44, 3.
3. Ozen, F., Ekinçi, F. Y., Korachi, M. (2014). The inhibition of *Helicobacter pylori* infected cells by *Origanum minutiflorum*. *Industrial Crops and Products*, 58, 329-334.
4. Ozkan, G., Baydar, H., Erbas, S. (2010). The influence of harvest time on essential oil composition, phenolic constituents and antioxidant properties of Turkish oregano (*Origanum onites* L.). *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 90(2), 205-209.
5. Sari AB, Ustuner-Aydal O. (2018). Antioxidant and immunostimulant effects of *Origanum minutiflorum* o. schwarz et. ph davis in rainbow trout. *Fresenius Environmental Bulletin*, 27, 1013-21.
6. Baydar, H. (2005). The effects of different harvest dates on essential oil content and essential oil composition in *Origanum minutiflorum* O. *Akdeniz Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 18(2), 175-178.
7. Dadaloğlu, I., Evrendilek, G. A. (2004). Chemical compositions and antibacterial effects of essential oils of Turkish oregano (*Origanum minutiflorum*), bay laurel (*Laurus nobilis*), Spanish lavender (*Lavandula stoechas* L.), and fennel (*Foeniculum vulgare*) on common foodborne pathogens. *Journal of agricultural and food chemistry*, 52(26), 8255-8260.
8. Vardar-Ünlü, G., Ünlü, M., Dönmez, E., Vural, N. (2007). Chemical composition and in vitro antimicrobial activity of the essential oil of *Origanum minutiflorum* O Schwarz & PH Davis. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 87(2), 255-259.
9. Fakir, H., Korkmaz, M., Icel, B. (2016). Medicinal plants traditionally used for pain alleviation in Antalya province, Turkey. *Studies on Ethno-Medicine*, 10(3), 314-324.
10. Marchese, A., Orhan, I. E., Daglia, M., Barbieri, R., Di Lorenzo, A., Nabavi, S. F., Gortzi, O., Izadi, M., Nabavi, S. M. (2016). Antibacterial and antifungal activities of thymol: A brief review of the literature. *Food chemistry*, 210, 402-414.
11. Elmastas, M., Celik, S. M., Genc, N., Aksit, H., Erenler, R., Gulcin, İ. (2018). Antioxidant activity of an Anatolian herbal tea—*Origanum minutiflorum*: isolation and characterization of its secondary metabolites. *International journal of food properties*, 21(1), 374-384.
12. Soliman, A. M., Desouky, S., Marzouk, M., Sayed, A. A. (2016). *Origanum majorana* attenuates nephrotoxicity of cisplatin anticancer drug through ameliorating oxidative stress. *Nutrients*, 8(5), 264.

13. Bower, A. M., Real Hernandez, L. M., Berhow, M. A., De Mejia, E. G. (2014). Bioactive compounds from culinary herbs inhibit a molecular target for type 2 diabetes management, dipeptidyl peptidase IV. *Journal of agricultural and food chemistry*, 62(26), 6147-6158.
14. Akyil, D., Oktay, S., Liman, R., Eren, Y., Konuk, M. (2012). Genotoxic and mutagenic effects of aqueous extract from aerial parts of *Achillea teretifolia*. *Turkish Journal of Biology*, 36(4), 441-448.
15. Franz, C., Baser, K. H. C., Windisch, W. (2010). Essential oils and aromatic plants in animal feeding—a European perspective. A review. *Flavour and Fragrance Journal*, 25(5), 327-340.
16. Smith, S. L., Fishwick, J., McLean, W. G., Edwards, G., Ward, S. A. (1997). Enhanced in vitro neurotoxicity of artemisinin derivatives in the presence of haemin. *Biochemical pharmacology*, 53(1), 5-10.
17. Deliloglu-Gurhan, I., Tuglu, I., Vatansever, H. S., Ozdal-Kurt, F., Ekren, H., Taylan, M., Sen, B. H. (2006). The effect of osteogenic medium on the adhesion of rat bone marrow stromal cell to the hydroxyapatite. *Saudi Med J*, 27(3), 305-11.
18. Özdal-Kurt, F., Tuğlu, I., Vatansever, H. S., Tong, S., Şen, B. H., Deliloğlu-Gürhan, S. I. (2016). The effect of different implant biomaterials on the behavior of canine bone marrow stromal cells during their differentiation into osteoblasts. *Biotechnic & Histochemistry*, 91(6), 412-422.
19. Tuğlu, İ., Özdal-Kurt, F., Koca, H., Sarac, A., Barut, T., Kazanç, A. (2010). The contribution of differentiated bone marrow stromal stem cell-loaded biomaterial to treatment in critical size defect model in rats. *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 16(5).
20. Mete, M., Aydemir, I., Tuglu, I. M., Selcuki, M. (2015). Neurotoxic effects of local anesthetics on the mouse neuroblastoma NB2a cell line. *Biotechnic & Histochemistry*, 90(3), 216-222.
21. Torre, L. A., Bray, F., Siegel, R. L., Ferlay, J., Lortet-Tieulent, J., Jemal, A. (2015). Global cancer statistics, 2012. *CA: a cancer journal for clinicians*, 65(2), 87-108.
22. Demir, E., Kaya, B., Marcos, R., Cenkci, S. K., Çetin, H. (2013). Investigation of the genotoxic and antigenotoxic properties of essential oils obtained from two *Origanum* species by *Drosophila* wing SMART assay. *Turkish Journal of Biology*, 37(2), 129-138.
23. Sarkar, D., Sharma, A., Talukder, G. (1994). Chlorophyll and chlorophyllin as modifiers of genotoxic effects. *Mutation Research/Reviews in Genetic Toxicology*, 318(3), 239-247.
24. Özkan, A., Erdoğan, A. (2011). A comparative evaluation of antioxidant and anticancer activity of essential oil from *Origanum onites* (Lamiaceae) and its two major phenolic components. *Turkish Journal of Biology*, 35(6), 735-742.
25. Erenler, R., Sen, O., Aksit, H., Demirtas, I., Yaglioglu, A. S., Elmastas, M., Telci, İ. (2016). Isolation and identification of chemical constituents from *Origanum majorana* and investigation of antiproliferative and antioxidant activities. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 96(3), 822-836.
26. Dadalioğlu, I., Evrendilek, G. A. (2004). Chemical compositions and antibacterial effects of essential oils of Turkish oregano (*Origanum minutiflorum*), bay laurel (*Laurus nobilis*), Spanish lavender (*Lavandula stoechas* L.), and fennel (*Foeniculum vulgare*) on common foodborne pathogens. *Journal of agricultural and food chemistry*, 52(26), 8255-8260.

27. García-Beltrán, J. M., Esteban, M. A. (2016). Properties and applications of plants of *Origanum Sp. Genus. SM. J. Biol*, 2, 1006-1015.
28. Can Baser, K. H. (2008). Biological and pharmacological activities of carvacrol and carvacrol bearing essential oils. *Current pharmaceutical design*, 14(29), 3106-3119.
29. Marrelli, M., Statti, G. A., Conforti, F. (2018). *Origanum spp.*: an update of their chemical and biological profiles. *Phytochemistry reviews*, 17(4), 873-888.
30. Kubatka, P., Kello, M., Kajo, K., Kruzliak, P., Výbohova, D., Mojžiš, J., Adamkov, SF, Lucia, V., Anthony, Z., Martin, P., Dagmar, S., Daniel, G., Pec, M. (2017). Oregano demonstrates distinct tumour-suppressive effects in the breast carcinoma model. *European journal of nutrition*, 56(3), 1303-1316.
31. Suntres, Z. E., Coccimiglio, J., Alipour, M. (2015). The bioactivity and toxicological actions of carvacrol. *Critical reviews in food science and nutrition*, 55(3), 304-318.
32. Forstermann, U., Sessa, W. C. (2012). Nitric oxide synthases: regulation and function. *Eur Heart J*, 33(7), 829-37.
33. Zhu, Y., Jiang, H., Chen, Z., Lu, B., Li, J., Peng, Y., Shen, X. (2018). The genetic association between iNOS and eNOS polymorphisms and gastric cancer risk: a meta-analysis. *OncoTargets and therapy*, 11, 2497.
34. Calabrese, V., Mancuso, C., Calvani, M., Rizzarelli, E., Butterfield, D. A., Stella, A. M. G. (2007). Nitric oxide in the central nervous system: neuroprotection versus neurotoxicity. *Nature Reviews Neuroscience*, 8(10), 766-775.
35. Hibbs, J. B., Taintor, R. R., Vavrin, Z. (1987). Macrophage cytotoxicity: role for L-arginine deiminase and imino nitrogen oxidation to nitrite. *Science*, 235(4787), 473-476.
36. Brookes, P. S., Salinas, E. P., Darley-Usmar, K., Eiserich, J. P., Freeman, B. A., Darley-Usmar, V. M., Anderson, P. G. (2000). Concentration-dependent effects of nitric oxide on mitochondrial permeability transition and cytochrome crelease. *Journal of Biological Chemistry*, 275(27), 20474-20479.
37. Moriya, R., Uehara, T., Nomura, Y. (2000). Mechanism of nitric oxide-induced apoptosis in human neuroblastoma SH-SY5Y cells. *FEBS letters*, 484(3), 253-260.



COUSINIA CASS. CİNSİNİN GELENEKSEL KULLANIMI, FİTOKİMYASAL İÇERİĞİ VE BİYOLOJİK ETKİLERİ

TRADITIONAL USAGE, PHYTOCHEMICAL COMPOSITIONS AND BIOLOGICAL
ACTIVITIES OF COUSINIA CASS. GENUS

Leyla PAŞAYEVA^{1,*}, Ayşe Cemre KARARENK², Müberra KOŞAR³

¹Erciyes Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmakognozi Anabilim Dalı, 38039, Kayseri, Türkiye

²Erciyes Üniversitesi, Eczacılık fakültesi, Farmakognozi Anabilim Dalı, 38039, Kayseri, Türkiye

³Doğu Akdeniz Üniveritesi, Eczacılık Fakültesi, Gazimağusa, Kuzey Kıbrıs Türk Cumhuriyeti

ÖZ

Amaç: *Cousinia* türlerinin Türkiye’de çok sayıda bulunması ve endemizm oranının yüksek olması nedeniyle, bu derlemede, cinsine dahil olan türlerin hem biyolojik etkileri hem de biyoaktif bileşikleri açısından ele alınması amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem: Bu çalışmada literatür verilerini daha kapsamlı ve ayrıntılı şekilde derlemek amacıyla sağlık alanındaki bilimsel kaynakları içeren veri tabanlarında tarama yapılmıştır. Elektronik aramalar PubMed, Web of Science, SciFinder, ScienceDirect, Google Akademik veri bankalarında 1966-2019 yıl aralığı seçilerek yapılmıştır.

Sonuç ve Tartışma: Günümüzde birçok sentetik ilacın yan etki ve etkileşimlerinden dolayı çeşitli hastalıkların tedavisinde kullanımında zorlukların olduğu bilinmektedir. Öte yandan uygulama alanının genişliği, terapötik etkinliği ve düşük toksisitesi ile bitkisel ilaçlar her zaman dikkat çekmekte ve üzerinde yapılan çalışmalar giderek artmaktadır. *Cousinia* cinsine dahil olan türler eskiden beri halk arasında ülser, romatizma ve solunum yolu hastalıklarında kullanılmaktadır. Yapılan biyolojik etki çalışmaları ile türlerin sitotoksik, antikanser, hipnotik, antibakteriyel etkileri kanıtlanmıştır. Bunun yanında türler üzerinde yapılan fitokimyasal araştırmalar incelendiğinde flavonoid, seskiterpen lakton, triterpenik ve steroid yapıda bileşikler içerdiği görülmüştür. Bu çalışma ile cinsin sahip olduğu geniş biyolojik etki kapasitesi ve zengin fitokimyasal içeriğe sahip olmasına rağmen hala ülkemiz için endemik türlerin detaylı bir şekilde araştırılmadığı sonucuna varılmıştır. Bu türlerin ayrıntılı şekilde incelenmesinin hem toplum sağlığına hem de ulusal ekonomiye katkıda bulunulacağı düşünülmektedir.

Anahtar Kelimeler: biyolojik etki, *Cousinia*, geleneksel kullanım, kimyasal içerik.

* Sorumlu Yazar / Corresponding Author: Leyla Paşayeva
e-posta / e-mail: leylapasayeva@erciyes.edu.tr, Tel. / Phone: +90 352 207 6666

ABSTRACT

Objective: *Cousinia* is a large and widespined genus and shows remarkable rate of endemism in Turkey. This study aims at reviewing a biological activities and bioactive compounds of species of this genus.

Material and Method: In order to compile the literature data more comprehensive and detailed, the databases were searched in the field of health science. An electronic search was carried out in PubMed, Web of Science, SciFinder, ScienceDirect, Google Scholar for articles, which published in 1966-2019 years.

Result and Discussion: It is known some difficulties of synthetic drugs use in cancer therapy because of side effects and interactions nowadays. On the other hand, because of their wide application, therapeutic efficacy and low toxicity of herbal drugs is more important on anticancer studies and they are on improving. Some species of this genus were traditionally used for treatment of various disorders as respiratory problems, ulcers, rheumatism and inflammation. Based on previous studies cytotoxic, antibacterial and hypnotic activity of different *Cousinia* species were reported. To date, sesquiterpene lactones, triterpenes, steroids and flavonoids have been isolated from *Cousinia* species. In the light of all these data, it was concluded that the genus has a wide biological effect capacity and rich phytochemical content, but endemic species are not investigated in detail, yet. It is thought that, the detailed investigation of these species will be contribute to both public health and national economy.

Keywords: biological activity, *Cousinia*, phytochemical composition, traditional use

GİRİŞ

Bitkisel ilaçlar, geleneksel olarak kabul edilebilirlikleri ve daha az yan etkileri nedeniyle binlerce yıldır çeşitli hastalıkların tedavisinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Sentetik ilaçların istenmeyen etkilerinin sıklıkla görülmesi de insanları bitkisel tedaviye yönlendirmektedir. Bitkisel tedavideki toplu farmakolojik etki yan etkileri düşürdüğü için hastaların ilgisi bu alanda yoğunlaşmakta ve bu da araştırmacıları bitkilerle ilgili daha detaylı çalışmalar yapmaya yönlendirmektedir.

Asteraceae familyası bitkiler aleminin antikanser, antibakteriyel, antiinflamatuvar gibi çeşitli biyolojik aktivitelere sahip bileşiklerini içeren türlerine sahip familyası olup bu türlerin yaklaşık 291 kadarının halk arasında çeşitli hastalıkların tedavisinde kullanıldığı bilinmektedir [1]. Bu familyaya dahil olan cinslerden biri *Cousinia* Cass. cinsidir. Bu cins *Senecio* L. ve *Vernonia* Schreb. cinslerinden sonra Asteraceae familyasının üçüncü büyük, Cardueae tribusunun ise en büyük cinsidir [2-4] ve çiçekli bitkilerin en büyük ilk 50 cinsi arasında yer almaktadır [5]. Bu cins Güneybatı Asya ve Orta Asya'da yayılış gösteren 600'den fazla türe sahiptir. İstisnai olarak nispeten daha dar bir alanda yayılış gösteren birçok türü ihtiva etmektedir. Rechinger (1986)'e göre *Cousinia* cinsi eşsiz bir farklılaşma derecesine sahiptir ve bu cins sınırlı bir yayılış alanında yüksek oranda tür sayısına sahip olması bakımından tektir. Türkiye Florası'nda *Cousinia* cinsini Huber-Morath yazmıştır. Türkiye'de bu cins 6 seksiyon içerisinde toplam 39 tür ile temsil edilmekte ve bunların 26'sı endemiktir [4, 6, 7].

Çalışmada *Cousinia* türlerinin seçilme nedeni bu türler üzerinde şimdiye kadar yapılan

biyolojik aktivite ve fitokimyasal çalışmaları ortaya çıkarmak ve Türkiye'ye endemik türlerin araştırılmasına yön vererek hem ülke ekonomisine hem de toplum sağlığına katkı sağlamaktır.

GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışmada *Cousinia* cinsinin botanik özelliklerinin yanı sıra, cinse dahil olan türler üzerinde 1966-2019 yılları arasında yapılan biyolojik etki ve fitokimyasal çalışmalar farklı veritabanlarında taranarak (PubMed, Web of Science, SciFinder, ScienceDirect, Google Akademik) derlenmiştir.

Cousinia Cinsinin Botanik Özellikleri

Cinse dahil olan türler iki yıllık veya çok yıllık dikenli otlar olup çoğu zaman taban kısmı odunsu, çatalımsı dallanmış, üstte şemsiyemsi salkım, \pm çok başlı, çok kere örümcek ağımsı-yünlü veya tomentoz ve çoğu zaman az çok çıplaklaşan, nadiren tüysüzdürler. Yapraklar çoğu derimsi, batıcı veya dikenli, dişli, loplul, pinnatifit veya pinnatifid, çoğu zaman kayıcı ve bu suretle gövde kanatlıdır. Kapitulumdaki bütün çiçekler aynı eşeyde, diskoittir. İnvolukrum silindirselden küremsiyeye kadar; involukrum braktelleri çoklu, sert, kiremitsi, diken ya da dikensi dişlidir. Reseptakulum yoğun kılçıklı-palealı, düz ya da kısa sakallı kıllara sahip olup, çiçekler hermofrodit, sarı veya morumsu kırmızı, nadiren beyazdır. Akenler çıplak, ters yumurtamsı, \pm yassı, tepesi dairemsi veya kesik, çoğu zaman \pm bariz olarak küçük dişli kenarlıdır. Papus tüyleri pürüzlü, serbest kolayca düşücüdür [6].

Türkiye'de *Cousinia* cinsi 6 seksiyon içerisinde toplam 39 tür ile temsil edilmekte ve bunların 26'sı endemiktir (Tablo 1).

Tablo 1. *Cousinia* cinsine ait seksiyon ve türler.

Seksiyon adı	Tür adı	Kaynak
Sphaerocephalae Bunge	* <i>C. satdagensis</i> Hub.-Mor.	
Cousinia Cass.	<i>C. aleppica</i> Boiss.	[4, 6, 7]
	* <i>C. aucheri</i> DC.	
	* <i>C. bicolor</i> Freyn & Sint.	
	* <i>C. birandiana</i> Hub.-Mor.	
	<i>C. brachyptera</i> DC.	
	* <i>C. caesarea</i> Boiss. & Bal.	
	* <i>C. cataonica</i> Boiss. & Hausskn.	
	* <i>C. cirsioides</i> Boiss. & Bal.	
	* <i>C. decolorans</i> Freyn & Sint.	
	* <i>C. eleonora</i> Hub.-Mor.	
	* <i>C. ermenekensis</i> Hub.-Mor.	
	* <i>C. euphratica</i> Hub.-Mor.	
	* <i>C. halysensis</i> Hub.-Mor.	
	* <i>C. humilis</i> Boiss.	
* <i>C. iconica</i> Hub.-Mor.		
* <i>C. intertexta</i> Freyn & Sint.		

Tablo 1. 'in devamı.

Seksiyon adı	Tür adı	Kaynak
Cousinia Cass.	* <i>C. nabelekii</i> Bornm. * <i>C. sintenisii</i> Freyn. * <i>C. sivasica</i> Hub.-Mor. * <i>C. stapfiana</i> Freyn & Sint. <i>C. urumiensis</i> Bornm. * <i>C. woronowii</i> Bornm. • <i>C. araratica</i> Azn. • <i>C. fedorovi</i> Takht. • <i>C. orientalis</i> (Adams) C. Koch	[4, 6, 7]
Stenocephalae Bunge.	* <i>C. davisiana</i> Hub.-Mor. * <i>C. foliosa</i> Boiss. & Bal. <i>C. ramosissima</i> DC. <i>C. stenocephala</i> Boiss.	
Leiocaules Bunge.	<i>C. boissieri</i> Buhse	
Cynaroidae Bunge.	<i>C. aintebensis</i> Boiss. & Hausskn. <i>C. arbelensis</i> C.Winkler & Bornm., * <i>C. birecikensis</i> Hub.-Mor., <i>C. canescens</i> DC., * <i>C. eriocephala</i> Boiss. & Hausskn., <i>C. grandis</i> C.A.Meyer, * <i>C. hakkarica</i> Hub.-Mor., * <i>C. vanensis</i> Hub.-Mor.	
Pugioniferae Bunge.	<i>C. macroptera</i> C.A.Meyer <i>C. wesheni</i> Post	
Tenella Bunge.	• <i>C. tenella</i> Fisch. & Mey.	

*Türkiye'ye endemik, • şüpheli kaydedilen türler

Cousinia türlerinin halk arasında kullanımı

C. thomsonii C. B. Clarke kökünden elde edilen tozun halk arasında şişlik ve eklem ağrılarının tedavisinde kullanıldığı bildirilmektedir. Aynı türün yapraklarından elde edilen tozun ise kağıt arasına doldurularak sigara şekline getirildikten sonra yakılarak vücudun belli bölgelerine 2-3 kere 5-6 gün boyunca dokundurduğunda vücut ağrılarını giderdiği bildirilmektedir [8].

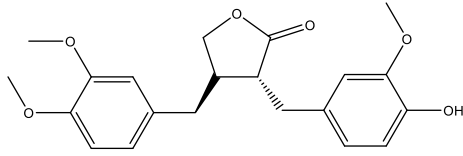
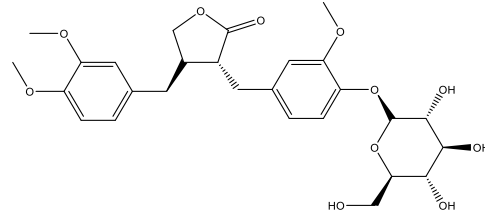
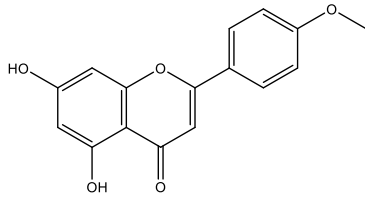
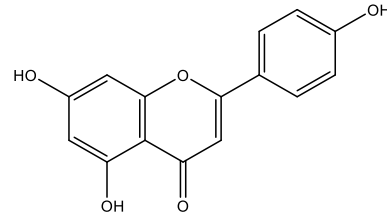
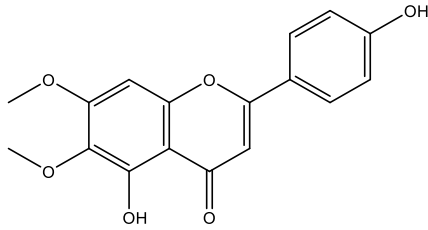
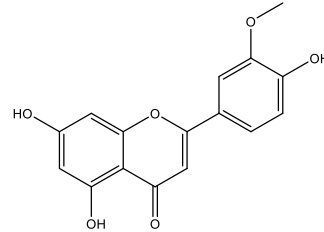
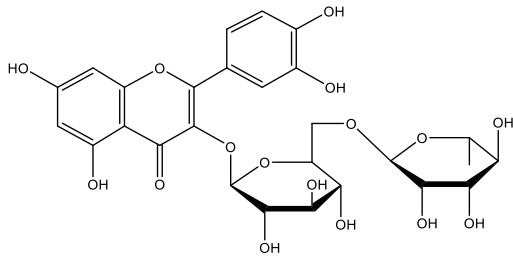
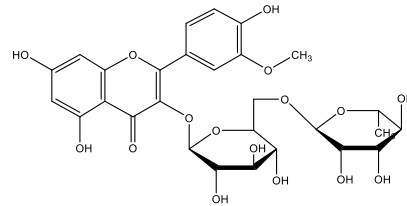
C. microcarpa Boiss. bitkisinin köklerinin İran'da yerli halk tarafından solunum problemleri, pulmoner enfeksiyonlar, ağız ülseri, diş ağrısı, romatizma gibi birçok hastalığın tedavisinde, ayrıca ağrıkesici ve yaraların iyileştirilmesinde kullanıldığı gösterilmiştir [9].

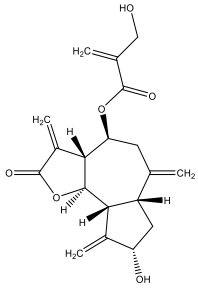
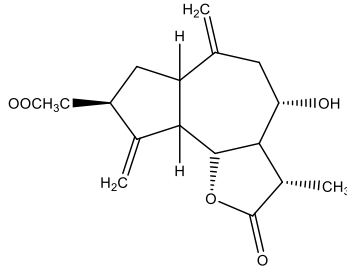
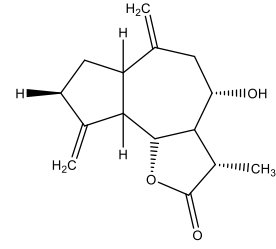
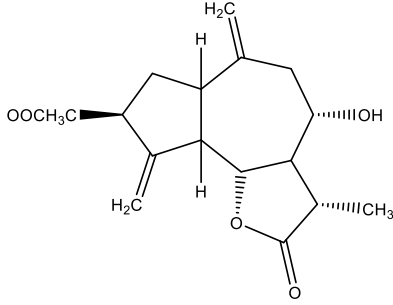
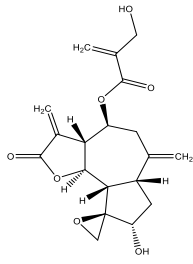
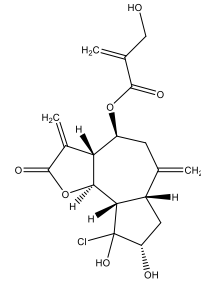
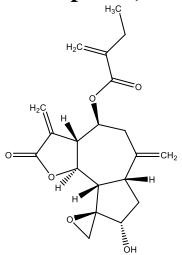
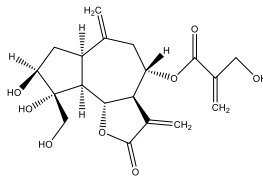
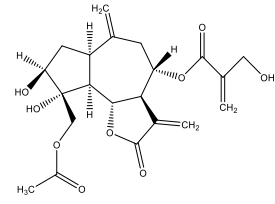
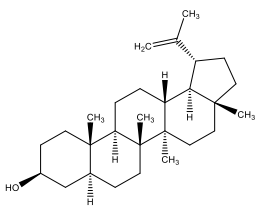
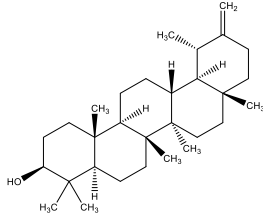
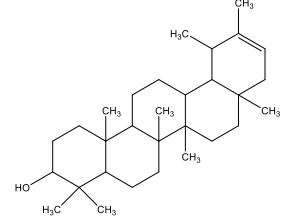
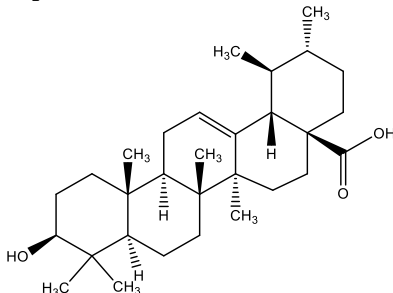
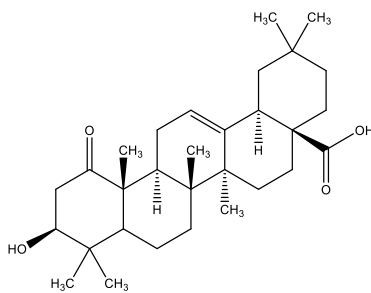
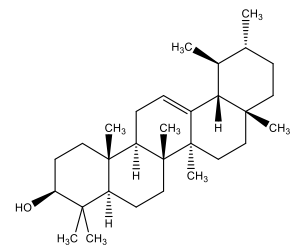
Cousinia Cinsinin Fitokimyasal Özellikleri

Yapılan literatür araştırması sonucunda farklı *Cousinia* türlerinden elde edilmiş bileşikler Tablo 2'de kimyasal yapıları ise Şekil 1-5'de verilmiştir.

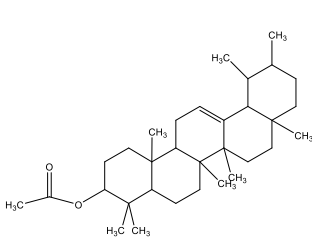
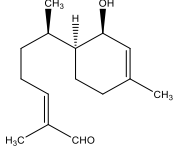
Tablo 2. *Cousinia* türlerinden izole edilen bileşikler.

Bitki türü	Bileşik formülü ve adı	Kaynak
Fenolik bileşikler		
<i>C. aitchisonii</i> Boiss.	1, 2	[10]
<i>C. picheriana</i> Bornm. ex Rech.f.	1	[11]
<i>C. eriocephala</i> Boiss. & Hausskn. ex Boiss. & Hausskn.	3-6	[12]
<i>C. stenocephala</i> Boiss.	7, 8	[13]
Terpenik bileşikler		
<i>C. adenostica</i> Bornm.	9, 13, 14, 18, 19, 34, 35	[14]
<i>C. aitchisonii</i> Boiss.	15-17	[10]
<i>C. canescens</i> DC.	11, 12, 14, 21, 22, 23, 24, 25 26, 27-30, 33, 37-41	[11, 15]
<i>C. eriocephala</i> Boiss. & Hausskn. ex Boiss. & Hausskn.	23,24	[12]
<i>C. onopordioides</i> Ledeb.	30, 33	[16]
<i>C. picheriana</i> Bornm. ex Rech.f.	10, 30-32	[11]
<i>C. piptocephala</i> Bunge.	9, 13, 14, 33, 36, 37	[11]
<i>C. stenocephala</i> Boiss.	20	[13]
Steroid bileşikler		
<i>C. canescens</i> DC.	42, 44	[12, 15]
<i>C. eriocephala</i> Boiss. & Hausskn. ex Boiss. & Hausskn.	42, 43	[12]
Yağ asitleri		
<i>C. aurea</i> C.Winkl.	45-56	[18]
<i>C. seversovii</i> Regel	45, 47-54, 56, 57	[17]
<i>C. umbrosa</i> Bunge	45-56	[18]
Diğer bileşikler		
<i>C. hystrix</i> C.B.Clarke	58, 59	[19]
<i>C. radicans</i> Bunge	58	

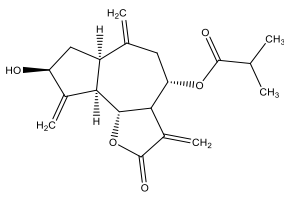
**Arktigenin (1)****Arktiin (2)****Akasetin (3)****Apigenin (4)****Sirsimaritin (5)****Krizoeriol (6)****Rutin (7)****İsoramnetin 3-O-rutinozid (8)****Şekil 1.** *Cousinia* türlerinden izole edilen fenolik bileşikler.

**Sinaropikrin (9)****11,13-β dihidrodeasil sinaropikrin (10)****Deasil sinaropikrin (11)****Sinaropikrin, deasetil: 3-asetat (12)****Janerin (13)****Klorojanerin (14)****Deoksijanerin (15)****Aitşisonolit (16)****Raserolit (17)****Lupeol (18)****Taraksasterol (19)****ψ-Taraksasterol (20)****Ursolik asit (21)****Virgatik asit (22)****α-amirin (23)****Şekil 2.** *Cousinia* türlerinden izole edilen terpenik bileşikler

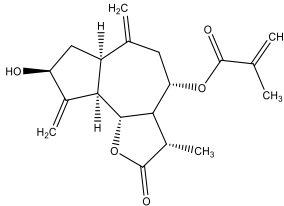
Şekil 2. 'nin devamı

 α - amirin asetat (24)

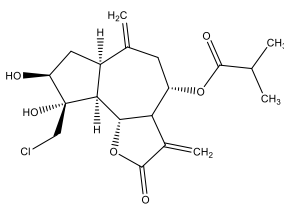
1-hidroksibisabolol-2,10E-dien-12-al (27)



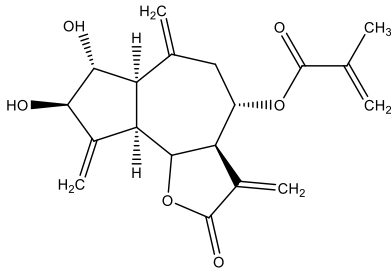
Aguerin A (30)



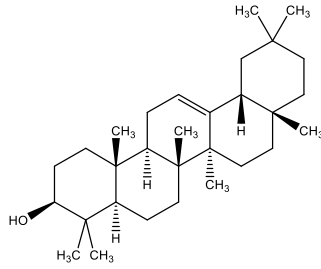
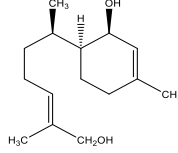
Aguerin B (33)



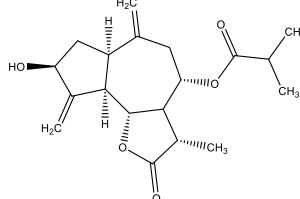
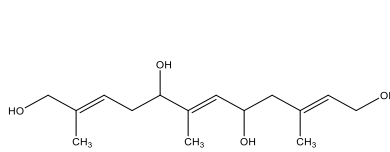
Klorhidrin (36)



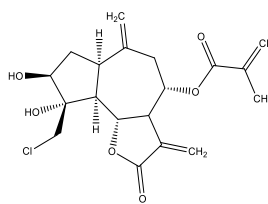
Repdiolit (39)

 β - amirin (25)

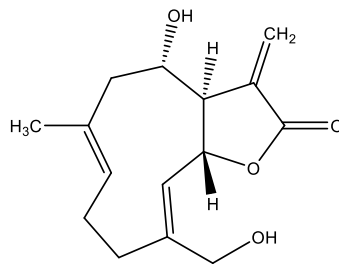
Bisabolol-2,10E-dien-1,12-diol (28)

11 β , 13-dihidroaguerin A (31)

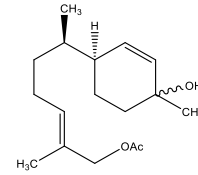
5,8,12 – trihidroksifarnesol (34)



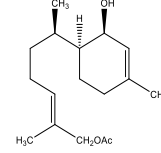
Liniklorin A (37)



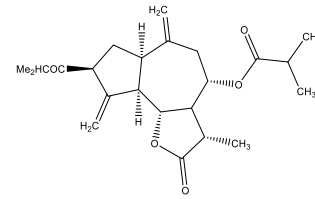
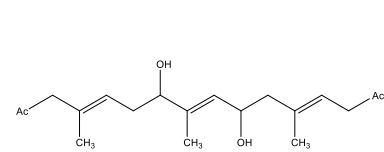
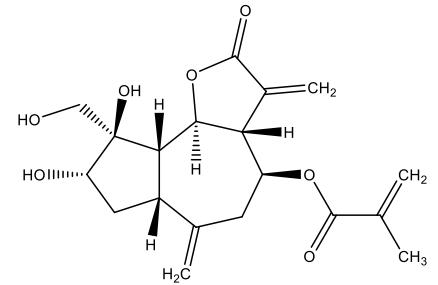
Salonitenolit (40)



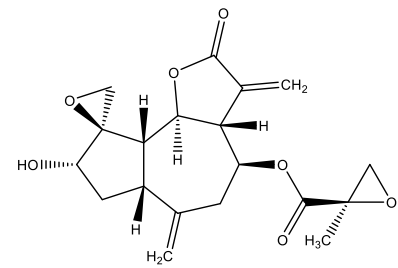
12-asetoksibisabolol-1,10E-dien-3-ol (26)



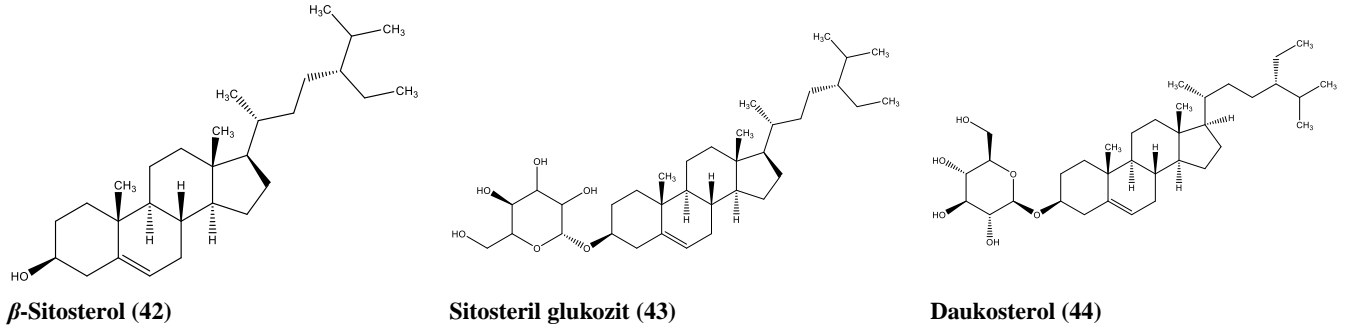
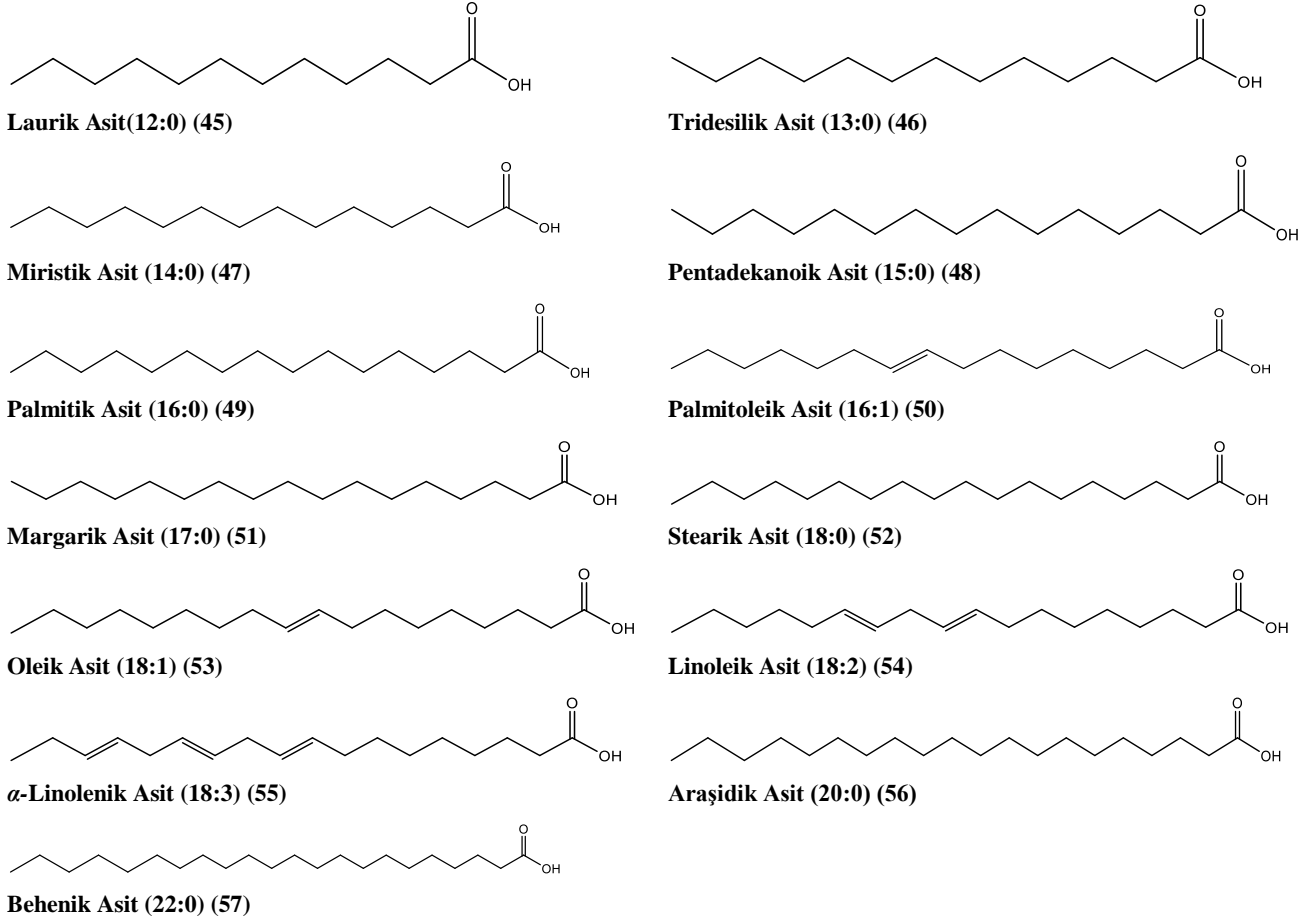
12-asetoksibisabolol-2,10E-dien-1-ol (29)

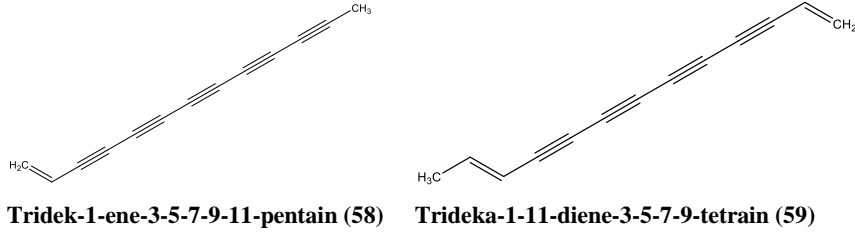
11 β , 13-dihidroaguerin A
3- isobutirat (32)12 - asetoksi - 5,8 dihidroksifarnesil
asetat (35)

Pterokaulin (38)



Subluteolit (41)

Şekil 3. *Cousinia* türlerinden izole edilen steroid bileşikler.Şekil 4. *Cousinia* türlerinden izole edilen yağ asitleri.



Şekil 5. *Cousinia* türlerinden izole edilen diğer bileşikler

Farklı *Cousinia* türlerinde GC-MS ve LC-MS/MS ile tespit edilen bileşikler

Yapılan bir çalışmada *Cousinia alata* Schrenk bitkisinden Clevenger aparatı ile elde edilen uçucu yağın içeriği GC-MS kullanılarak belirlenmiştir. İnceleme sonucunda yağın α -pinen (%31,8), limonen (%11,6), β -pinen (%4,8), bornil izovalerat (%4,1), germakran B (%4,1), bornil asetat (%3,3) ve borneolca (%2,5) zengin olduğu görülmüştür [20].

C. stenocephala Boiss. bitkisinin toprak üstü kısmı ile yapılan bir çalışmada bitkinin mirsetin, kafeik asit esteri, apigenin 7-apiyoglikozit ve bir flavon glikoziti içerdiği LC-MS/MS ile belirlenmiştir [13].

Farklı *Cousinia* türlerinde izole edilen karbohidratlar

Yapılan bir çalışmada *C. eriocephala* bitkisinden fruktoz, glukoz, sukroz izole edilmiştir [12]. Ayrıca *C. sporadocephala* ve *C. leioccephala* bitkisinden glukofruktan [21], *C. polycephala* bitkisinden glukofruktan AF-III, glukofruktan AF-VII ve glukofruktan AF-VIII izole edilmiştir [22].

Cousinia Türleri Üzerinde Yapılan Biyolojik Aktivite Çalışmaları

In vitro çalışmalar

Antibakteriyel Etki

Cousinia microcarpa Boiss. köklerinden hazırlanan farklı ekstraların disk difüzyon metodu ile Gram (-) ve Gram (+) suşlarda antibakteriyel etkileri belirlenmiştir. Metanol ekstresinin pozitif kontrole karşı özellikle Gram (+) suşlarda (*Staphylococcus aureus*) daha etkili olduğu bulunmuştur (inhibisyon zon çapı 19 mm) [9].

Yedi farklı *Cousinia* türünün etanol ekstralarının antibakteriyel etkilerinin belirlenmesi amaçlı yapılan çalışmada *C. phyllocephala* Bornm. & Gauba ekstresinin en yüksek etkiyi disk difüzyon metodu ile *Staphylococcus aureus* ve *Bacillus subtilis* bakterilerine karşı gösterdiği bulunmuştur (MIC=4 mg/disk) [23].

C. stocksii C. Winkl. bitkisi de dahil üç bitkinin antibakteriyel etkisi *Escherichia coli*, *Salmonella typhi*, *Klebsiella pneumoniae* ve *Staphylococcus aureus* bakterilerine karşı agar metodu ile belirlenmiştir. Pozitif kontrol olarak amoksisillin kullanılan çalışma sonucunda *C. stocksii*

bitkisinin özellikle *K. pneumoniae* suşuna karşı daha etkili olduğu bulunmuştur (inhibisyon zon çapı 21 mm) [24].

Antikanser Etki

C. shulabadensis Attar & Ghahr. türü üzerinde yapılan çalışmada bitkinin MMP inhibitör etkisi araştırılmış olup doza bağlı etki gösterdiği saptanmıştır ($IC_{50} = 49,2 \pm 0,51$ µg/ml) [23].

Antioksidan Etki

Cousinia cinsinin Stenocephalae Bunge. seksiyonuna dahil olan dört türü (*C. davisiana* Hub.-Mor., *C. foliosa* Boiss. & Bal., *C. ramosissima* DC., *C. stenocephala* Boiss.) üzerinde antioksidan etkiye yönelik biyoaktivite rehberli izolasyon çalışması yapılmıştır. Maserasyon yöntemi ile elde edilen metanol ekstrelerinden *C. davisiana* ekstresi ve bu ekstreten elde edilen *n*-butanol alt ekstresi daha aktif bulunmuştur ($IC_{50} = 0,13 \pm 0,02$ mg/mL (DPPH•), TEAC= $1.42 \pm 0,08$ mmol/L Trolox (ABTS•)). Elde edilen *n*-butanol alt ekstresinden ise etkiden sorumlu bileşikler olarak rutin ve isoramnetin 3-O-rutinozit elde edilmiştir [13].

Yapılan bir başka çalışmada *C. stocksii* bitkisi antioksidan etki yönünden araştırılmıştır. Çalışmada bitkiden elde edilen metanol ekstresinin total antioksidan aktivitesi 5,44 mg askorbik asit/g ekstre, demir gücünü indirgeme değeri (FRAP) 2,48 mg askorbik asit/g ekstre, DPPH• radikal süpürücü etkisi 0,8 mg/ml konsantrasyonda %92,70 olarak bulunmuştur [24].

Sitotoksik Etki

Farklı *Cousinia* türleri ile yapılan çalışmada ekstreler hazırlanarak fibrokarsinoma hücre hattında sitotoksik taramaya tabi tutulmuştur. Sonuçlara göre en yüksek aktivite *C. verbascifolia* Bunge türünde olmak üzere tüm ekstrelerde önemli sitotoksik etki görülmüştür. ($IC_{50} = 18,4 \pm 0,59$ µg/ml) [25]. *C. verbascifolia* türü ile yapılan başka bir çalışmada ise bir önceki çalışmanın devamı olarak bitkiden perkolasyon yöntemi ile hazırlanan metanol ekstresi çeşitli kromatografik yöntemlerle fraksiyonlanmış ve Fr.b8 fraksiyonu sitotoksik bulunmuştur. Elde edilen fraksiyondan ise etkiden sorumlu bileşikler olarak apigenin ve kafeik asit elde edilmiştir [26].

Iransahy ve ark., (2016) tarafından yapılan çalışmada *C. aitchisonii* Boiss. türünün diklorometan ekstresinden elde edilen raserolit ve dezoksijanerin adlı seskiterpen bileşikleri beş farklı hücre hattında sitotoksik taramaya tabi tutulmuştur. Tarama sonuçlarına göre her iki madde de meme kanseri MCF-7 hücre hattında anlamlı sitotoksik etki (sırasıyla $IC_{50} = 4,5$ µg/ml ve $4,6$ µg/ml) göstermiştir [10].

Bir başka çalışmada ise *Cousinia* cinsinin *Stenocephalae* Bunge. seksiyonuna dahil olan dört tür (*C. davisiana* Hub.-Mor., *C. foliosa* Boiss. & Bal., *C. ramosissima* DC., *C. stenocephala* Boiss.) üzerinde sitotoksik etkiye yönelik biyoaktivite rehberli izolasyon çalışması yapılmıştır. Bitkilerden maserasyon yöntemi ile elde edilen metanol ekstraheleri A549 (akciğer kanseri) ve Colo205 (kolon kanseri) hücre hatlarında sitotoksik taramaya tabi tutulmuş ve *C. stenocephala* diklorometan ekstresi Colo205 hücre hattında daha etkili bulunmuştur ($IC_{50} = 115 \mu\text{g/mL}$). Çalışmanın devamında etkili ekstre çeşitli kromatografik yöntemlerle fraksiyonlanmış ve bu fraksiyonlar arasında Fr.3 fraksiyonu sitotoksik bulunmuştur ($IC_{50} = 109 \mu\text{g/mL}$). Elde edilen fraksiyondan ise etkiden sorumlu bileşikler LC-MS/MS metodu ile mirisetin, kafeik asit esteri, apigenin 7-apiyoilglukozit olarak tespit edilmiştir [13].

***In vivo* çalışmalar**

Hipnotik Etki

Yapılan bir çalışmada *C. microcarpa* Boiss. bitkisinden maserasyon yöntemi ile elde edilen %50'lik etanol ekstresinin hipnotik etkisi sıçanlar üzerinde incelenmiştir. Pentobarbitalle indüklenmiş sıçanlara 100 ve 200 mg/kg dozda uygulanan ekstrenin pozitif kontrol olarak kullanılan diyazepamla kıyaslandığında uyku süresini önemli derecede uzattığı ($P < 0.001$) tespit edilmiştir [27].

SONUÇ VE TARTIŞMA

Geçmişten günümüze tıbbi bitkiler birçok hastalığın tedavisinde kullanılmıştır. Bugün bilimin hız kesmeyen gelişimiyle tıbbi bitkiler üzerindeki araştırmalar dünya çapında güncel araştırmaların önemli bir konusu olmaya devam etmektedir.

Bu çalışmada *Cousinia* cinsinin hem geleneksel kullanımı hem de cinsin farklı türleri üzerinde yapılan güncel çalışmalara değinilmiştir. *Cousinia* cinsi genellikle taksonomik ve sistematik olarak araştırılmış olup fitokimyasal çalışmalar yok denecek kadar azdır. Literatürde mevcut bazı türler üzerinde yapılan kısıtlı sayıda çalışmalarda bu bitkilerin triterpen, seskiterpen (guayan ve bisobolen tip), flavonoid ve steroidlerce zengin olduğu görülmüştür [10, 11, 15-17, 28]. Ayrıca bu türlerin sitotoksik, antikanser, antibakteriyel, antioksidan ve hipnotik etkiye sahip oldukları çeşitli çalışmalarla kanıtlanmıştır [10, 13, 23, 25, 27, 29].

Türkiye florası zengin tıbbi bitki çeşitliliğine sahip olup endemik potansiyeli yüksektir. Ülkemizde yüksek endemizm oranına sahip *Cousinia* cinsinin özellikle ülkemize endemik olan türleri üzerindeki çalışmaların yok denecek kadar az olması floramızda bu cinsin tıbbi araştırmalarda yeterince değerlendirilmediğini göstermektedir. Sonuç olarak bu derleme çalışmasının, *Cousinia*

cinsi ile ilgili toplanan verilere dayalı olarak araştırmacıların yapacakları çalışmalara yön vereceği düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

1. Çelik, K., Toğar, B., Türkez, H., Taşpınar, N. (2014). *In vitro* cytotoxic, genotoxic, and oxidative effects of acyclic sesquiterpene farnesene. *Turkish Journal of Biology*, 38(2), 253-259.
2. Bremer, K., Anderberg, A.A. (1994). *Asteraceae: cladistics and classification*, Timber Press, Oregon, USA, 112.
3. Petit, D.P. (1997). Generic interrelationships of the Cardueae (Compositae): A cladistic analysis of morphological data. *Plant Systematics and Evolution*, 207(3-4), 173-203.
4. Rechinger, K. (1986). *Cousinia*: morphology, taxonomy, distribution and phytogeographical implications. *Proceedings of the Royal Society of Edinburgh, Section B: Biological Sciences*, 89, 45-58.
5. Frodin, D.G. (2004). History and concepts of big plant genera. *Taxon*, 53(3), 753-776.
6. Davis, P. H. and Huber, M. (1975). *Cousinia* in Flora of Turkey and the East Aegean Islands, Edinburgh University Press, Edinburgh, 5.
7. Güner, A., Aslan, S. (2012) Türkiye bitkileri listesi:(damarlı bitkiler). Nezahat Gökyiğit Botanik Bahçesi Yayınları, İstanbul, Türkiye, 212.
8. Singh, K.N. (2012). Traditional knowledge on ethnobotanical uses of plant biodiversity: a detailed study from the Indian western Himalaya. *Biodiversity: Research and Conservation*, 28, 63-77.
9. Amiri, M.S., Hosseini, H.A, Rajai, P. (2014). Preliminary investigation on phytochemical composition and anti-bacterial activity of the root of *Cousinia microcarpa* Boiss. *Asian Journal of Medical and Pharmaceutical Researches*, 4(4), 156-9.
10. Iranshahy, M., Tayarani-Najaran, Z., Kasaian, J., Ghandadi, M., Emami, S.A., Asili, J., et al. (2016). Highly oxygenated sesquiterpene lactones from *Cousinia aitchisonii* and their cytotoxic properties: rhaserolide induces apoptosis in human t lymphocyte (jurkat) cells via the activation of c-jun n-terminal kinase phosphorylation. *Phytotherapy Research*, 30(2), 222-6.
11. Marco, J.A., Sanz, J.F., Albiach, R., Rustaiyan, A., Habibi, Z. (1993). Bisabolene derivatives and sesquiterpene lactones from *Cousinia* species. *Phytochemistry*, 32(2), 395-400.
12. Ulubelen, A., Tuzlacı, E. (1988). Flavonoids and terpenoids from *Cousinia eriosephala*. *Fitoterapia*, 59, 350.

13. Pasayeva, L., Üstün, O., Demirpolat, E., Karatoprak, G. S., Tugay, O., Kosar, M. (2019). Bioactivity-guided isolation of cytotoxic and antioxidant phytochemicals from four *Cousinia* species from *Stenocephala bunge* section. *Pharmacognosy Magazine*, 15(65), 682.
14. Rustaiyan, A., Sharif, Z., Sadjadi, A.S. (1987). Two farnesol derivatives from *Cousinia adenostica*. *Phytochemistry*, 26(9), 2635-6.
15. Ulubelen, A., Tuzlaci, E., Mericli, A. (1986). Triterpenic and steroidal compounds from *Cousinia canescens*. *Fitoterapia*, 57, 269-70.
16. Rustaiyan, A., Niknejad, A., Sigari, H., Ahmadi, A. (1981). Guaianolides from *Cousinia onopordioides*. *Fitoterapia*, 52, 31-2.
17. Ul'chenko, N., Gigienova, E., Umarov, A., Isamukhamedov, A.S. (1981). Hydroxy acids of the seed oils of five plants of the family Asteraceae. *Chemistry of Natural Compounds*, 17(1), 26-30.
18. Ul'chenko, N., Mukhamedova, K.S., Glushenkova, A. (1999). Lipids from seeds of two species of *Cousinia*. *Chemistry of Natural Compounds*, 35(6), 680-1.
19. Bohlmann, F., Köhn, S., Waldau, E. (1966). Polyacetylenverbindungen, CXIII. Die Polyine des Subtribus Carduinae. *Chemische Berichte*, 99 (10), 3201-3203.
20. Suleimen, E., Zhanzhaksina, A.S., Sisengalieva, G., Iskakova, Z.B., Ishmuratova, M.Y. (2018). Constituent Composition and Biological Activity of Essential Oil from *Cousinia alata*. *Chemistry of Natural Compounds*, 54(3), 595-6.
21. Turdumambetov, K., Ajibaeva, Z.S. (2016). The plants of the kinds of *Cousinia*-the source of getting of glucofructans (inulin). *Problems of modern science and education*, 28(70), 21.
22. Turdumambetov, K., Plekhanova, N.V., Rakhimov, D.A., Yagudaev, M.R. (1989). Glucofructanes of *Cousinia polyecephala*. *Khimiya Prirodnykh Soedinenii*, 3, 427-429.
23. Shahverdi, A.R., Khoramizadeh, M.R., Ghahramani, M.H., Golyaee, A., Attar, F., Ghahraman, A. (2007). Chemopreventive effect of *Cousinia shulabadensis* Attar & Ghahraman ethanol extract. *African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines*, 4(1), 12-6.
24. Behlil, F., Samiullah, K.N., Akbar, A., Tareen, R.B., Achakazai, A.K.K., Ali, I., et al. (2019). Phytochemical screening and antioxidant activity determination of some medicinally important plants of Balochistan. *Pakistan Journal of Botany*, 52(2), 1-8.
25. Sajjadi, S.E., Ghanadian, M., Mouhebat, L. (2015). Cytotoxic effect of *Cousinia verbascifolia* Bunge against OVCAR-3 and HT-29 cancer cells. *Journal of HerbMed pharmacology*, 4, 15-9.
26. Sajjadi, S.E., Ghanadian, M., Haghghi, M. (2017). Isolation and identification of two phenolic compounds from a moderately cytotoxic fraction of *Cousinia verbascifolia* Bunge. *Advanced biomedical research*, 6, 66.

27. Amiri, Ms., Rakhshandeh, H., Aghaei, A. (2007). Hypnotic Effect of *Cousinia microcarpa* Boiss. (Asteraceae) In Mice. *Iranian congress of physiology and pharmacology*, 18, 5.
28. Plekhanova, N., Turdumambetov, K., Sudnitsyna, I. (1983). Carbohydrates of *Cousinia*. *Chemistry of Natural Compounds*, 19(5), 603-4.
29. Shahverdi, A. R., Khorramizadeh, M. R., Attar, F., Saadat, F., Vahid, S., Ghahraman, A. (2007). Concomitant chemopreventive and antibacterial effects of some Iranian plants from the genus *Cousinia* (Asteraceae). *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 17 (3), 325-330.



PROLİPOZOM TEKNOLOJİSİNDEKİ GÜNCEL GELİŞMELER VE UYGULAMALAR

RECENT DEVELOPMENTS ON PROLIPOSOME TECHNOLOGY AND APPLICATIONS

Nadir DERELİ¹, Zerrin SEZGİN BAYINDIR^{2,*}

¹Nadir Dereli Eczanesi, Gazi Mahallesi, Celal Bayar Caddesi, No: 7/C, Silifke, Mersin, Türkiye

²Ankara Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı, Yenimahalle, Ankara, Türkiye

ÖZ

Amaç: Lipozomlar, ilaç taşıyıcı sistemler arasında en umut verici ve uygulanabilir olanıdır. Ancak, lipozomların fiziksel ve kimyasal stabilite problemleri kullanımlarını sınırlamaktadır. Bu problemlerin üstesinden gelmek için 1986 yılında prolipozomal sistemler geliştirilmiştir. Bu derleme kapsamında prolipozomal ilaç taşıyıcı sistemler ve uygulamaları ile ilgili yapılmış olan bilimsel araştırmalar akademik veri tabanları taranarak sunulmuştur.

Sonuç ve Tartışma: Prolipozomlar etkin madde, suda çözünür taşıyıcı materyal ve fosfolipitlerden oluşan, su veya biyolojik sıvılar ile temas ettiğinde çok katmanlı lipozomal süspansiyon oluşturan toz veya sıvı lipit yapıdaki ürünlerdir. Bu derlemede, ilaç taşıyıcı sistemler olarak kullanılan prolipozomlar hakkında genel bilgiler verilmiştir. Prolipozomların hazırlanmasında kullanılan bileşenler ve özellikleri tanımlanmıştır. Prolipozomların hazırlama teknolojileri, karakterizasyonu ve avantajlarına değinilmiştir. Derlemenin son bölümünde prolipozomların oral, parenteral, pulmoner, transdermal ve mukozal yollardan uygulanmaları ile ilgili çalışmalar özetlenmiştir. Prolipozomlar üstün in vivo etkinlikleri, yüksek stabilite ve endüstriyel boyutta imal edilebilir olmaları nedeniyle umut verici ilaç taşıyıcı sistemlerdir.

Anahtar Kelimeler: ilaç taşıyıcı sistemler, lipozom, prolipozomlar, stabilite.

ABSTRACT

Objective: Liposomes are the most promising and feasible carriers among other drug delivery systems. However, physical and chemical stability problems of liposomes limit their use. In order to overcome these problems, proliposomal systems were developed in 1986. Within the scope of this review, scientific researches about proliposomal drug delivery systems and their applications were presented by searching academic databases.

* Sorumlu Yazar / Corresponding Author: Zerrin Sezgin Bayındır
e-posta / e-mail: zsezgin@pharmacy.ankara.edu.tr

Result and Discussion: *Proliposomes are powder or liquid lipid formulations of active agent, water-soluble carrier material and phospholipids, which form a multilamellar liposomal suspension upon contact with water or biological fluids. In this review, general information about proliposomes as drug delivery systems were given. The components used in the preparation of proliposomes and their properties were described. The preparation technologies, characterization and advantages of proliposomes were discussed. In the last part of the review, studies on the administration of proliposomes by oral, parenteral, pulmonary, transdermal and mucosal routes were summarized. Proliposomes are promising drug delivery systems because of their superior in vivo efficacy, high stability and industrial fabricability.*

Keywords: *drug delivery systems, liposome, proliposomes, stability.*

GİRİŞ

Lipozomlar, 1965 yılında Bangham ve arkadaşları tarafından keşfedilmelerinden bu yana etkin maddelerin terapötik etkilerini artırmak, yan etkilerini azaltmak ve kimyasal bozunmadan koruyarak stabilitelerini artırmak amacıyla üzerinde çok çalışılmış, ilaç taşıyıcı sistemler arasında en umut verici ve geniş uygulamaya sahip olanıdır [1]. Lipozomların ilaç pazarına girebilmesi için, raf ömrü boyunca stabil olmaları ve istenen etkiyi oluşturmak için hedef bölgelere ulaşmaya kadar bozunmadan kalabilmeleri gerekmektedir. Ancak, lipozomlar çeşitli kimyasal ve fiziksel stabilite problemleri olan, düşük stabiliteli kolloidal sistemlerdir. Fiziksel stabilite problemleri, vezikül agregasyonu ve füzyonu sonucu meydana gelen vezikül büyüklüğündeki değişiklikler ve enkapsüle maddenin vezikül dışına sızması ile ilgilidir. Kimyasal stabilite problemleri ise, fosfolipitlerde yağ asitlerini gliserol omurgaya bağlayan ester bağlarının hidrolizi ve doymamış açil zincirlerinin peroksidasyonu sonucu ortaya çıkmaktadır. Bu problemler lipozomların parçalanmasını hızlandırır ve ilaç salım özelliklerini değiştirirler. Ayrıca, lipozomların *in vivo* performanslarını ve saklama koşullarını etkiler [2]. Bu nedenle lipozomlar için özel saklama koşullarına ihtiyaç duyulmaktadır. Stabilite problemlerine ek olarak lipozom formülasyonlarında kullanılan doğal fosfolipitlerin saflığı değişkenlik gösterebilmektedir. Lipozomların imalatı sırasında uygun olmayan çözücü kullanımı ve oluşturulan lipit filmin yetersiz hidrasyonu gibi problemler gözlenebilmektedir [3].

Lipozomlarla ilgili stabilite problemlerinin üstesinden gelmek için çeşitli yaklaşımlar uygulanmıştır. Partikül büyüklüğü ve tabakalanmanın kontrolü, lipozom bileşiminin değiştirilmesi elektrosterik stabilizasyon ve liyofilizasyon bu yaklaşımlara örnek olarak verilebilir. Prolipozomlar, lipozomlarla ilgili stabilite problemlerinin üstesinden gelmek için geliştirilmiş yeni ilaç taşıyıcı sistemlerdir. 1986 yılında Nicholas Payne ve arkadaşları tarafından geliştirilen prolipozomlar; etkin madde, fosfolipitler ve suda çözünen bir taşıyıcı materyalden oluşan, su ile temas halinde çok tabakalı lipozomal süspansiyona dönüşen, kuru, iyi akış özelliklerine sahip granüler ürünlerdir [2]. Prolipozom kavramı daha sonra 1991'de sulu fazın ilavesiyle lipozom oluşturabilen sıvı fosfolipit

formülasyonlarını da kapsayacak şekilde genişletilmiştir. Bu sıvı formülasyonlar fosfolipitlerin konsantre etanolik çözeltileridir. Bu nedenle, prolipozomlar sulu faz ilavesiyle lipozomları oluşturabilen toz veya sıvı lipit formülasyonlar olarak tanımlanabilir [4].

Prolipozom teknolojisi, ticari boyutta lipozomların üretimi için düşük maliyetli ve büyük ölçekte kullanılabilen bir yaklaşımdır. Kuru toz formunda olmaları, dağıtım, taşınma ve ölçümde avantaj sağlamaktadır. Lipozomlar, prolipozomların biyolojik sıvılarla *in vivo* koşullarda teması sonucu oluşturulabilir veya uygun bir hidrasyon sıvısı kullanılarak uygulanmadan önce *in vitro* olarak oluşturulabilir [2]. Prolipozomlar, lipozomlara göre daha iyi stabilite gösterirler ve büyük ölçekli üretimde sterilizasyonları kolaydır. Prolipozom teknolojisi, lipozom dispersiyonlarının büyük ölçekli üretimi için basit, doğru, tekrarlanabilir ve güvenilir bir üretim sağlamaktadır [1].

İlaç taşıyıcı sistemler olarak prolipozomlar şu avantajları sağlamaktadır [1, 4, 5, 6, 7]:

- ◆ Suda az çözünen maddelerin çözünürlüğünü ve biyoyararlanımlarını arttırırlar
- ◆ Hem hidrofilik hem de lipofilik maddeler enkapsüle edilebilir
- ◆ Prolipozomlar, maddeleri hedef dokulara taşımak ve kontrollü, uzun süreli etkin madde salımı için kullanılabilirler
- ◆ Klasik lipozomlara göre daha stabildirler
- ◆ Etkin maddelerin permeabilitesini ve bağırsaktan emilimlerini arttırırlar
- ◆ Etkin maddeleri gastrointestinal (GI) sistemde parçalanmaya karşı korurlar, ilk geçiş metabolizmasını azaltarak etkin maddelerin farmakokinetik ve farmakodinamik özelliklerini değiştirebilirler
- ◆ Toksikiteyi azaltırlar ve istenmeyen tadı maskelerler
- ◆ Biyolojik olarak parçalanabilir ve biyoyumludurlar
- ◆ Hazırlanmaları kolay ve ucuzdur
- ◆ Kapsül, tablet gibi dozaj formları şeklinde hazırlanabilirler.

1. Prolipozomların Bileşimi

Klasik lipozomal formülasyonlara alternatif formlar olan prolipozomlar taşıyıcı materyal olarak suda çözünür bir poröz toz, fosfolipitler, kolesterol ve etkin maddeden oluşmaktadır.

Suda Çözünür Taşıyıcı Materyal: Prolipozom hazırlanmasında kullanılacak taşıyıcı materyal suda iyi çözünürlüğe, kloroform, metanol gibi organik çözücülerde zayıf çözünürlüğe sahip olmalıdır. Suda çözünebilir olmaları hidrasyon sonrası hızlı lipozomal dispersiyon oluşumunu

sağlamaktadır. Fosfolipitlerin adsorbe edileceği gerekli taşıyıcı miktarının kolayca ayarlanabilmesi için seçilen taşıyıcı materyalin yüksek yüzey alanına ve poroziteye sahip olması gerekmektedir. Taşıyıcının partiküler özellikleri (partikül büyüklüğü, akışı gibi) oluşacak lipozomların partikül büyüklüğünü ve homojenliğini etkilemektedir. Poröz tozun partikül büyüklüğünün kontrol edilmesiyle, nispeten partikül büyüklük dağılımı dar olan rekonstitüe lipozomlar elde edilebilmektedir [1,3]. Tablo 1’de prolipozom formülasyonlarında kullanılan taşıyıcı materyallerine örnekler verilmiştir [3, 5].

Tablo1. Prolipozom formülasyonlarında kullanılan taşıyıcı materyaller

• Sorbitol
• Mannitol <ul style="list-style-type: none"> ○ Püskürterek kurutulmuş mannitol (Pearlitol SD 200) ○ Granüle edilmiş mannitol (Pearlitol DC 300)
• Mikrokrystal Selüloz
• Laktoz <ul style="list-style-type: none"> ○ İnhalasyon için laktoz (Respitose) ○ Direkt basılabilir laktoz
• Eritritol
• Dekstroz
• Magnezyum Alüminyum Silikatlar
• Maltodekstrin

Fosfolipitler: Prolipozomların hazırlanmasında kullanılan fosfolipitler biyolojik membranların yapı taşlarıdır. En yaygın fosfatidilkolinler (yumurta sarısı ve soya fasulyesinden elde edilir) ve lesitin (farklı doymamışlık derecesine ve zincir uzunluklarına sahip çeşitli lipitlerden oluşan saflaştırılmamış fosfatidilkolin) kullanılır. Fosfatidilkolin molekülleri suda çözünmez ancak, sulu ortamda yağ asitlerinin uzun hidrokarbon zincirleri ve sulu faz kütlesi arasındaki etkileşimi en aza indirmek için birbirlerine yakın bir şekilde düzlemsel lipit çift tabaka halinde diziliş gösterirler [1]. Fosfolipitlerin stabilitesi yapılarındaki doymamış zincirlerin artmasıyla azalmaktadır, bu nedenle doymuş fosfolipitler doymamış olanlara göre daha çok tercih edilmektedir [5].

Fosfolipitler faz geçiş sıcaklığı (T_c) olarak adlandırılan bir sıcaklık aralığında karakteristik bir jel-sıvı kristal faz geçişine uğrar. Veziküller T_c 'nin altında katı (jel) olarak düşünülür, fakat bu sıcaklığın üstünde ise sıvı durumdadırlar. Düşük T_c değerlerine sahip ve yağ asidi alkil zincirlerinde doymamışlık içeren fosfolipitlerden oluşan prolipozomlar genellikle katı halde değildirler. Bu gibi fosfolipitler enkapsüle ettikleri etkin maddeyi sızdırma eğilimindedir [5].

Prolipozomların hazırlanmasında kullanılan fosfolipitler toksikolojik güvenlik, saflık, stabilite ve maliyet nedeniyle fosfatidilkolin ve fosfatidilgliserollerle sınırlıdır [5]. Tablo 2’de prolipozom formülasyonlarında kullanılan fosfolipitler verilmiştir [3, 5].

Tablo 2. Prolipozom formülasyonlarında kullanılan fosfolipitler

• Yumurta Lesitini
• Soya Lesitin
• Soya Fosfatidilkolin
• Hidrojenlenmiş Soya Fosfatidilkolin (HSPC)
• Disteroil fosfatidilkolin (DSPC)
• Dimiristoil fosfatidilkolin(DMPC)
• Dipalmitoil fosfatidilkolin (DPPC)
• Fosfolipon 90H (Yüksek Saflıkta Hidrojenlenmiş Soya Fosfatidilkolin)
• Lipoid E80 (%80-85 fosfatidilkolin içeren yumurta lesitini)
• Dimiristoil fosfatidilgliserol (DMPG)

Kolesterol: Kolesterol lipozomların çifte tabaka özelliklerinin korunması için lipozom formülasyonlarında kullanılan bir steroidtir. Kolesterol, çift tabakalı membranın akıcılığını düzeltir, membran boyunca suda çözünür maddelerin permeabilitesini azaltır ve kan/plazma gibi biyolojik sıvılar varlığında çift tabakalı membranın stabilitesini artırır. Kolesterol içermeyen lipozomlar albümin, m-transferrin ve makro-globulin gibi lipozom stabilitesini bozan kan proteinleri ile reaksiyona girme eğilimindedir. Kolesterol kan proteinleri ile etkileşimi azaltmaktadır [6].

Yük verici ajanlar: Prolipozomlardan oluşan lipozomların istenilen yüzey yüküne sahip olması için stearilamin (SA), disetil fosfat (DCP) gibi yük verici maddeler kullanılabilir [3]. Negatif veya pozitif yüklü lipidlerin varlığı etkin maddenin yüklenmesi için daha fazla hacim sağlar ve agregasyon olasılığını azaltır. Dolayısıyla lipozom stabilitesinde bir artış sağlanabilir [6].

Bahsedilen temel prolipozom bileşenleri dışında etkin madde çıkış hızı, stabilite, *in vivo* etkinlik gibi çeşitli parametreleri düzenlemek için prolipozomların yapısına safra tuzları, noniyonik sürfaktanlar ve çeşitli polimerler ilave edilmektedir. Prolipozomlardan türetilmiş lipozomlardan etkin madde salım hızı prolipozom sistemine polisorbata 80 gibi noniyonik sürfaktanların katılması ile artırılabilir. Bunun yanı sıra, polisorbata 80 lipozomların partikül büyüklüğünü azaltarak fiziksel stabilitesini artırabilir. Safra tuzları, biyolojik membranlardan lipozomların penetrasyonunu artırarak prolipozomların biyolojik performansını artırmak için kullanılmaktadır. Prolipozom imalatında, hedef dokulara spesifik çeşitli yapılar prolipozom formülasyonlarına eklenebilmektedir.

Örneğin retiküloendotelyal sistem açısından zengin organların ters hedeflemesi prolipozomlara poloksamer 407 eklenmesiyle sağlanmıştır [3].

Prolipozom formülasyonlarına oleik asidin sodyum tuzu ve gliserin gibi maddelerin katılmasıyla lipozomların partikül büyüklüğü ve enkapsülasyon etkinliği modifiye edilebilir. Şelat yapıcı ajanların eklenmesi (etilen diamin tetra asetik asit-EDTA) yüklenmiş etkin maddeyi *in vitro* bozunmaya karşı koruyabilir. Kriyoprotektanlar, dondurarak kurutma işlemi sırasında prolipozomları korumak için yaygın olarak kullanılmaktadır. Toz formundaki prolipozomların akış ve aerodinamik özellikleri antiadherent maddeler kullanılarak modifiye edilebilmektedir. Örneğin lösin benzeri antiadherentlerin toz partiküllerin arasındaki bağlanmayı azalttığı ve agregasyonu önlediği belirtilmiştir [3].

2. Prolipozomların Sınıflandırılması

Prolipozomal sistemler genellikle üç fiziksel formda bulunmaktadır:

- a. Kuru Granüler Form
- b. Karışık Miseller Form
- c. Sıvı Kristal Form

Kuru Granüler Form: Kuru granüler tipteki prolipozomlar, organik çözücü içerisinde suda çözünür taşıyıcı materyallerin (glukoz, fruktoz, laktoz, sorbitol veya maltodekstrin) fosfolipitler ile film tabakası şeklinde kaplanmasıyla oluşturulmaktadır. Kaplama işlemi sonundaki sonuç ürün kuru bir formülasyondur. Kuru granüler tipteki prolipozomlar istendiği şekilde porsiyonlara bölünür ve doz ayarlaması yapılabilir. Uygulamadan hemen önce birkaç dakika su ile karıştırıldıktan sonra lipozom dispersiyonu kendiliğinden oluşmaktadır. Oluşmuş veziküller homojen bir partikül büyüklük dağılımı gösterir. Kuru veziküler sistemler toz formda saklanabilmekte ve sterilize edilebilmektedir. Kuru tozlar, oral, IV veya diğer yollarla uygulanabilmektedir [3, 7].

Karışık Miseller Form: Bu formlar, safra tuzları, kolesterol ve fosfolipit içermektedir ve karışık misel yapısının suyla seyrelmesi neticesinde miseller yapı lipozomal forma dönüşmektedir. Safra tuzları içermeleri nedeniyle amfifilik özelliktedirler. Suyla seyreltilmelerine karşın lipofilik etkin maddelerin çökmemesi bu sistemin en önemli avantajıdır. Sıvı formda olmalarından dolayı IV veya diğer yollarla uygulanabilmektedirler [7].

Sıvı Kristal Form: Bu formda, çift tabakalı sıvı kristaller, yüksek sıcaklık altında lipit-alkol-su varlığında oluşturulmaktadır. Fosfolipit molekülleri, su molekülleri ile temas ettiğinde lipofilik

zincirleri üç muhtemel yolla “iyotropik sıvı kristal durum (düzenli faz)” olarak bilinen sıvı faza dönüştürülebilir:

- 1- Sıcaklığın T_c 'nin üstüne yükseltilmesi
- 2- Lipit çözen çözücü ilavesi
- 3- Sıcaklık ve çözücünün birlikte kullanımı

Düzenli faz sulu ortamda birbiri üzerine sıralanmış çifte tabakalardan oluşmaktadır. Çifte tabakalı sıvı kristaller yüksek sıcaklıkta lipit-alkol-su varlığında oluşur. Bu lameller sıvı kristal faz su veya tampona maruz bırakılarak oda sıcaklığına soğutulduğunda jel yapısı meydana gelir. Çifte tabakalı kristal faz su içeriği arttıkça veziküler dispersiyona dönüşür. Sıvı kristal formlar genellikle transdermal ilaç uygulamalarında kullanılmaktadır. Sıvı kristal yapı hidrokortizon gibi etkin maddelerin daha iyi difüze olmasını ve çözünürlüklerinin artmasını sağlamaktadır. Bu sistem termodinamik olarak stabildir. Sıvı kristal fazda etkin maddenin difüzyon katsayısı derideki değerine göre dört kat daha yüksektir. Jel yapısı stabilizasyonu sağlarken deride iritan etki oluşturmaz [3, 7].

Katı granüler form ile karşılaştırıldığında, sıvı kristal yapıdaki prolipozomların formülasyonu daha basittir ve özel bir cihaz gerektirmez. Ek olarak, sıvı kristal yapı sulu ortamla temas ettiğinde sonikasyon veya ekstrüderler gibi ekstra bir güç uygulamaksızın kısa sürede etkin madde yüklü lipozomları kendiliğinden oluşturulabilir. Sıvı prolipozomlardan hidrate edilmiş lipozomların ortalama partikül büyüklüğü daha küçük olup dar monodispers bir dağılım gösterme eğilimindedir [4, 8].

3. Prolipozom Formülasyonlarını Hazırlama Yöntemleri

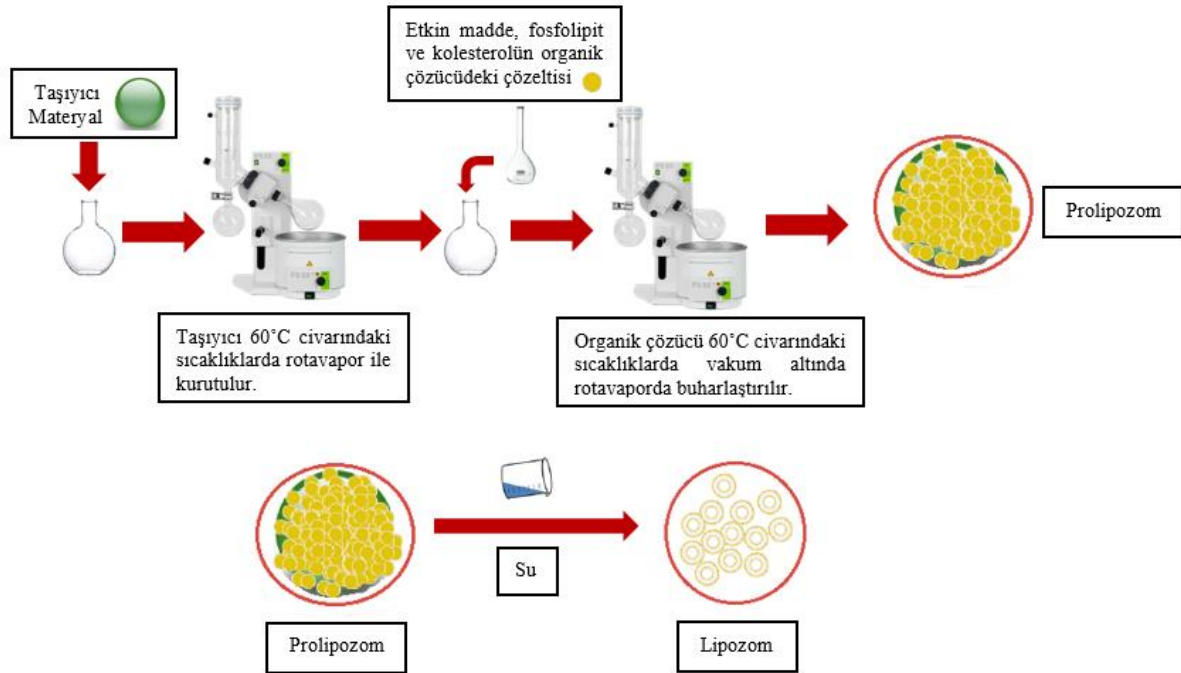
Prolipozomların hazırlanmasında farklı hazırlama yöntemleri kullanılmaktadır. Bu hazırlama yöntemleri aşağıda yer almaktadır.

Film Depozisyon Yöntemi (Bulamaç Yöntemi)

Prolipozomların hazırlanmasında çok yaygın olarak kullanılan bir yöntemdir (Şekil 1). Bu yöntemde etkin madde, fosfolipitler ve kolesterol, suda çözünür poröz bir taşıyıcıya adsorbe edilir. Etkin madde ve fosfolipitler uçucu bir organik çözücü (kloroform, metanol veya karışımları) içinde çözülür ve bu çözelti bir bulamaç (slurry) elde etmek üzere 60°C civarındaki sıcaklıklarda rotavapor ile kurutulmuş taşıyıcı madde içeren yuvarlak tabanlı balona yerleştirilir. Organik çözücü 60°C civarındaki sıcaklıklarda vakum altında rotavaporda buharlaştırılır. Organik çözücünün tamamı uzaklaştırıldıktan sonra iyi akış özelliklerine sahip prolipozomal toz formülasyonu elde edilebilir. Çözücünün tamamen uzaklaştırılması sağlamak için ekstra vakum uygulaması uygundur [3, 9, 10].

Lipitlerin organik çözücü içindeki çözeltilerini küçük porsiyonlar halinde balon içindeki taşıyıcı materyal üzerine püskürterek veya enjekte ederek de prolipozomların hazırlanması mümkündür. Her bir ilaveden sonra, organik çözücünün buharlaştırılması gerekmektedir. Bazı araştırmacılar bulamaç oluştururken sonikasyon ve karıştırma işlemleri uygulamaktadır. Katı etkin madde miktarının yeterince yüksek olduğu durumlarda taşıyıcı maddeler kullanmaksızın bu yöntemi kullanmak mümkündür.

Çeşitli çalışmalarda bu yöntem tek başına veya diğer tekniklerle kombine edilerek kullanılmıştır. Taşıyıcı materyal olarak sitrik asit, hidrasyon çözeltisi olarak NaHCO_3 çözeltisi kullanılarak bu yöntem efervesan tekniği ile birleştirilmiştir. Organik çözücü buharlaştırma aşamasında, rotavapor yerine magnetik karıştırıcıya yerleştirilmiş üç boyunlu balon kullanarak yöntem modifiye etmiştir. Klasik ince film yöntemi ile oluşturulan lipozomların taşıyıcı üzerine adsorpsiyonu sağlandıktan sonra oda sıcaklığında formülasyonun kurutulmasıyla da serbest akan prolipozom formülasyonları elde edilmiştir [3].



Şekil 1. Film deposizyon yöntemiyle prolipozom hazırlama yöntemi

Püskürterek Kurutma Yöntemi

Püskürterek kurutma homojen partikül büyüklüğü ve şekline sahip partiküllerin hazırlanmasında kullanılan, büyük ölçekli üretim için elverişli ve uygun maliyetli bir yöntemdir.

Hem partikül oluşumu hem de kurutma işleminin tek bir adımda gerçekleştirilebilmesi bu yöntemin benzersiz bir özelliği olup kontrollü partikül oluşumunu sağlamaktadır. Püskürterek kurutma işleminin kullanımı sadece sulu çözeltilerle sınırlı olmayıp su içermeyen sistemlerle de partiküller hazırlanabilmektedir [1, 11, 12].

Püskürterek kurutma yönteminin prolipozom imalatında da yeri vardır. Bu amaçla etanol içindeki lipit ve kolesterolün berrak çözeltisi, katı taşıyıcı materyal veya taşıyıcı materyalin sulu çözeltisi ile karıştırılır. Karışım 60°C'ye kadar ısıtılır ve homojen çözelti/dispersiyon elde etmek için karıştırılır. Etkin maddenin etanolik çözeltisi de karışıma eklenir. Homojen bir karışım elde edildikten sonra bu karışım prolipozom elde etmek için püskürtülerek kurutulur [3].

Püskürterek kurutma ile ilgili başlıca dezavantaj etkin maddenin termal ve mekanik parçalanmasına neden olabilen yüksek çalışma sıcaklığı, kayma stresi ve absorpsiyon durumudur. Bu problemler, kurutucu hava sıcaklığı ve sıvı püskürtme hızı gibi işlem parametreleri optimize edilerek çözülebilmektedir. Disakkaritler, siklik oligosakkaritler ve polioller gibi stabilizatörler etkin maddenin bütünlüğünü korumak için kullanılabilir ve lipitlerin yüzey alanlarını artırarak hidrasyon etkinliğini artırmaktadır [1].

Akışkan Yatak Yöntemi

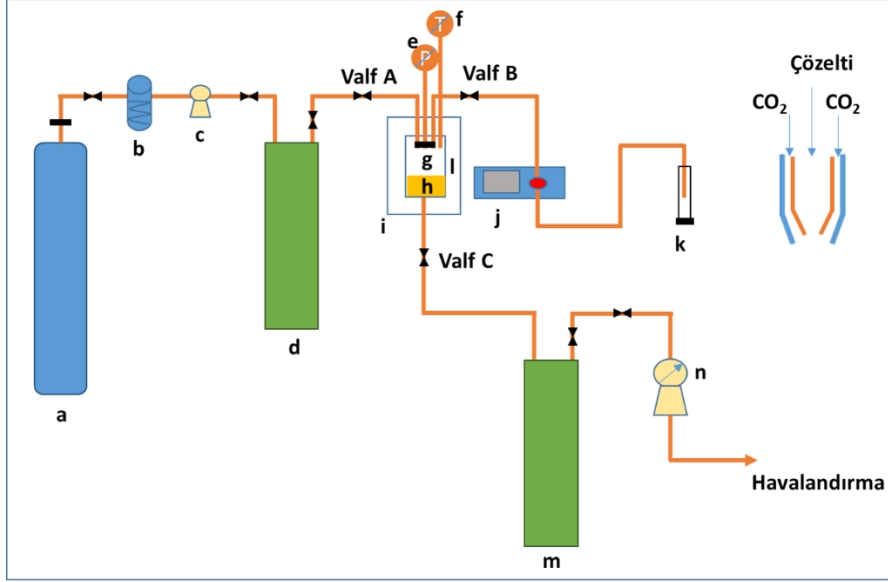
Bu yöntem, prolipozomların büyük ölçekli üretimi için uygulanabilir ve partikül kaplama teknolojisi prensibine göre çalışır. Taşıyıcı materyal üzerine etkin madde ve lipit çözeltisinin püskürtülmesiyle uygulanmaktadır. Burada kullanılan taşıyıcı materyal olarak kristal formdaki tozlar, inert boncuklar kullanılabilir. Akışkan yatak sisteminde organik çözücü içindeki etkin madde ve fosfolipit çözeltisi taşıyıcı materyal üzerine püskürtülür ve vakum uygulanarak organik çözücü buharlaştırılır. Eser miktardaki çözücü kalıntısını buharlaştırmak için elde edilen lipit kaplı toz/boncuklar gece boyunca vakum altında kurutulabilir. Böylece, taşıyıcı materyalin üzeri düzgün bir şekilde kaplanabilir. Taşıyıcı materyal olarak boncuklar kullanıldığında, fosfolipitlerin kaplanması için düzgün pürüzsüz bir yüzey sağlamak amacıyla boncuklara ön kaplama uygulanır. Böylece fosfolipitler çekirdeğin etrafını kaplar ve hidrasyonla küçük boyutlu lipozomların oluşumu sağlanır [1, 3, 13].

Süperkritik Anti-Solvan Yöntemi

Süperkritik anti-solvan (SAS) yöntemiyle prolipozom hazırlanmasında süperkritik karbon dioksit (SCCO₂) kullanılır. SCCO₂, kritik sıcaklık ve basınçta veya üzerinde tutulan karbondioksitin sıvı halidir. Anti-solvan teknolojisi gıda endüstrisinde geniş bir şekilde kullanılmaktadır. Diğer yöntemlere ait karmaşık işlem basamakları, yüksek seviyelerde sıcaklık uygulama gerekliliği ve artık

çözücülerin varlığı gibi dezavantajlar elimine edilerek prolipozomların imalatı amacıyla geliştirilmiştir [1, 14].

SAS teknolojisi örnek taşıma, çöktürme ve ayırma ünitelerinden oluşan özel bir ekipman ile uygulanmaktadır (Şekil 2).



Şekil 2. Süperkritik Anti-solvan Yöntemi [6]

Örnek taşıma ünitesi iki pompadan oluşmaktadır: Biri CO₂, diğeri ise çözelti içindir. CO₂ tüpünden (a) temin edilen CO₂ dondurucuda (b) soğutulur ve yüksek basınçlı bir pompa (c) ile tampon tankına (d) gönderilerek burada ön ısıtmaya tabi tutulur. Etkin madde çözeltisi pompa (j) aracılığıyla ilave edilir. Etkin maddeyi çözmek için kullanılan çözücü CO₂ ile her oranda tamamen karışabilmelidir. A ve B vanalarının açılmasıyla hazne içine çözelti ve CO₂ girişi sağlanır. Şekil 2’de görüldüğü gibi püskürtücünün iç kanalından çözelti püskürtülürken dışından CO₂ püskürtülür [1]. Çöktürme ünitesi hava banyosu ile ısıtılmış bir hazneden (i) oluşmaktadır. Ayırma ünitesi ise bir ayırıştırıcı (m) ve gaz sayacından (n) oluşmaktadır. CO₂’in volumetrik akış hızı sayaç ile ölçülürken düşük basınç nedeniyle organik çözücü ayırma ünitesinde SCCO₂’den ayrılır. Ayırma ünitesinin sıcaklık ve basıncı önceden belirlenmiş değerlere ulaşıktan sonra, CO₂ girişini sağlamak için A vanası, ardından da çözelti girişini sağlamak için B vanası açılır. SCCO₂ ve çözelti püskürtüldüğü için birbiri içinde hızlıca difüze olur ve karışırlar. Organik çözücü içindeki maddenin çözünürlüğünün büyük ölçüde azalması nedeniyle çok kısa bir sürede madde organik çözücü içinde aşırı doyumluğa ulaşır. Sonuç olarak, prolipozomlar ünite içerisinde çökerler. Çözelti tamamen bittikten sonra A ve B vanaları kapatılır ve ünitedeki basıncı atmosfer basıncına düşürmek için C

vanası açılır. Örnekler ünitenin tabanındaki filtre (h) üzerinde toplanır. Prolipozomlara yüksek miktarda etkin madde yüklemek için etkin madde çözeltisinin basınç, sıcaklık ve akış hızının optimize edilmesi gerekmektedir [1].

Film Dispersiyon-Dondurarak Kurutma Yöntemi

Prolipozom elde etmek için ince film hidrasyon yöntemi ile elde edilen lipozomlar dondurularak kurutulabilir. Organik çözücü içindeki lipit çözeltisi yuvarlak tabanlı balon içerisine konular ve organik çözücü ince lipit bir film elde etmek için lipitlerin geçiş sıcaklığı (T_c) üstünde buharlaştırılır. Kriyoprotektan içeren etkin madde çözeltisi balona konular ve 60°C 'de film hidrate edilir. Taşıyıcıya yüklenmemiş etkin maddeyi ayırmak için yapılan ultrasantrifüj işleminden sonra elde edilen çökelti distile su ile rekonstitüe edilir ve prolipozomal toz eldesi için dondurularak kurutulur [15].

Etanol Enjeksiyon-Homojenizasyon-Dondurarak Kurutma Yöntemi

Etkin madde, fosfolipit ve kolesterolün etanolik çözeltisi yüksek sıcaklıkta (37°C) taşıyıcı materyalin sulu dispersiyonuna enjekte edilir. Etanolün buharlaştırılmasından sonra karışım homojenizatörden geçirilir ve örnekler dondurularak kurutulur [16].

Etanol enjeksiyon yöntemleri, fosfolipitlerin organik çözücüdeki çözeltilerinin suya ilavesiyle çözünürlüklerinin azaltılmasına bağlıdır. Sonuçta elde edilen yapı düşük su miktarı nedeniyle konsantre prolipozomal jeldir. Bu jel fazla miktarda su ile seyreltildiğinde lipozomal dispersiyonu oluşturur [3].

Modifiye Etanol Enjeksiyon Yöntemi

Bu yöntemin temelinde uzaktan (remote) yükleme teknolojisi ve etanol enjeksiyon yöntemi kullanılmaktadır. Fosfolipit, kolesterol ve oleik asitin sodyum tuzu etanol:gliserin karışımında çözülür ve etkin maddenin (doksorubisin) %0.9 NaCl içerisindeki sulu çözeltisi içerisine enjekte edilir. Oluşan lipozomlara etkin madde otomatik olarak yüklenmektedir [17].

Koaservasyon Yöntemi

Taşıyıcı materyal kullanılmadan prolipozom hazırlamak için kullanılan bir yöntemdir. Lipit, kolesterol ve etkin maddenin homojen, berrak etanolik çözeltisi bidistile su ile karıştırıldıktan sonra berrak veya şeffaf bir çözelti elde edilinceye kadar su banyosunda ısıtılır. Çözeltinin sıcaklığı düşürülerek prolipozomal jel oluşumu sağlanır [18].

4. Prolipozomların Karakterizasyonu

Uygulama açısından prolipozomların ve prolipozomlardan elde edilen lipozomal sistemlerin karakterize edilmesi çok önemlidir. Çeşitli fiziksel ve kimyasal parametrelerin kontrol ve takibi sağlanarak imalatın tekrarlanabilirliği ve prolipozomların istenen özelliklere sahip olduğu gösterilebilir. Kuru granüler formdaki prolipozomların karakterizasyonu için aşağıda yer alan parametreler kullanılmaktadır.

Morfolojik incelemeler

Taramalı Elektron Mikroskopisi (SEM) çoğunlukla prolipozomal tozun yüzey morfolojisini görüntülemek için kullanılmaktadır. Bu teknik sayesinde, lipit ile kaplama işleminin öncesi ve sonrasında taşıyıcı materyalin poröz yüzey özellikleri incelenebilmekte ve prolipozomların oluşumu saptanabilmektedir [2, 5, 19]. Geçirimli Elektron Mikroskopisi (TEM) çoğunlukla prolipozomların hidrasyonundan sonra oluşan lipozomların morfolojisini incelemek için kullanılmaktadır. Lipozom veziküllerinin tabakalanmasını ve şeklini gözlemek mümkün olmaktadır [2, 20].

Hidrasyon hızının tayini

Hidrasyon çalışması, prolipozomların hidrate olarak lipozomları oluşturma özelliklerini değerlendirmek için yapılır. Burada, lama alınan bir miktar prolipozomal toz üzerine damlalar halinde su eklenir ve veziküllerin oluşumu mikroskop altında gözlemlenir. Hidrasyonla lipozomlar 30 saniyeden daha az bir sürede hızlı bir şekilde oluşmalıdır [2].

Akış özelliklerinin değerlendirilmesi

Bir toz formülasyonunun akış özellikleri içerik tekdüzeliğini etkileyen, taşınma ve işleme sırasındaki en önemli mikromeritik özelliklerdendir. Formülasyonların doz ayarlamasından ambalajlanmasına kadar pek çok aşamada önemi vardır. Prolipozomların akış özelliği yığın açısı, Carr indeksi, Hausner oranı gibi parametreler ölçülerek değerlendirilmektedir [2, 21].

Birim Hacimdeki Vezikül Sayısı

Bu çalışma, hemositometrik olarak optik mikroskop altında hidrasyon sonrası oluşmuş lipozomların sayılmasıyla yapılmaktadır.

Partikül Büyüklüğü ve Zeta Potansiyel Ölçümü

Vezikül sistemler için önemli parametrelerden biri de vezikül büyüklüğü ve dağılımıdır. Bu işlem, prolipozomal tozun hidrasyonunu takiben uygun bir partikül büyüklüğü ölçüm cihazı

kullanılarak yapılmaktadır [22, 23]. Bu amaçla en çok dinamik ışık saçılımı (DLS) prensibi ile çalışan cihazlar kullanılmaktadır.

Zeta potansiyeli, çözeltinin elektro-nötral bölgesi ve sıkı bağlı tabaka yüzeyi (kayma düzlemi) arasındaki potansiyel fark olarak tanımlanmaktadır. Prolipozomal tozun hidrasyonunu takiben uygun bir zeta potansiyel tayin cihazı kullanılarak zeta potansiyel değeri ölçülmektedir [1, 22, 23].

Partikül büyüklüğü ve zeta potansiyeli ölçümleri hidrasyonla lipozomların oluşumu, partikül büyüklüğü üzerine lipid bileşiminin etkisi, lipozomların olası *in vivo* davranışlarının anlaşılması ve stabilite özelliklerinin değerlendirilmesini sağlar [5].

Yükleme Etkinliği Tayini

Yükleme etkinliği tayini için prolipozomal toz hidrate edildikten sonra lipozomlara yüklenmeyen etkin madde ultrasantrifüj veya ultrafiltrasyon gibi yöntemlerle uzaklaştırılır. Uygun bir analitik yöntem kullanılarak yükleme etkinliği tayin edilir [2, 19, 20].

Etkin Madde-Yardımcı Madde Etkileşimlerinin İncelenmesi

Saf etkin madde, taşıyıcı materyal, kolesterol ve lipidler arasındaki geçimlilik çalışmaları Fourier Dönüşümlü Kızıl Ötesi Spektrometresi (FTIR), diferansiyel taramalı kalorimetri (DSC) ve X-ışını toz kırınımı (XRPD) ile yapılabilmektedir [1, 24].

İn Vitro Çözünme Hızı Tayini

In vitro çözünme hızı çalışmaları, prolipozom formülasyonlarının karakterizasyonunda önemli bir adımdır. Prolipozomlar, zayıf çözünürlüğe sahip etkin maddelerin çözünürlüğünü veya çözünme hızını artırmak için kullanılacak ideal ilaç taşıyıcı sistemlerdir. Dolayısıyla, hazırlanan formülasyonların çözünme hızı profili *in vivo* salım davranışlarının ve derecesinin anlaşılmasına yardım etmektedir. Ayrıca, prolipozomal tozlar sonradan kapsül veya tablet gibi farklı bir final dozaj formuna yüklenecek ise incelenmesi gereken önemli bir parametredir. Çözünme hızı verileri, seçilen etkin madde için en iyi lipid ve lipid bileşiminin belirlenmesi için gerekli bilgileri sağlamaktadır [5].

Tablet formunda basıldıktan veya kapsül içine doldurulduktan sonra prolipozom formülasyonlarında *in vitro* çözünme hızı çalışmaları USP Apparatus 1 veya USP Apparatus 2 kullanılarak yapılabilmektedir. Eğer hidrasyon ile elde edilmiş lipozomal dispersiyon üzerinde çalışma yürütülecek ise diyaliz yöntemi tercih edilmektedir. Etkin maddenin diyaliz membrandan salınması etkin maddenin molekül ağırlığı, lipozom büyüklüğü, karıştırma hızı, çözünme ortamı ve diyaliz membranın geçirgenliğine bağlıdır [5, 20].

Permeabilite çalışmaları

Hücre kültüründe oluşturulan hücre tek tabakaları (Caco-2 gibi), etkin maddenin pasif difüzyonu, aktif taşınması ve hücreler arası permeabilitenin belirlenmesi için başarılı bir şekilde kullanılan *in vitro* permeabilite modelleridir. Prolipozomlara yüklü etkin maddenin *in vivo* absorpsiyon mekanizmalarının anlaşılmasını sağlamaktadır. Bunun yanısıra Paralel Yapay Membran Geçirgenlik Deneyi (PAMPA) gibi pasif transselüler etkin madde geçirgenliğini tahmin etmek için kullanılan hücre bazlı olmayan yapay olarak simüle edilmiş deneysel modeller de kullanılabilir. Ancak, bu yapay model taşıyıcı ve por aracılı geçirgenliğe sahip değildir. Hızlı (4-16 saat), ekonomik ve tekrar edilebilir sonuçlar veren *in vitro* bir tekniktir. Kan beyin bariyerinden, gastrointestinal membranlardan ve deriden geçişin çalışılabilirdiği modellerdir [5, 25].

5. İlaç Taşıyıcı Sistemler Olarak Prolipozomların Uygulama Yolları

Prolipozomlar, etkin maddenin özelliklerine ve hastalığın kendisine bağlı olarak çeşitli yollarla uygulanmak üzere formüle edilmiştir. Başlıca oral, IV, pulmoner, transdermal ve mukozal uygulama yolları ile uygulanmışlardır. Prolipozomlar, uygulama şekline bağlı olarak alımlarından sonra gastrik sıvı, ter, vajinal sıvı gibi vücudun farklı sıvı ve salgıları ile hidrate olurlar. Hidrate olur olmaz *in situ* bir şekilde lipozomların oluşumu gerçekleşir ve uzun süreli etkin madde salımı elde edilir. Ayrıca, prolipozomlar uygulanmadan hemen önce su veya tampon gibi hidrasyon sıvıları ile hidrate edilerek de kullanılmaktadır. Bu yol, genellikle parenteral prolipozom uygulamaları için tercih edilmektedir [3].

Oral Uygulama

İlaçların oral yolla verilmesi en çok tercih edilen uygulama şeklidir. Lipozomların gastrointestinal sistem koşullarındaki stabilitesinin az olması ve düzensiz, öngörülemez absorpsiyon profilleri nedeniyle oral yolla uygulanmaları sınırlıdır. Bunun en temel nedenlerinden birisi lipozomların absorpsiyon bölgelerinde bütünlüklerini koruyamamalarıdır. Bu problemin üstesinden gelmek için prolipozom formülasyonları hazırlanarak, çözünürlüğü zayıf olan etkin maddelerin çözünürlüklerinin ve oral biyoyararlanımının artırılması amaçlanmıştır [26]. Prolipozomlar, sıvı ile temas ettiğinde çok tabakalı lipozomları oluştururlar ve lipozomal tabakalar içindeki hidrofobik alanların artışı sayesinde suda çözünmeyen etkin maddelerin lipozomlara daha fazla miktarlarda yüklenmesini sağlarlar. Ayrıca, biyoadhezif yapıları ve nispeten küçük partikül büyüklükleri sayesinde düşük absorpsiyonu olan etkin maddelerin endositoz aracılığıyla emilimini artırabilmektedirler. Prolipozomlar lenfatik alıma ve ilk geçiş metabolizmasına uğrayan etkin maddelerin biyoyararlanımını artırır [2]. Yapılan çalışmalarda vinpocetin [27], zaleplon [28],

lovastatin [29] gibi çeşitli etkin maddelerin prolipozomal formülasyonları hazırlanarak oral biyoyararlanımları artırılmıştır. Konvansiyonel kaplama teknikleri ile hazırlanan PVP kaplı talk ve nişasta boncukları taşıyıcı olarak kullanılarak kromolin yüklü prolipozom formülasyonları hazırlanmıştır. Kromolinin transepitelyal geçişinde prolipozomal formül sayesinde 4-7 katlık bir artış sağlanmıştır [30]. Salmon Kalsitonin (sCT) prolipozom formülasyonları etkin maddenin Caco-2 hücrelerindeki permeabilitesini ve sıçanlardaki oral biyoyararlanımını 7.1 kat artırmıştır [31, 32]. Taşıyıcı olarak mikrokristal selülozun kullanıldığı dimristoilfosfatidilkolin, soya lesitin ve polisorbitat 80 kullanılarak hazırlanan Progesteron yüklü prolipozomlarının oral verilişteki etkinlikleri Caco-2 hücreleri ve ters çevirilmiş rat bağırsağı modelinde incelenmiştir. Etkin maddenin geçişinde bu modellerde sırasıyla 4 ila 6 katlık artışlar belirlenmiştir [33]. Taşıyıcı olarak mannitolün kullanıldığı silimarın yüklü prolipozomlar etkin maddenin beagle cinsi köpeklerdeki oral biyoyararlanımını saf etkin maddeye göre 3.7 kat artırmıştır [34]. Prolipozom formülasyonlarının oral yolla uygulanmasına yönelik yapılan diğer çalışmalar Tablo 3’de özetlenmiştir.

Tablo 3. Prolipozom formülasyonlarının oral yolla uygulanmasına yönelik yapılan çalışmalar

Formülasyon Bileşimi	Etkin Madde	Hazırlama Yöntemi	Sonuçlar	Ref.
Distearoil- fosfatidilkolin Dimristoil- fosfatidilgliserol Kolesterol	Eksemestan*	Film Depozisyon Yöntemi	PAMPA, sıçan bağırsağı ve Caco-2 hücreleri üzerinde yapılan permabilite çalışmaları, prolipozom formülasyonlarının çözünürlük ve permeabiliteyi artırarak oral absorpsiyonunu, dolayısıyla da biyoyararlanımı arttırdığı gösterilmiştir	[35]
Soya Fosfolipitleri Kolesterol İzoproil miristat Sodyum Kolat Mannitol*	Dehidrosilimarın	Film Dispersiyon Dondurarak Kurutma Yöntemi	Süspansiyon formülasyonları ile karşılaştırıldığında, tavşanlarda dehidrosilimarının oral biyoyararlanımı prolipozom formülasyonları ile artmıştır ve bu sonuç, prolipozomların küçük partikül boyutu, yapısındaki safra tuzları ve lipozomların biyolojik membranlara benzemesine dayandırılmıştır	[15]
Hidrojenlenmiş soya fosfatidilkolini Kolesterol Pearlitol SD 200*	İsradipin	Film Depozisyon Yöntemi	Wistar sıçanlar üzerinde yapılan <i>in vivo</i> oral biyoyararlanım çalışmaları sonucunda isradipinin oral süspansiyonuna göre prolipozom formülasyonları isradipinin biyoyararlanımını 2.4 kat artırmıştır	[36]
Fosfolipon 90H Disetil Fosfat Stearilamin Mannitol*	Raloksifen Hidroklorür	Film Depozisyon Yöntemi	İlaç taşınmasında yüzey yükünün GI absorpsiyon üzerine etkisinin önemli olduğu ve prolipozomların ilaç biyoyararlanımını 2-3 kat arttığı gösterilmiştir	[37]

Distearoil-fosfatidilkolin Dimristoil- fosfatidilgliserol Kolesterol Mikrokristal Selüloz*	Valsartan	Film Depozisyon Yöntemi	Prolipozom formülasyonları ile PAMPA, Caco-2 ve tersine çevrilmiş sıçan bağırsak kesesi modellerinde permeabilitenin, in vivo farmakokinetik çalışmalarda ise oral biyoyararlanımın saf maddeye göre arttığı gösterilmiştir	[38]
Yumurta Lesitin Cremophor RH40	Kuersetin	Etanol bazlı prolipozom hazırlama yöntemi	Kuersetin süspansiyonu ile karşılaştırıldığında prolipozom formülasyonları kuersetinin intestinal permeabilitesini ve oral biyoyararlanımını önemli derecede artırmıştır	[39]
Hidrojenlenmiş Soya Fosfatidilkolin Kolesterol Pearlitol® SD 200*	Lopinavir	Film Depozisyon Yöntemi	Wistar sıçanlar üzerinde yapılan <i>in vivo</i> çalışmalar sonucunda lopinavir içeren prolipozomların mevcut lopinavir preparatından ve saf etkin maddeden sırasıyla 1.16 ve 2.24 kat daha yüksek biyoyararlanım gösterdiği bulunmuştur	[26]

* Formülasyonda taşıyıcı olarak kullanılmıştır.

Parenteral Uygulama

Parenteral uygulama için hazırlanmış olan lipozomların sterilizasyonu zorunludur. Buhar ile sterilizasyon, radyasyonla sterilizasyon (γ -radyasyon), aseptik üretim ve filtrasyon farmasötik ilaç endüstrisinde kullanılan temel sterilizasyon teknikleridir. 121°C'deki buhar kullanılarak yapılan otoklav sterilizasyonu lipozomal formülasyonlar için uygun olmayabilir. Çünkü yüksek sıcaklık lipidlerin hidrolizine neden olarak lipozomların yapısını bozabilir. γ -radyasyon da doymamış lipidlerin peroksidasyonunu hızlandırarak ve hidrolizine neden olmasından dolayı lipozomal dispersiyonlar için uygun değildir. Aseptik üretim, validasyondaki zorluk ve maliyet nedeniyle yaygın bir şekilde kullanılmamaktadır. Final ürünlerin filtrasyon ile sterilizasyonu veziküllerin yapısal kompleksliği ve filtrelere absorpsiyon sonucu lipid kayıpları nedeniyle zor olabilir [2].

Prolipozomlar, lipozomların parenteral uygulanması için uygundur. İntrinsik özellikleri etkilenmeksizin sterilizasyona izin vermesi prolipozomların önemli bir avantajıdır. Ayrıca, prolipozomlar kuru sterilize formda saklanabilirler ve uygulamadan önce çok tabakalı lipozomal süspansiyonu oluşturmak üzere hidrate edilebilirler. Ek olarak, özellikle kuru halde γ -radyasyon ile sterilizasyona dayanıklıdır. Sulu lipozomal formülasyonlarda suyun radyasyona maruz kalmasından kaynaklanan hidroksil radikalleri hasara neden olan serbest radikallerin ana kaynağıdır. Dolayısıyla, kuru formda suyun olmaması nedeniyle prolipozomlar γ -radyasyon ile sterilize edilebilir [2].

Wang ve arkadaşları, IV yolla uygulamak üzere 7-Etil-10-hidroksikamptotesin (SN-38) içeren prolipozomlar hazırlamışlardır. Sıçanlarda yapılan *in vivo* çalışmalar sonucunda, IV uygulamadan sonra SN-38 çözeltisi ile karşılaştırıldığında SN-38 içeren prolipozomal formülasyonu ile SN-38'in dolaşımında daha fazla kaldığı ve etki süresinin uzadığı gösterilmiştir [40]. Parenteral yolla verilise uygun olarak farklı etkin madde ve imalat yöntemleri kullanılarak prolipozomal formülasyonlar geliştirilmiş *in vivo* etkinlikleri incelenmiştir (Tablo 4).

Tablo 4. Prolipozom formülasyonlarının parenteral yolla uygulanmasına yönelik yapılan çalışmalar

Formülasyon	Etkin Madde	Hazırlama Yöntemi	Sonuçlar	Ref.
Soya Lesitin Kolesterol Stearilamin Disetil fosfat Efervesan Granül * (NaHCO ₃ , monohidrat sitrik asit ve Tartarik asitten oluşmaktadır.)	İndometazin	Akışkan Yatak Yöntemi	Sıçanlarda karragen ile indüklenmiş pençe ödeminde prolipozomlardan elde edilen lipozomların saf etkin maddeye göre antiinflamatuvar etkiyi arttırdığı bulunmuştur	[41]
Yumurta Fosfatidilkolin Poloksamer 407	Adriamisin	Film Depozisyon Yöntemi	Prolipozomların IV infüzyonu ile sıçanlarda adriamisinin terminal yarı ömrü ile ortalama kanda kalış süresi arttırılmış ve lenf noduna hedefleme yapılmıştır	[42, 43]
Soya Fosfatidilkolin Kolesterol Polietilenglikol- distearoil-fosfatidil etanolamin Oleik asit sodyum tuzu*	Doksorubisin	Modifiye Etanol Enjeksiyon Yöntemi	Prolipozom verilen deneklerde saf etkin madde ile karşılaştırıldığında eğri altında kalan alan (AUC) 22 kat artarken, akut toksisitenin azaldığı ve fareler üzerindeki antikanser etkinin arttığı bulunmuştur	[17]
Lipoid E80 Kolesterol Tween 80 EDTA Mannitol*	Breviskapin	Etanol Enjeksiyon-Homojenizasyon-Liyofilizasyon Yöntemi	Prolipozomların hidrate edilmesi ile elde edilen breviskapin lipozomlarının farelere bolus uygulaması etkin madde eliminasyon fazını 4 kat uzatmıştır ve geliştirilen formül kalp hedefli tedavi için faydalı bulunmuştur	[16]

* Formülasyonda taşıyıcı olarak kullanılmıştır.

Pulmoner Uygulama

Akciğer sürfaktanlarına benzer yapıdaki fosfolipitlerden hazırlanmaları nedeniyle pulmoner ilaç taşıyıcı sistemler olarak lipozomlar önemli bir yere sahiptir. Lipozomlara etkin madde enkapsülasyonu ile solunum yolunda lokalize ilaç taşınması, ilaç etkisinin artırılması ve sistemik yan etkilerin azaltılması sağlanır. Ancak lipozomların stabilite problemleri ve büyük ölçekli üretimindeki zorluklar üstesinden gelinmesi gereken problemlerdir [2, 44].

Prolipozomlar akciğer dokusuna ilaç taşınması ve solunum yolunda lokal etki sağlamak için yüksek afiniteye sahip fosfolipitlere sahip olması, stabilitelerinin yüksek olması, küçük partikül büyüklükleri nedeniyle pulmoner ilaç taşınmasında büyük bir öneme sahiptir [7].

Pulmoner yolla ilaç taşınması 3 tip tıbbi cihazla sağlanır:

a. Basınçlı Ölçülü Doz İnhalerler

Ölçülü doz inhalerler, sıvılaştırılmış itici gaz içinde etkin maddelerin çözelti ve süspansiyonundan oluşur. Fosfolipitler için zayıf çözücü özelliğine sahip olmasından dolayı hidrofloroalkanların lipozomal formülasyonlarda itici gaz olarak kullanımı sınırlıdır. Ancak, prolipozomlar bu itici gazlarda süspande edilebilir ve lipozomların basınçlı ölçülü inhalerlerle uygulanması için taşıyıcı olarak kullanılabilir [2].

b. Kuru Toz İnhalerler

Kuru toz inhalerler, ilacı inhalasyon sırasında ince bir toz halinde veren sistemlerdir. Kuru toz inhalerler ile lipozomların kontrollü bir şekilde taşınması, potens artışı, toksisite azalması, ilaçların lokal olarak homojen verilmesi, hasta uyuncu, stabilite ve yüksek doz taşıma kapasitesi sağlanır. Kuru toz formunda olmaları nedeniyle prolipozomlar kuru toz inhalerler aracılığıyla lipozomların taşınmasında en iyi alternatiftir [2].

Rojanarat ve arkadaşları, levofloksasini (LEV) tüberküloz tedavisi için pulmoner yolla uygulamak üzere püskürterek kurutma yöntemiyle LEV içeren prolipozomlar hazırlamışlardır. LEV içeren prolipozomların saf LEV'e göre solunumla ilgili hücrelerde daha az toksik olduğu ve ikinci bir enfeksiyona yol açan enflamatuvar mediyatörlerin üretimine yol açmadığı bulunmuştur. LEV içeren prolipozomların *Mycobacterium bovis*'e karşı etkisi saf etkin maddeden önemli derecede fazla bulunmuş ve sıçanlarda yapılan *in vivo* tekrarlanan doz toksisitesi çalışmasında herhangi bir toksisite gözlenmemiştir [45].

c. Nebulizörler

Nebulizörler, pulmoner ilaç taşınması için yaygın bir şekilde kullanılan inhalasyon cihazlarıdır. Bu cihazlarla, çok fazla işlem gereksiz etkin madde taşıyan lipozomlar yüksek dozlarda uygulanabilir. Fakat etkin maddenin lipozomlardan sızması ve düşük stabilite lipozomlarla ilgili karşılaşılan problemlerdir. Bu problemlerin üstesinden gelmek için kuru toz formülasyonlar hazırlanmıştır. Liyofilizasyon ve öğütme kuru toz elde etmek amacıyla kullanılabilir, fakat bu işlemlerde uygulanan stres lipozomlar üzerinde zararlı etki gösterebilir. Dolayısıyla, prolipozomlar nebulizasyonla lipozomların taşınması için stabil bir alternatif olarak kullanılabilir [2].

Prolipozomlar jet nebulizatör ve titreşimli mesh nebulizatörü kullanılarak küçük damlacıklar halinde aerosol formuna getirilebilmektedir [3]. Püskürterek kurutma yöntemi ile hazırlanan izoniazid yüklü fosfatidilkolin bazlı prolipozom formülasyonlarının solunumla ilgili hücrelere toksik olmadığı ve ikinci bir enfeksiyona yol açabilecek enflamatuvar mediyatörlerin üretimine neden olmadığı bulunmuştur. Prolipozomların *Mycobacterium bovis*'e karşı etkilerinin saf etkin maddeden önemli derecede fazla olduğu bulunmuştur ve sıçanlarda yapılan in vivo tekrarlanan doz toksisitesi çalışmasında herhangi bir toksisite gözlemlenmemiştir [46, 47]. Bir diğer çalışmada ise rifapentin yüklü prolipozomların saf etkin maddenin akciğerlerdeki yarılanma ömrünü ($t_{1/2}$) ve ortalama alıkonma süresini (MRT) 7 kat uzattığı gösterilmiştir [48].

Transdermal Uygulama

Lipozomal sistemlerin ana bileşeni olan fosfolipitler deri lipitleri ile kolayca kaynaşabilmektedir ve etkin madde permeasyonunu arttırmak için kullanılmaktadır. Prolipozomlar deri üzerinde mukozal membranlara uygulandığında, mukozal sıvılarla temas ederek lipozomları oluştururlar ve sonuçta oluşan lipozomlar uzun süreli salım yapan dozaj formları olarak davranır. Deri yüzeyi ile birleşerek bir konsantrasyon gradyanı oluşturur ve difüzyonla geçişi sağlayarak permeasyonu artırır. Derinin hücre içi lipit tabakalarına veziküllerin girişi derinin düzenli yapısının akışkanlaşmasına ve dağılmasına neden olur. Stratum korneumun bariyer fonksiyonu ortadan kalkar [2].

Steroid bir aromataz inaktivatörü olan eksemestan zayıf çözünürlüğü ve ilk geçiş metabolizmasına uğraması nedeniyle sınırlı biyoyararlanıma sahiptir (% 42). Jukanti ve arkadaşları eksemestanın transdermal olarak verilmesi için koaservasyon yöntemi ile prolipozomal sistemler geliştirmişlerdir. Oral süspansiyon ile karşılaştırıldığında prolipozomal jellerle biyoyararlanımda 2.4 kat artış sağlanmıştır [18]. Prolipozomların transdermal uygulamalarına yönelik çalışmalar Tablo 5'de verilmiştir.

Ticari olarak "ProLipoTMNeo" isimli lesitin ve propandiol içeren prolipozom formülasyonu piyasada bulunmaktadır. Hidrofilik ve/veya lipofilik etkin maddeleri enkapsüle ederek biyoyararlanım ve deri penetrasyonunu arttırmak için tasarlanmıştır [3].

Tablo 5. Prolipozom formülasyonlarının transdermal yolla uygulanmasına yönelik yapılan çalışmalar

Formülasyon	Etkin Madde	Hazırlama Yöntemi	Sonuçlar	Ref.
Yumurta fosfatidilkolin Kolesterol Stearik Asit Etanol Bütanol İzopropil Alkol	Levonorgestrel	Koaservasyon Yöntemi	Levonorgestrelin transdermal yama formunda hazırlanan prolipozomal formülasyonlarının tavşanlar üzerindeki <i>in vivo</i> etkinliği incelenmiş krem formuna göre daha yüksek AUC değerleri elde edilmiştir	[49]
Soya Lesitin Kolesterol Sorbitol*	Glipizid	Film Depozisyon Yöntemi	Prolipozomal glipizid formülasyonu ile diyabetli sıçanlarda herhangi bir deri iritasyonu oluşmadan 24 saate kadar kontrollü etkin madde salımı sağlanmış ve yan etkiler önlenerek glukoz seviyesinde azalma gözlenmiştir	[50]
Fosfatidilkolin Kolesterol Mannitol*	Naproxen	Film Depozisyon Yöntemi	<i>In vitro</i> ve <i>ex vivo</i> çalışmalar prolipozomların etkin madde moleküllerinin deriye permeasyonunu arttırdığını gösterirken, <i>in vivo</i> çalışmalar pençe ödemi geliştirilen sıçanlarda prolipozomal jelin ticari preparata göre daha iyi antiinflamatuvar aktivite sağladığını göstermiştir	[51]
Soya Fosfatidilkolin Kolesterol	Lizinopril Dihidrat	Koaservasyon Yöntemi	Deride iritan etkileri olmadığı gösterilen prolipozomal jel formülasyonları <i>ex vivo</i> permeabilite çalışmalarında sürekli ve yüksek oranda deriden geçiş sağlamıştır	[52]

* Formülasyonda taşıyıcı olarak kullanılmıştır.

Mukozal Uygulama

Prolipozomlar mukozal sıvılara temas ettiklerinde veziküler yapıları oluştururlar. Yapılarında bulunan fosfolipitler biyolojik membranlar için doğal afiniteye sahiptir ve lipozomlar mukozada birikerek etkin maddenin kalış süresini artırırlar. Mukozal retansiyondaki artış ile biyoyararlanım da artar [2].

Vajinal taşıyıcı sistemler sıklıkla lokal mantar enfeksiyonlarının tedavi edilmesi için kullanılmaktadır. Klasik formülasyonlardaki antifungal ve steroid bileşenlerin zayıf çözünürlükleri moleküler olarak dağılımlarını sınırlar ve dolayısıyla etki bölgesinde yeterli konsantrasyon sağlanamaz [2]. Klotrimazol geniş ve etkili bir şekilde vulgovajinal kandidiazis tedavisi için kullanılmaktadır, fakat suda düşük çözünürlüğe sahiptir. Ticari olarak mevcut krem, merhem ve jel gibi klasik klotrimazol vajinal formülasyonlarla etkin maddelerin hedef bölgede nispeten kısa bir süre kaldığı düşünülmektedir. Ning ve arkadaşları klotrimazolün prolipozom formülasyonunu geliştirerek sıçanlarda standart merhem ile fungusidal etkisini karşılaştırmışlardır. Klotrimazol içeren vajinal prolipozomlar uzun süreli etkin madde salımı sağlamış ve mukozada kalma süresini

artırmıştır. Standart merhem ile karşılaştırıldığında antifungal etki daha yüksek bulunmuştur. Sistemin vajinal dokuların morfolojisini olumsuz bir şekilde etkilemediği gözlemlenmiştir [53].

Nazal yolla mukoadhezif formülasyon uygulaması, terapötik bileşiklerin lokal ve sistemik olarak taşınmasını arttırmaktadır. Nazal yol, oral absorpsiyonu düşük olan etkin maddelerin sistemik verilmesi için umut verici bir alternatiftir. Kısa yarılanma ömrüne sahip etkin maddelerin uzun süreli salımının olmaması ve nazal boşluktaki kalış sürelerini kısıtlayan mukosilyer klirensin varlığı nazal ilaç verilmesi ilgili sınırlamalardır. Prolipozomların hidrasyonu ile oluşan lipozomlar yüzey viskoziteleri nedeniyle mukosilyer klirensi azaltır ve mukus membranı ile uzun süreli etkileşim sağlar. Hidrasyon işlemi sistemik dolaşımda kısa yarılanma ömrüne sahip maddelerin daha uzun süre plazma konsantrasyonlarının sağlanmasında önemli rol oynamaktadır [2, 54].

Propranolol sulu bir çözelti olarak intranazal olarak uygulandığında hızlı absorbe olan bir beta blokördür. Sistemik dolaşımdan hızlı bir şekilde elimine edilir ve bu nedenle sık dozlama gerekmektedir. Ahn ve arkadaşları propranololün nazal uygulaması için prolipozomları kullanmıştır. Prolipozomların nazal boşluktaki yavaş hidrasyonu nedeniyle daha uzun süreli plazma konsantrasyonu sağlanmıştır. Prolipozomlar ve lipozomlar arasındaki ortalama alıkonma süresi farkı olarak tanımlanan prolipozomların ortalama hidrasyon süresi değerlendirilmiştir. Bu değer 80.4 dakika bulunmuştur ve prolipozomların nazal boşlukta çok yavaş bir şekilde hidrate olduğu böylece nazal boşlukta daha uzun süre kaldığını gösterilmiştir [55].

SONUÇ VE TARTIŞMA

Prolipozomlar su veya biyolojik sıvılarla temas ettiğinde hidrate olarak lipozomları oluşturan formülasyonlardır. Özellikle çözünürlüğü düşük etkin maddelerin çözünürlük ve biyoyararlanımlarının artırılmasında ve lipozomlarla ilgili stabilite problemlerinin aşılmasında önemli bir rol oynarlar. Farmasötik alanda geniş bir kullanımı olan prolipozomlar başlıca oral, parenteral ve transdermal yollar ile uygulanmaktadır. Kontrollü etkin madde salımı sağlamalarından dolayı tanı ve tedavi amacıyla yüksek kullanım potansiyeline sahiptirler. Püskürterek kurutma ve alışkan yatak gibi yöntemler kullanılarak büyük ölçekte üretilebilmekte ve kuru toz formunda olmaları nedeniyle tablet, kapsül gibi dozaj formları haline getirilebilmektedirler. Yüksek fiziksel ve kimyasal stabiliteyi nedeniyle umut verici ilaç taşıyıcı sistemlerdir.

KAYNAKLAR

1. Kumara, B.C., Parthiban, S., Senthil kumar, G.P., Tamiz Mani, T. (2015). Proliposome: A novel approach to carrier drug delivery system. *International Journal of Biopharmaceutics*, 6(2), 98-106
2. Shaji, J., & Bhatia, V. (2013). Proliposomes: A brief overview of novel delivery system. *Int J Pharm Biosci*, 4, 150-160.
3. Sezgin Bayindir, Z., &Yuksel, N. (2015). Provesicles as novel drug delivery systems. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 16(4), 344-364
4. Moreira, A. R. S. (2015). Development of proliposomes as a vehicle to deliver new molecules with antitumor activity. Faculty of Medicine of University of Porto, Portugal.
5. Nekkanti, V., Venkatesan, N., Betageri, G. (2015). Proliposomes for oral delivery: progress and challenges. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 16(4), 303-312.
6. Veerapu, G., Gangadharappa, H. V., Nagashubba, B., Balamuralidhara, V. (2014). Review on novel carrier system: liposomes and proliposomes. *Drug Delivery Letters*, 4(2), 96-109
7. Manani, H., Prajapati, B., Patel, R. (2016). Review of Preliposomes as novel drug delivery system. *The Pharma Innovation*, 4(3), 61-67
8. Sun, C., Wang, J., Liu, J., Qui, L., Zhang, W., Zhang, L. (2013). Liquid proliposomes of nimodipine drug delivery system: preparation, characterization, and pharmacokinetics. *AAPS PharmSciTech*, 14(1), 332-338.
9. Tunsirikongkon, A., Pyo, Y.C., Kim, D.H., Lee, S.E., Park, J.S. (2019). Optimization of Polyarginine-Conjugated PEG Lipid Grafted Proliposome Formulation for Enhanced Cellular Association of a Protein Drug. *Pharmaceutics*. 11(6).
10. Khan, I., Yousaf, S., Subramanian, S., Korale, O., Alhnan, M.A., Ahmed, W., Taylor, K.M., Elhissi, A. (2015). Proliposome powders prepared using a slurry method for the generation of beclometasone dipropionate liposomes. *International Journal of Pharmaceutics*, 496(2), 342-50.
11. Omer, H.K., Hussein, N.R., Ferraz, A., Najlah, M., Ahmed, W., Taylor, K.M.G., Elhissi, A.M.A. (2018). Spray-Dried Proliposome Microparticles for High-Performance Aerosol Delivery Using a Monodose Powder Inhaler. *AAPS PharmSciTech*. 19(5), 2434-2448.
12. Ye, T., Sun, S., Sugianto, T.D., Tang, P., Parumasivam, T., Chang, Y.K., Astudillo, A., Wang, S., Chan, H.K. (2018). Novel combination proliposomes containing tobramycin and clarithromycin effective against *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *International Journal of Pharmaceutics*, 552(1-2), 130-138.
13. Katare, O.P., Vyas, S.P., Dixit, V.K. (1990). Effervescent granule based proliposomes of ibuprofen. *Journal of Microencapsulation*, 7(4), 455-62.

14. Falconer, J.R., Svirskis, D., Adil, A.A., Wu, Z. (2015). Supercritical Fluid Technologies to Fabricate Proliposomes. *Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 18(5), 747-64.
15. Chu, C., Tong, S. S., Xu, Y., Wang, L., Fu, M., Ge, Y. R., Xu, X. M. (2011). Proliposomes for oral delivery of dehydrosilymarin: preparation and evaluation in vitro and in vivo, *Acta Pharmacologica Sinica*, 32(7), 973-980.
16. Fei, X., Chen, X., Liang, G., Yue-Jian, C., Hao, W., Ning, G., Jia-Bi, Z. (2009). Preparation, characterization, and biodistribution of breviscapine proliposomes in heart. *Journal of Drug Targeting*, 17(5), 408-414.
17. Junping, W., Maitani, Y., Takayama, K., Nagai, T. (2000). In vivo evaluation of doxorubicin carried with long circulating and remote loading proliposome. *International Journal of Pharmaceutics*, 203(1), 61-69.
18. Jukanti, R., Sheela, S., Bandari, S., Veerareddy, P. R. (2011). Enhanced bioavailability of exemestane via proliposomes based transdermal delivery. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 100(8), 3208-3222.
19. Chaves, M.A., Pinho, S.C. (2019). Curcumin-loaded proliposomes produced by the coating of micronized sucrose: Influence of the type of phospholipid on the physicochemical characteristics of powders and on the liposomes obtained by hydration. *Food Chemistry*, 291, 7-15.
20. Weng, W., Wang, Q., Wei, C., Man, N., Zhang, K., Wei, Q., Adu-Frimpong, M., Toreniyazov, E., Ji, H., Yu, J., Xu, X. (2019). Preparation, characterization, pharmacokinetics and anti-hyperuricemia activity studies of myricitrin-loaded proliposomes. *International Journal of Pharmaceutics*, 572, 118735.
21. Ahn, B.N., Kim, S.K., Shim, C.K. (1995). Preparation and evaluation of proliposomes containing propranolol hydrochloride. *Journal of Microencapsulation*, 12(4), 363-75.
22. Zhang, M., Wang, Q., Wan, K.W., Ahmed, W., Sun, X. (2019). Liposome mediated-CYP1A1 gene silencing nanomedicine prepared using lipid film-coated proliposomes as a potential treatment strategy of lung cancer. *International Journal of Pharmaceutics*, 566, 185-193.
23. Jiao, Z., Wang, X., Han, S., Zha, X., Xia, J. (2019). Preparation of vitamin C liposomes by rapid expansion of supercritical solution process: Experiments and optimization. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 51, 1-6
24. Karn, P.R., Jin, S.E., Lee, B.J., Sun, B.K., Kim, M.S., Sung, J.H., Hwang, S.J. (2014). Preparation and evaluation of cyclosporin A-containing proliposomes: a comparison of the supercritical antisolvent process with the conventional film method. *International Journal of Nanomedicine*, 9, 5079-91.
25. Nekkanti, V., Wang, Z., Betageri, G.V. (2016). Pharmacokinetic Evaluation of Improved Oral Bioavailability of Valsartan: Proliposomes Versus Self-Nanoemulsifying Drug Delivery System. *AAPS PharmSciTech*, 17(4), 851-62.

26. Patel, G. M., Shelat, P. K., Lalwani, A. N. (2016). QbD based development of proliposome of lopinavir for improved oral bioavailability. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 108, 50-61.
27. Xu, H., He, L., Nie, S., Guan, J., Zhang, X., Yang, X., Pan, W. (2009). Optimized preparation of vincopocetine proliposomes by a novel method and in vivo evaluation of its pharmacokinetics in New Zealand rabbits. *Journal of Controlled Release*, 140(1), 61-68.
28. Janga, K. Y., Jukanti, R., Velpula, A., Sunkavalli, S., Bandari, S., Kandadi, P., Veerareddy, P. R. (2012). Bioavailability enhancement of zaleplon via proliposomes: Role of surface charge. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 80(2), 347-357.
29. Yanamandra, S., Venkatesan, N., Kadajji, V. G., Wang, Z., Issar, M., Betageri, G. V. (2014). Proliposomes as drug delivery system to decrease the hepatic first-pass metabolism: case study using a model drug. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 64, 26-36
30. Deshmukh, D., Revis, W. R., Betageri G. V. (2008). Improved delivery of cromolyn from oral proliposomal beads. *International Journal of Pharmaceutics*, 358(1), 128-136.
31. Song, K. H., Chung, S. J., Shim, C. K. (2002). Preparation and evaluation of proliposomes containing salmon calcitonin. *Journal of Controlled Release*, 84(1), 27-37.
32. Song, K. H., Chung, S. J., Shim, C. K. (2005). Enhanced intestinal absorption of salmon calcitonin (sCT) from proliposomes containing bile salts. *Journal of Controlled Release*, 106(3), 298-308.
33. Potluri, P., & Betageri, G. V. (2006). Mixed-micellar proliposomal systems for enhanced oral delivery of progesterone. *Drug Delivery*, 13(3), 227-232.
34. Yan-yu, X., Yun-mei, S., Zhi-peng, C., Qi-neng, P. (2006). Preparation of slymarin proliposome: a new way to increase oral bioavailability of slymarin in beagle dogs. *International Journal of Pharmaceutics*, 319(1), 162-168.
35. Hiremath, P. S., Soppimath, K. S., Betageri, G. V. (2009). Proliposomes of exemestane for improved oral delivery: formulation and in vitro evaluation using PAMPA, Caco-2 and rat intestine. *International Journal of Pharmaceutics*, 380(1), 96-104.
36. Bobbala, S. K. R., Veerareddy, P. R. (2012). Formulation, evaluation, and pharmacokinetics of isradipine proliposomes for oral delivery. *Journal of Liposome Research*, 22(4), 285-294.
37. Velpula, A., Jukanti, R., Janga, K. Y., Sunkavalli, S., Bandari, S., Kandadi, P., Veerareddy, P. R. (2013). Proliposome powders for enhanced intestinal absorption and bioavailability of raloxifene hydrochloride: effect of surface charge. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 39(12), 1895-1906.
38. Nekkanti, V., Venkatesan, N., Wang, Z., Betageri, G. V. (2015). Improved oral bioavailability of valsartan using proliposomes: design, characterization and in vivo pharmacokinetics. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 41(12), 2077-2088.

39. Ren, J., Fang, Z., Jiang, L., Du, Q. (2017). Quercetin-containing self-assemble proliposome preparation and evaluation. *Journal of Liposome Research*, 27(4), 335-342.
40. Wang, S., Ye, T., Yang, B., Yi, X., Yao, H. (2013). 7-ethyl-10-hydroxycamptothecin proliposomes with a novel preparation method: optimized formulation, characterization and in vivo evaluation. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 39(2), 393-401.
41. Katare, O. P., Vyasx, S. P., Dixit, V. K. (1995). Enhanced in vivo performance of liposomal indomethacin derived from effervescent granule based proliposomes. *Journal of microencapsulation*, 12(5), 487-493.
42. Lee, H. J., Ahn, B. N., Yoon, E. J., Paik, W. H., Shim, C. K., Lee, M. G. (1995). Pharmacokinetics and tissue distribution of adriamycin and adriamycinol after intravenous administration of asriamycin-loaded neutral proliposomes to rats. *International Journal of Pharmaceutics*, 121(1), 1-10.
43. Lee, H. J., Ahn, B. N., Paik, W. H., Shim, C. K., Lee, M. G. (1996). Inverse targeting of reticuloendothelial system-rich organs after intravenous administration of adriamycin-loaded neutral proliposomes containing poloxamer 407 to rats. *International Journal of Pharmaceutics*. 131(1), 91-96.
44. Elhissi, A., Gill, H., Ahmed, W., Taylor, K. (2011). Vibrating-mesh nebulization of liposomes generated using an ethanol-based proliposome technology. *Journal of Liposome Research*, 21(2), 173-180.
45. Rojanarat, W., Nakpheng, T., Thawithong, E., Yanyium, N., Srichana, T. (2012). Levofloxacin-proliposomes: opportunities for use in lung tuberculosis. *Pharmaceutics*, 4(3), 385-412.
46. Rojanarat, W., Changsan, N., Tawithong, E., Pinsuwan, S., Chan, H. K., Srichana, T. (2011). Isoniazid proliposome powders for inhalation-preparation, characterization and cell culture studies. *International journal of Molecular Sciences*, 12(7), 4414-4434.
47. Rojanarat, W., Nakpheng, T., Thawithong, E., Yanyium, N., Srichan, T. (2012). Inhaled pyrazinamide proliposome for targeting alveolar macrophaged. *Drug Delivery*, 19(7), 334-345.
48. Patil-Gadhe, A., Pokharkar, V. (2014). Single step spray drying method to develop proliposomes for inhalation: a systematic study based on quality by design approach. *Pulmonary Pharmacology & Therapeutics*, 27(2), 197-207.
49. Deo, M. R., Sant, V. P., Parekh, S. R., Khopade, A. J., Banakar, U. V. (1997). Proliposome-based transdermal delivery of levonorgestrel. *Journal of Biomaterials Applications*, 12(1), 77-88.
50. Parthiban, S., Senthil Kumar, G. P. (2016). Development of Proliposomal Gel Containing Glipizide for Better Anti Diabetic Effect. *American Journal of PharmTech Research*, 6(4), 504-518.
51. Vure, P., Saritha, T., Prakash, D., Triveni, C. (2014). Pro-Vesicular (PV)-Based gel for the topical delivery of Naproxen: Preparation, characterization and in vivo evaluation. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*, 7(1), 195-200.

52. Bandari, S., Gangishetty, S., Eedara, B. B., Jukanti, R., Veerareddy, P. R. (2013). Proliposomes of lisinopril dihydrate for transdermal delivery: Formulation aspects and evaluation. *Korean Journal of Chemical Engineering*, 30(8), 1659-1666.
53. Ning, M. Y., Guo, Y. Z., Pan, H. Z., Yu, H. M., Gu, Z. W. (2005). Preparation and evaluation of proliposomes containing clotrimazole. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 53(6), 620-624.
54. Jung, B. H., Chung, B. C., Chung, S. J., Lee, M. H., Shim, C. K. (2000). Prolonged delivery of nicotine in rats via nasal administration of proliposomes. *Journal of Controlled Release*, 66(1), 73-79.
55. Ahn, B. N., Kim, S. K., Shim, C. K. (1995). Proliposomes as an intranasal dosage form for the sustained delivery of propranolol. *Journal of Controlled Release*, 34(3), 203-210.



RASYONEL İLAÇ TASARIMINDA MOLEKÜLER MEKANİK VE MOLEKÜLER DİNAMİK YÖNTEMLERİN KULLANILMA AMACI

THE AIM OF IMPLEMENTATION OF THE MOLECULAR MECHANIC AND THE MOLECULAR DYNAMIC METHODS IN RATIONAL DRUG DESIGN

Dilara EREN*, İsmail YALÇIN

Ankara Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Kimya A.D., 06560, Yenimahalle, Ankara,
Türkiye

ÖZ

Amaç: Bu derlemenin amacı Rasyonel İlaç Tasarımında kullanılan Moleküler Mekanik ve Moleküler Dinamik yöntemlerinin incelenmesi, yöntemlerin temelini araştırılması, avantaj ve dezavantajlarının ortaya konmasını sağlamaktır.

Sonuç ve Tartışma: Yeni ilaç etken maddesi keşfi Farmasötik Kimya'nın temel ilgi alanıdır. Yeni ilaç etken maddesi keşfinde kullanılan Bilgisayar Destekli İlaç Tasarımı Yöntemleri günümüzde dikkat çeken yöntemlerdir. Bu yöntemler arasında kullanılan Moleküler Dinamik (MD) moleküller ve atomların bir araya gelerek etkileştikleri sistemin zaman içindeki gelişimini tahmin etmekte kullanılan bir bilgisayar simülasyonu (benzetim) metodudur ve MD'nin dayandığı temel fikir moleküllerin zamana bağlı veya zamandan bağımsız mikroskopik davranışlarını simülasyonlarla gözlemleyerek oluşabilecek biyolojik aktiviteyi tahmin edilebilmeyi mümkün kılmaktır. 1970'lerden beri moleküler dinamik proteinler ve nükleik asitler gibi makromoleküllerin dinamik ve yapısal özellikleriyle ilgili çalışmalarda yaygın olarak kullanılmaktadır. Moleküler Mekanik ise moleküler sistemleri modellemek için klasik mekanik metotları kullanan, sistemin molekül içi ve moleküller arası enerjilerini "kuvvet alanları" oluşturarak hesaplama yöntemidir. Yeni ilaç etken maddesi keşfi zorlayıcı, zaman gerektiren ve pahalı bir süreçtir. Bu sürecin daha kolay hale gelmesi, daha az zaman ve emek harcayarak ve daha ucuz bir şekilde yürütülebilmesi için Moleküler Dinamik ve Moleküler Mekanik Yöntemler ağırlıklı çalışmalar yapılması yararlı olacaktır.

Anahtar Kelimeler: moleküler dinamik, moleküler mekanik, moleküler modelleme, rasyonel ilaç tasarımı, yeni ilaç keşfi

ABSTRACT

Objective: In this review, it's aimed to view the Molecular Dynamics and Molecular Mechanics methods to use in Rational Drug Design, research the basics, exhibit the advantages and disadvantages of these methods.

* Sorumlu Yazar / Corresponding Author: Dilara Eren
e-posta / e-mail: deren@ankara.edu.tr

Result and Discussion: *The discovery of drug active substance is the main research interest of the Pharmaceutical Chemistry. Computer Aided Drug Design Methods are used in the discovery of new drug active substances are the methods attract attention. Molecular Dynamics is the computational simulation method to predict the development of the system that molecules and atoms interact together over time. The basic idea is to make it possible to predict the biological activity that may occur by observing the time dependent or time independent microscopic behavior of molecules. Since 1970's it's been widely used in studies of the dynamic and structural properties of macromolecules such as proteins & nucleic acids. Molecular Mechanics is the method of calculating the intramolecular and intermolecular energies of the system by creating force fields by using classical mechanical methods to model molecular systems. The discovery of new drug is challenging, time consuming and expensive process. These studies should be conducted in order to make this process easier, cheaper, to spend less time and effort.*

Keywords: *molecular dynamics, molecular mechanics, molecular modelling, new drug design, rational drug design*

GİRİŞ

Rasyonel İlaç Tasarımı ve 3D yapı

Hastalıkların tedavi edilmesi için yeni terapötik ajanların rasyonel tasarımı medisinal kimyacıların en çok ilgi gösterdiği alanlardandır. Yıllarca yeni ilaç keşfinde, öncü bir molekülden yola çıkarak istenen biyolojik aktiviteye sahip analog bileşikler bulmak stratejisi uygulanmıştır. Ancak bu süreç, birçok deneme ve hata döngüsünü de içermektedir. Dolayısıyla yorucu ve pahalı bir süreçtir. Bu kısıtlamaları aşarak ilaç geliştirebilmek için geleneksel yöntemler artık hastalıkların altında yatan moleküler süreçlerin araştırılmasını sağlayan daha dolaysız yaklaşımlarla desteklenmektedir. Bu yaklaşımlar rasyonel ilaç tasarımının temelini oluşturur [1-3].

Moleküler süreçlere dayanarak yapılacak ilaç tasarımı için başlangıç noktası; reseptör, enzim ya da nükleik asitler gibi biyomoleküler hedeflerdir. Biyomoleküller, sinyal iletimine veya metabolik süreçlerin değiştirilmesine yol açan protein-protein etkileşimleri veya protein-nükleik asit etkileşimleri aracılığıyla hastalıkların ilerlemesinde kritik bir role sahiptirler. Bu nedenle biyomolekülleri göz önünde bulunduran bir yöntem olan rasyonel ilaç tasarımı ilaçlarla ilişkili problemlerin üstesinden gelmek için önemlidir [1-3].

Moleküller 1970'lerin başına kadar 2 boyutlu oluşumlar olarak değerlendirilmiş ve 2 boyutlu kimyasal çizimler şeklinde tanımlanmıştır [1]. Bu çizimler hangi atomun hangi atomla bağlantılı olduğunu gösterirler. Fakat atomların uzayda düzenlenişini ele almazlar. Oysa moleküller 3 boyutlu oluşumlardır ve stereokimyasal özellikleri vardır [4]. 3D (üç boyutlu) ifade kimyacıların algısını geliştirmiştir ve mevcut kimyasal sezgilerini genişletmeye katkıda bulunmuştur. Böylece, üç boyutlu kantitatif yapı-aktivite ilişkileri (3D-QSAR) kavramları göz önüne alınmaya başlanmıştır. İlaçların biyolojik aktivitelerinin, 3D moleküler özellikleriyle tanımlanabileceği ortaya çıkmıştır. Bu amaçla bilgisayarların grafiksel özellikleri yoğun olarak kullanılmaya başlanmıştır [1].

1. Kompütasyonel (Hesaplamalı) Kimya, Bilgisayar Destekli İlaç Tasarımı ve Moleküler Modelleme

Teorik Kimya, Kompütasyonel Kimya ve Moleküler Modelleme terimlerinin anlamları arasında çok sayıda karışıklık bulunmaktadır [5].

Teorik Kimya, kimyanın matematiksel ifadesi olarak tanımlanabilir [6]. Çoğunlukla kuantum mekanik terimiyle eş anlamlı kabul edilir [5].

Kompütasyonel (hesaplamalı) Kimya ise sadece kuantum mekaniğini değil moleküler mekanik, minimizasyon, simülasyon, konformasyonel analizler ve moleküler sistemlerin davranışlarının anlaşılması için kullanılan diğer bilgisayara dayalı yöntemleri kapsar [5]. Yöntem bilgisayar donanımı ve yazılımlarındaki muazzam gelişmelerden sonra son derece popüler hale gelmiştir [6].

Moleküler Modelleme ise kompütasyonel kimyadan yararlanarak moleküllerin *in silico* ortamda üç boyutlu yapı-etki ilişkilerini analizleyen simülasyon tekniklerini içerir [6].

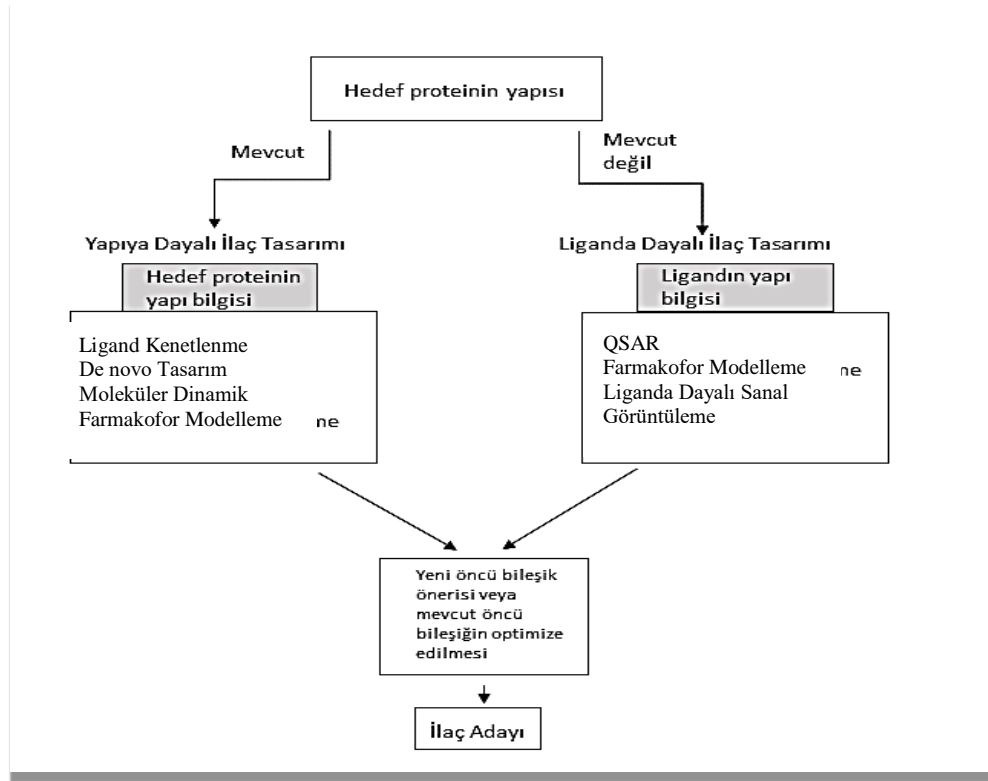
Bilgisayar destekli yöntemler yıllardır ilaç keşfinde merkezi bir rol oynamaktadırlar [7] (Şekil 1). Bu yöntemler bilinen klasik yöntemlerle kıyaslandığında yeni ilaç adayları elde etmede daha hızlı ve daha düşük maliyetlidir [8]. Onaylı birçok ilacın geliştirilmesinde Bilgisayar Destekli İlaç Tasarımı (Computer Aided Drug Design - CADD) önemli ölçüde fayda sağlamıştır [7,9].

CADD kompütasyonel kimyayı kullanan moleküler modelleme tekniklerini içeren bir disiplindir. Fizikten ve kompütasyonel kimyadan farklıdır çünkü fizik ve kompütasyonel kimya atomik veya moleküler düzeydeki kimyasal fenomenlerin açıklanmasına odaklanırken CADD buna ek olarak medisinal kimyanın temel sorusu olan şu soruya da cevap arar “Moleküler yapı ile biyolojik etki arasında hangi ilişkiler yer almaktadır?”

CADD, 2 temel misyonla medisinal kimyanın optimizasyonuna katkı sağlar; küçük moleküllerin (ligand) proteine (reseptör) nasıl bağlanacağını tahmin edilmesi ve genellikle ve yaklaşık bağlanma affinitesinin tahmin edilmesi [7,9].

Liganda dayalı ilaç tasarımı: İlgilenilen biyolojik hedefe bağlanacak olan molekülün biliniyor olmasına dayanır. Biyolojik hedefin modeli ona bağlanan moleküllerin yapısına dayanarak oluşturulur ve bu oluşturulan hedefle etkileşebilecek yeni moleküler oluşumlar tasarlanır [10].

Yapıya dayalı ilaç tasarımı: Biyolojik hedefin 3D yapısının bilinmesine dayanır. Biyolojik hedefin 3D yapısı NMR veya X-ray kristallografisi yöntemiyle aydınlatılır. Yapıya dayalı ilaç tasarımı yeni ligandlar tasarlamada temel olarak proteinin yapısını kullanır. Bu yöntemin temeli; iyi bir ligand molekülünün hedefe sıkı bir şekilde bağlanacağı varsayımdır. Bu nedenle potansiyel yeni ligand tasarlamada veya elde etmede temel prensip bilinen bir ligandın hedefe bağlanma affinitesinin tahmin edilmesi ve seçim için bunun bir kriter olarak kullanılmasıdır [11].



Şekil 1. Bilgisayar destekli ilaç tasarımı yöntemleri

Yapıya dayalı ilaç tasarımında, CADD yönteminin temel hedefi molekülün hedefe bağlanıp bağlanmayacağı veya ne kadar güçlü bağlanacağı ile ilgili tahminde bulunmaktadır [11]. Yani, CADD istenilen biyolojik etkiyi elde etmek için hangi molekülün sentezlenmesi gerektiği ile ilgili tahminler yapmayı hedefler [12].

Reseptör ve ligandın birbirine bağlanabilmesi için belirli konformasyonlarda olmaları gereklidir. Konformasyon, moleküllerin bağlarında herhangi bir değişiklik olmadan tekli bağları etrafında serbest dönüşü ile sahip oldukları 3D uzaysal geometrileridir. Konformasyon değiştikçe molekülün enerjisi ve dolayısıyla kararlılığı değişir. Konformasyon analizi yapılarak moleküllerin (reseptör-ligand, ilaç-protein vb.) bağlanma yüzey enerjilerinin hesaplanması sağlanır. Bu amaçla Moleküler Mekanik ve Moleküler Dinamik ligand konformasyonunun tahmin edilmesinde ve ligand biyolojik hedefe (protein) bağlandığında proteinin konformasyonel değişiminin modellenmesinde en sık kullanılan yöntemlerdir. Semi-ampirik, ab-initio, kuantum kimyasal yöntemler ve yoğun fonksiyonel teoriler moleküler mekanik hesaplamalar için parametrelerin optimize edilmesinde sıklıkla kullanılır ve ayrıca ilaç adayının bağlanma affinitesini etkileyecek elektronik özelliklerinin tahmin edilmesini sağlarlar [11].

1980'lerin başında ilaç sanayisinde CADD için çok büyük bir ilgi vardı. Örneğin; Fortune dergisi 5 Ekim 1981 başlık: Sıradaki endüstriyel devrim, Merck'de ilaçlar bilgisayarlarla tasarlanıyor.

1980lerde ilaç sanayinde yatırımcılar bu alana milyonlarca dolar yatırım yaptılar. 1989-1991 yılları arasında ilaçların tek tek atom atom tasarlanabileceği fikri popüler hale geldi [12].

1990'ların sonlarında CADD yeniden-ivme kazandı. Hedefe dayalı ilaç tasarımı HIV proteaz inhibitörlerinin (ritonavir, indinavir) geliştirilmesinde önemli rol oynamıştır. Daha da fazlası farmakofora dayalı ilaç tasarımıyla yeni ilaç adayları geliştirilmiştir, De novo tasarımıyla ilaç geliştirmeden kullanılmıştır ve Lipinski ve arkadaşları molekülün ilaç olabilmesi için gerekli olan basit kuralları geliştirmişlerdir [12].

Günümüzde artık taxol örneğinde olduğu gibi doğal moleküllerin hiç modifiye edilmeden ilaç olarak kullanılması nadirdir. Çoğu ilaç, keşif programları sayesinde biyomoleküler hedefin tanımlanmasıyla yani rasyonel ilaç tasarım yöntemleri ile elde edilmektedir. Çoğunlukla ilaç keşfinde klinik öncesi çalışmalar sonunda da bu yöntemlerle bazı ufak tefek düzetmeler yapılmaktadır [8].

Modeller, hesaplamaları ve tahminleri kolaylaştırmak için bir sistem ya da sürecin tanımlanmasını genellikle matematiksel terimlerle basitleştiren veya idealleştiren tasarımlardır [5]. Karmaşık matematiksel manipülasyonları gerçekleştirilmeden olayları tahmin etmemizi ve anlamamızı sağlarlar [6]. Modelleme, yapısal / dinamik / termodinamik kalıpları sistematik bir şekilde araştırmak, hipotezleri test etmek ve geliştirmek, deneysel verileri yorumlamak ve genişletmek ve moleküler yapıyı, esnekliği ve işlevleri yöneten temel yasaları daha iyi anlamak ve genişletmek için bir yol sağlar. Moleküler modelleme yöntemi bu nedenlerden dolayı model oluşturarak ve hesaplama yoluyla moleküler yapı ve işlevleri incelemektedir [13].

1.1. Moleküler Dinamik

Moleküler Dinamik (MD) simülasyonlar deneylerin eşdeğeri olarak analitik olarak hesaplanamayan karmaşık sistemlerin dinamik özelliklerini tahmin etmede kullanılarak deney ve teori arasında bir ara yüz oluştururlar [13]. MD simülasyonlar moleküler sistemlerin hareketlerini modellemek için kullanılabilirler. Bu moleküler sistemler proteinler, hücre membranı, DNA, yeterince uzun ve isabetli MD simülasyonları ilaç tasarlayan kişinin laboratuvar deneylerinde gözlenemeyen 3D protein katlanması, protein fonksiyonundan sorumlusu yapısal değişiklikler ve protein-protein veya protein- aday ilaç molekülü arasındaki etkileşimler gibi önemli biyokimyasal olayların gözlenebilmesini sağlar. Bunun gibi simülasyonlar biyoloji ve kimya alanlarındaki cevaplanmamış önemli soruların yanıtlanmasını sağlar. Ayrıca ilaç geliştirme sürecine sürekli katkı sağlar [14,15].

1.1.1. Fikir ve Süreç

Atom ve molekül topluluklarının zamana bağlı gelişimini anlayabilmek için MD yöntemlerden yararlanmak gerekir [4]. MD' nin arkasındaki temel fikir mikroskobik sistemin zamana bağlı davranışını gözlemlemektir [16]. Moleküler dinamik (MD) simülasyonları-protein yapısında bulunan ya da herhangi başka bir sistem içinde yer alan her bir atomun interatomik etkileşimlerini hesaplayarak atomun zaman

içinde nasıl hareket edeceğini öngörür. Bu simülasyonlar, konformasyonel değişim, ligand bağlanması ve protein katlanması da dahil olmak üzere çok çeşitli önemli biyomoleküler prosesleri yakalayabilir ve tüm atomların femtosaniye içindeki geçici çözünlükteki pozisyonlarını ortaya çıkarabilir. Önemli olan bu tür simülasyonların biyomolekülün zaman içinde nasıl tepki vereceğini tahmin edebilmesidir [17].

Sistemin zamana bağlı davranışı Newton'un ikinci kanununun ikinci dereceden diferansiyel eşitliğinin çözülmesiyle elde edilir [16,18]. Newton'un hareket kanunu şunları ifade eder;

- 1- Kütle düz bir çizgide sabit bir hızla üstüne etkiyen kuvvet yoksa hareketine devam eder
- 2- Kuvvet, momentumdaki değişim oranına eşittir
- 3- Her harekete eşit ve zıt yönde bir karşı kuvvet vardır

Newton'un hareket kanunları uygulanarak üç farklı tipte problem çözülebilir. Kolay olan, üzerlerine hiçbir kuvvet etki etmeyen partiküllerin çarpışmasıdır. Bir çarpışmadan bir sonraki çarpışmaya partikülün pozisyonu değişir. İkincisi ve daha karmaşık olan durumda partiküle çarpışmalar arasında sabit bir kuvvet etkir. Bu tip harekete örnek olarak yüklü bir parçacığın değişmeyen bir elektrik alan içinde hareketi verilebilir. Üçüncü durumda ise partikül üzerindeki kuvvet diğer partiküllerin pozisyonuna bağlı olarak değişir. Burada hareketi, parçacıkların hareketinin eşleşmiş doğası nedeniyle analitik olarak tanımlamak imkansız olmasa da, oldukça zordur [17].

MD için önce moleküler sistemin bilgisayarda bir modeli oluşturulur. Daha sonra sistemdeki her bir atom üzerine etkili kuvvetler tahmin edilir. Kuvvetler hesaplandıktan sonra atomların konumları Newton'un hareket kanununa göre değişir [19].

İzole sistemler için, atomlara etki eden kuvvetler, sadece sistemi oluşturan diğer parçacıklarla etkileşimlerinden kaynaklanmaktadır. Klasik MD simülasyonunda, atomik etkileşimlerin altında yatan fiziksel etkiler, uygun şekilde parametreleştirilmiş bir skaler potansiyel enerji fonksiyonu aracılığıyla tanımlanır ve böyle bir gösterimle ortaya çıkan model, kuvvet alanı olarak adlandırılır. Kuvvetler, böyle bir potansiyel enerji fonksiyonunun gradyanı olarak hesaplanabildiği zaman, mekanik sistemin "korunumlu"dur korunumlu olduğu söylenir ve toplam enerji hareketin sabit bir değeridir [18].

MD simülasyonlar birçok açıdan gerçek deneylere benzerler. Gerçek bir deney yaptığımızda çalışmak istediğimiz materyalden örnek alırız, bu örneği ölçüm cihazına bağlarız ve belirli bir zaman aralığında örneğin ilgilendiğimiz özelliğini ölçeriz. MD simülasyonlarda da kesinlikle benzer yol izlenir. Önce örnek hazırlanır. N partikül içeren model sistem seçilir ve Newton'un hareket eşitlikleri bu sistem için, sistemin özellikleri zamanla artık değişmeyene kadar çözülür. Denge anından sonra gerçek ölçüm yapılır [20].

MD simülasyonlara giriş yaparken MD'yi basit bir program olarak kabul ederek başlangıç yapmak en kolay yoldur. Program şu adımlarla ilerler:

- Çalışma koşullarının spesifik parametreleri okunur (başlangıç sıcaklığı, partikül sayısı, zaman basamakları)

• Sistem başlatılır. Simülasyonun başlangıcında sistemdeki tüm partiküllere bir başlangıç pozisyonu ve hız atanır. Partikül pozisyonu simüle etmeyi hedeflediğimiz yapıyla uyumlu olarak seçilmelidir.

- Tüm partiküller üzerindeki kuvvetler hesaplanır. MD'nin en çok zaman alan bölümüdür.
- Newton'un hareket kanunları entegre edilir
- Ölçülen değerlerin ortalaması alınır ve program durdurulur [20].

1.1.2. Protein Esnekliği

Moleküler hareket şüphesiz ki ilaç keşfiyle ilişkili bir konudur. Başlangıçta anahtar-kilit modelinde reseptör (protein) donmuş, hareketsiz ve küçük molekül konformasyon değiştiremeyen yapıda olarak kabul edilmiştir. Oysa molekülde hem konformasyonel değişiklikler vardır hem de reseptör ve ligandın titreşim hareketleri vardır [19]. Dolayısıyla tarihi kilit-anahtar mekanizması protein esnekliğini, reseptör ve ligandın karşılıklı adaptasyonunu hesaba katabilmek için el-eldiven kavramına dönüşmüştür [7] (Şekil 2).

1. Anahtar-kilit modeli



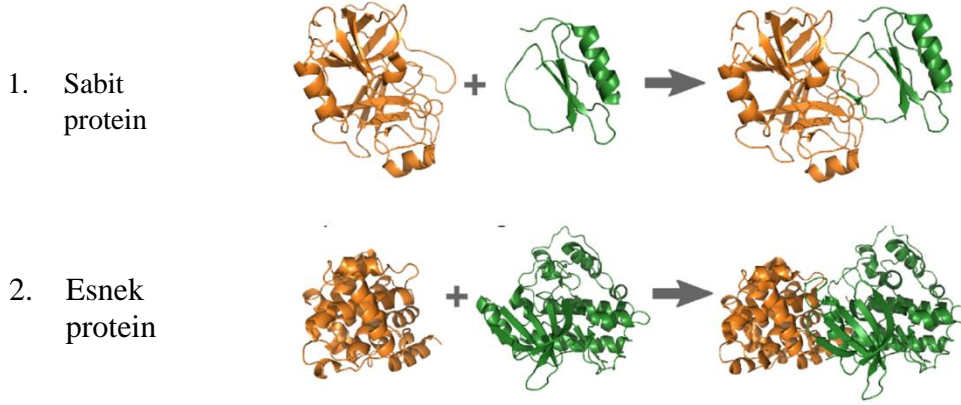
2. El-eldiven modeli



Şekil 2. Reseptör-ligand etkileşim modelleri

Kristallografik yöntemler proteinlerin esnek olmalarının ligand bağlanması için önemli rol oynadığını göstermektedirler [19,21].

Proteinin sadece tek bir konformasyonu bize protein dinamiğiyle ilgili çok az şey söyleyebilir. NMR, X-ray kristallografisi, homoloji modelleme gibi statik yöntemler makromoleküler yapıya dair çok önemli bilgiler sağlamaktadırlar. Ama molekülün tanımlanması ve ilaç bağlanması çok dinamik süreçlerdir. İlaç gibi küçük moleküller (ligand) bir çözelti içinde hedefe yaklaştığında donmuş ve tek bir yapıya bağlanmaz. Onun yerine sabit bir hareket içindeki makromoleküle bağlanır. Bazı nadir durumlarda protein hareketi kısıtlıdır. Ligand anahtarın kilite yerleşmesi gibi statik bir bağlanma cebine yerleşir. Daha tipik olarak ligand dinamik reseptör tarafından örneklenen birçok konformasyonun sadece bir alt kümesine bağlanıp stabilize edebilir. Reseptör hareketi ilacın bağlanmasında esansiyel bir rol oynar [19]. Reseptör ve ligand esnekliği; ilaç bağlanmasını, kinetik ve termodinamik özellikleri doğru olarak tahmin edebilmek için çok önemlidir [16] (Şekil 3).



Şekil 3. Esnek ve sabit proteinin bağlanma sırasındaki farkları

İlaç keşfi için üzerinde çalışılan hedef reseptörler olan biyomoleküllerdeki atomlar da sabit bir hareket içindedirler ve hem moleküler fonksiyonlar hem de intermoleküler etkileşimler molekülün içerdiği dinamiklere bağlıdır. Araştırmacı sadece statik anlık bir görüntü değil (tek bir konformasyon değil) bu biyomolekülleri hareket halinde izleyebilme, onları atom seviyesinde bozabilecek ve nasıl tepki verebileceklerini görebilmeyi ister. Maalesef, tek tek atomların hareketlerini izlemek ve onları istenen şekilde bozmak zordur. Cazip bir alternatif olarak, ilgili biyomoleküllerin atom düzeyinde bir bilgisayar simülasyonu ile çalışmaktır [17].

1.1.3. Tarihçe

Bilgisayar metodlarının ilaç keşfine bu kadar entegre hale gelmesi son 25 yıl içinde olmuştur. İki boyutlu QSAR çalışmalarının ötesine geçip bilgisayarlı kimyasal yapı gösterimi ve bilgisayarlı bileşik, reaksiyon, özellik ve yapı-aktivite veri tabanları ile genişlemiştir [22]. Artık kimyasal çizim için, iki ve üç boyutlu yapıların aydınlatılması için, moleküler görüntüleme için, konformasyonel araştırma için, moleküler dinamik ve biyomoleküler yapının geliştirilmesi için yüksek çözünürlük özelliklere sahip yeni programlar geliştirilmektedir [8].

Moleküler Dinamik simülasyonlar yeni değildirler [8]. Method 1950'lerin sonlarında teorik fiziğin bünyesinde tasarlanmıştır. Ama şu anda kimyasal fizikte, doğa bilimlerinde, biyomoleküllerin modellenmesinde ve son dönemde de ilaç keşfinde kullanılmaktadır [16]. İlk MD simülasyon basit gazların simülasyonu olarak 1917'de de Alder ve Wainrigt tarafından yapılmıştır [5,17,23].

Maddenin 3 fazından modellenmesi en kolay olan gaz fazıdır. Çünkü atomlar birbirinden çok uzaktadırlar ve bu nedenle intermoleküler etkileşimler göz ardı edilebilir. Kristalimsi bir katı içindeki atomlar veya moleküller ise düzenli bir halde bulunurlar. Bu tarz modeller yirminci yüzyılın başında gerçekten anlaşıldıktan sonra, katı hal teorisi hızlı bir ilerleme kaydetti. Diğer taraftan, sıvıların modellenmesi gazlardan ve katılardan daha zordur. Çünkü sıvılar ne düzenli ne de düzensizdirler [4].

Proteinlerin ilk MD simülasyonu ise 1970'lerin sonlarında McCammon tarafından yapılmıştır. Bu simülasyonların temel çalışmalarından biri, Lewitt, Lifson ve Warshel'e 2013'te Nobel Kimya Ödülü'nü kazandırdı [17].

1.1.4. Sert Küreler Modeli

B.J. Alder ve T.E. Wainwright sert kürelerin iki boyutlu eşdeğeri olarak sert diskler üzerinde bir çalışmayla "Moleküler Dinamik" olarak bilinen yöntemi dünyaya 1957 yılında tanıttılar [4,23].

Bu modelde küreler çarpışmalar arasında sabit bir hızla düz çizgide hareket ederler. Tüm çarpışmalar mükemmel elastikliktedir ve ayrılma gerçekleştiğinde kürelerin merkezleri arası mesafe küre çapına eşittir.

Sert küre hesaplamalarında adımlar;

- Sırada çarpışacak olan küreler tanımlanır ve çarpışmanın ne zaman olacağı hesaplanır
- Çarpışma anında kürelerinin pozisyonlarının hesaplanır
- Çarpışma sonrası çarpışan 2 kürenin hızlarının belirlenir
- İlk küreden sonuncuya kadar işlemin tekrarlanır

Sert Küre Modeli gibi basit etkileşim modellerinin açıkça görülebilen birçok eksikliği mevcuttur. Ama buna rağmen akışkanların mikroskopik doğasına bakış için kullanılışlıdır [5].

Sert Küreler Modeli bilinen herhangi bir maddenin moleküller arası potansiyelini temsil ettiği için değil, potansiyele dayanan hesapların basit olması nedeniyle teorik olarak büyük ilgi çekmektedir. İdeal bir gazda intermoleküler etkileşimler olmadığı için potansiyel sıfır kabul edilir. İdeallikten sapmalar, parçacıklar arası potansiyelden kaynaklanmaktadır. Sistem arasında yarıçap kadar mesafe olan kürelerinden oluşur ve iki kürenin temas ettiği zamanlar hariç potansiyel sıfırdır, dokunduklarında ise sonsuza eşittir [4].

Daha gerçekçi intermoleküler etkileşim modellerinde her partikül üzerindeki kuvvet partikülün konumu değiştiğinde değişecektir ya da partikül etkileştiği başka herhangi bir partikül konumu değiştirecektir. Devamlı potansiyel kullanılan ilk simülasyon Rahman'ın argon çalışmasıdır. Bu ayrıca sıvıların ilk moleküler simülasyonudur [5,4].

1.1.5. Yöntemin Kısıtlamaları

Biyolojik süreçlerin çoğu milisaniye zaman düzeyinde gerçekleşir ve bu süreçlerin simülasyonları 10 binlerce atom içerir. Bu da atomların hepsinin diğer atomlara uyguladığı kuvvetin sadece birkaç mikrosaniye içinde hesaplanması gerektiği anlamına gelir. Bu gereklilik günümüzdeki genel amaçlı bilimsel süper bilgisayarların bile kapasitesinin çok üstündedir [24,14].

1.1.5.1. Kuantum Etkiler:

Sıfır noktası enerjisi:

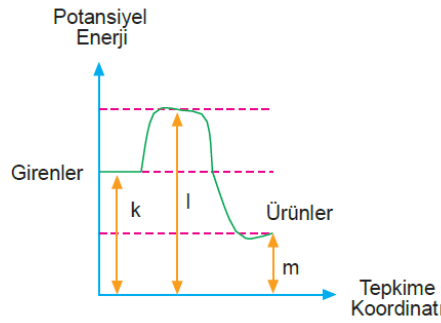
Reaksiyona girenler, ürünler ve reaksiyon sırasındaki çekirdeklerin titreşimleriyle ilişkili enerjidir. Çekirdek hareketinin üzerindeki potansiyeli tanımlamak için elektronik potansiyel yüzeye dahil edilebilecek statik etkiyi temsil ettiği kabul edilir. Reaksiyona girenler ve ürünler arasında bir enerji bariyeri vardır. Sıfır noktası enerjisi reaksiyonda klasik enerji bariyerinde farklı bir enerji eşğine sebep olur. Bu durum klasik ve kuantum sabitler arasındaki ana farklılığın başında gelir [26].

Kuantum tünelleme:

Tek bir tanımı yoktur ama tünelleme genellikle reaksiyon bariyer enerjisinden daha düşük enerji seviyesinde reaksiyonun yürümesiyle ilişkilidir [26].

Rezonans:

Kimyasal reaksiyonlar konusunda rezonansın anlamı yarı kararlı bir fazın oluşmasıdır. Bu durumda girenlerden ürünlere geçilmesi daha uzun zaman alır. Rezonans kuantum mekanik karakterdedir çünkü kesikli/kuantlı enerjilerde meydana gelir [26] (Şekil 4).



Şekil 4. Tekime potansiyel enerji-tepkime koordinatı grafiği

Moleküler dinamikte elektronik hareket dikkate alınmaz ve kuantum etkiler göz ardı edilir. Klasik yaklaşım, çok çeşitli sistemler ve malzemeler için mükemmeldir, ancak bağ oluşumu ve yarıma, polarizasyon ve metal iyonlarının kimyasal bağlanması gibi elektronik yeniden düzenlemeleri içeren reaksiyonlar için uygun değildir [13].

Simülasyonlar birçok önemli moleküler hareketi doğru bir şekilde tahmin edebilmekle birlikte, örneğin geçiş metali atomlarının bağlanmaya dahil olduğu durumlarda, kuantum etkilerinin önemli olduğu sistemler için yetersizdir. Bu zorluğun üstesinden gelmek için, bazı araştırmacılar klasik moleküler-dinamik kuvvet alanlarına kuantum mekanik hesaplamalar getirmişlerdir; enzimatik aktif alanların veya diğer sınırlı ilgi alanlarının hareketleri ve reaksiyonları, kuantum mekaniğinin yasalarına göre simüle edilir ve daha büyük sistemin hareketleri moleküler dinamik kullanılarak tahmin edilir. Tüm sistemi tanımlamak için kuantum mekaniğin kullanılmasının “ideal” den uzak olmasına rağmen, bu

hibrit teknik yine de bir dizi sistemi incelemek için başarıyla kullanılmıştır. Bağlanma ve bağ oluşumunun yanı sıra, elektronların bir atom çekirdeğinden diğerine kimyasal olarak bağlanmış atom grupları arasında akışının neden olduğu elektronik polarizasyon, birkaç istisna dışında, genellikle göz ardı edilen bir başka kuantum-mekanik etkidir. Klasik moleküler dinamik simülasyonlarında, simülasyona başlamadan önce her bir atomun sabit bir kısmı yükü tahsis edilir. Ancak gerçekte, atomları çevreleyen elektron bulutları ortama göre sürekli değişir, atomların kısmi yükleri dinamiktir [19].

1.1.5.2. Hız:

Kullanılan kuvvet alanları ileri derecede ayrıntılandırılmayı gerektirir ve yüksek hesaplama talepleri, uzunluğu mikro saniyeden daha fazla olan rutin simülasyonları engeller ve birçok durumda konformasyonel durumların yetersiz örneklenmesine yol açar [19].

1.1.5.3. Zaman:

Moleküler Dinamik çalışmaları da tipik olarak simüle edilen kısa zaman ölçekleriyle sınırlıdır. Termodinamik özellikleri yeniden üretmek ve / veya ilaç tasarımına ilişkin tüm bağlayıcı cep konfigürasyonlarını tam olarak aydınlatmak için, proteinin olası tüm konformasyonel durumları simülasyon tarafından araştırılmalıdır. Ne yazık ki, ilaç bağlanmasına ilişkin reseptör konformasyonel kaymaları dahil olmak üzere birçok biyokimyasal işlem, simülasyon için uygun olanlardan çok daha uzun olan zaman ölçeklerinde meydana gelir. Bazı önemli istisnalar dışında, simülasyonlar şu anda saniyenin milyonda biri ile sınırlıdır [19].

Elektrostatik etkileşimlerin iyileştirilmesi için çoklu zaman aşamalı entegrasyon algoritmaları veya doğrusal ölçeklendirme yöntemleri kullanılarak hızı artırılan hesaplamalarda bile, hesaplamalar hala oldukça pahalıdır ve 1 ns ila 1 mikro saniye zaman ölçeğiyle sınırlıdır [26].

Moleküler dinamik simülasyonları, biyolojik makromoleküllerin incelenmesi için çok yönlü ve yaygın olarak kullanılan tekniklerinden biridir. Hızlı titreşimlerden yavaş konformasyonel değişikliklere ve protein katlanma süreçlerine kadar farklı zaman aralıklarındaki dinamik davranışları anlamak için çok değerlidirler.

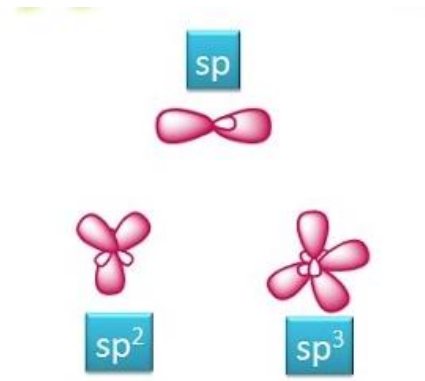
Olası aktif bağlanma bölgeleri için hedef yapıları analiz etmek, aday moleküller oluşturmak, ilaç benzerliklerini kontrol etmek, bu molekülleri hedefe yerleştirmek, bağlanma afinitelerine göre sıralamak, bağlanma özelliklerini geliştirmek için ve molekülleri optimize etmek için de kullanılabilirler. Moleküllerin bağlanma mekanizmalarını belirlemek için kullanıldıklarından MD simülasyonları ile ligandların proteinlere / bağlanma mekanizması bilinmeyen ilaçların ilaç hedeflerine bağlanma mekanizmalarının aydınlatılmasını sağlamaktadır. MD ile protein bağlanma bölgesinin esnekliği tespit edilebilir. MD simülasyon tabanlı yöntemler, bir ligandın bir proteine mutlak bağlanma serbest enerjisini belirleyebilir. Bunun yanında X-ışını kristallografisi veya NMR yöntemleri ile belirlenen yapıların çoğu (ilaç hedefi proteinler de dahil) MD yöntemleri kullanılarak rafine edilmiştir. Ayrıca, yoğunluk, iletkenlik ve dipolar moment gibi biyomoleküler sistemin özelliklerini ve etkileşim

enerjileri, entropiler dahil farklı termodinamik parametreler elde etmede, çözücü moleküllerinin protein yapısı ve stabilitesi üzerindeki etkisini incelemeye de kullanılır [27-31].

1.2. Moleküler Mekanik

Moleküler Mekanik (MM) terimi 1970lere ortaya çıkmıştır. Klasik mekaniğin moleküler denge yapılarını belirlemede kullanılmasıdır. Yöntem daha önce kuvvet alanı (force field) yöntemi adı da verilmiştir [4].

1930'lu yıllarda Moleküler Mekanik'in ortaya çıkışını sağlayan molekülleri yaylara bağlı toplar olarak ele alma fikri ortaya çıkmıştır [4]. Toplar çekirdeği ve yaylar da bağları temsil eder [6]. Moleküler Mekanik'in gelişmesini sağlayan temel çalışma diyagonal olmayan birkaç terimden oluşan alanlar için transfer edilebilir kuvvet sabitleri elde edilmesidir. Komşu atomlar arasında diyagonal olmayan terimler genelde en büyüktür. Bu nedenle sadece en yakın komşu atomlar arasında bağ dışı etkileşimler de dikkate alınmalıdır. Yani hesaplamada atomun kimyasal çevresi de dikkate alınmalıdır. Bir sp karbon atomu, bir sp² karbon atomundan farklıdır [4] (Şekil 5).



Şekil 5. Karbon atomu hibritleşmeleri

Kuantum mekanik yöntemler sistemdeki elektronlarla ilgilenir. Bu nedenle bazı elektronlar göz ardı edilse bile hala çok fazla sayıda hesaba alınması gereken parçacık vardır ve bu işlem çok fazla zaman gerektirir. Moleküler Mekanik ise Born-Oppenheimer yaklaşımına (çekirdek elektronlara göre çok daha ağır olduğundan çekirdek hareketi elektron hareketine göre ihmal edilebilir derecede küçüktür) dayanır ve elektronik hareketleri dikkate almadan sadece sistemin enerjisini hesaplar [5,32]. Bu sayede çok fazla sayıda elektron içeren büyük sistemlerin hesaplanmalarının yapılmasını sağlar [6,5].

Bu metod aşağıdaki temellere dayanır:

- 1- Elektronlar ve çekirdek bir yumak halinde hareket eder ve birleşik halde atom benzeri partiküller olarak muamele edilir.
- 2- Atom benzeri parçacıklar küresel toplar olarak muamele edilir.
- 3- Partiküller arası bağlar yaylar olarak gösterilir.

- 4- Partiküller arası etkileşimler klasik mekanik yöntemlerdeki potansiyel fonksiyonlar ile tanımlanır
- 5- Farklı potansiyel etkileşimleri tanımlamak için bireysel potansiyel fonksiyonları kullanılır.
- 6- Potansiyel enerji fonksiyonları, atom setleri arasındaki etkileşimleri tanımlayan ampirik olarak türetilmiş parametrelere dayanır.
- 7- Potansiyel fonksiyonlar ve etkileşimleri değerlendirmek için kullanılan parametreler bir kuvvet alanı olarak adlandırılır.
- 8- Etkileşimlerin toplamı, atom benzeri parçacıkların konformasyonunu belirler [6].

1.2.1. Kuvvet Alanı

Rasyonel ilaç tasarımı için Moleküler Mekanik kuvvet alanları protein-ligand yapısının araştırılmasının altında yatan temel ögedir. İlaç tasarımında başarılı bir kuvvet alanı hem biyolojik moleküller hem de onlarla etkileşen organik moleküller için işe yaramalıdır [3].

Bir kuvvet alanı, molekülün potansiyel enerjisini bulmak için kullanılan bir dizi fonksiyon ve sabiti ifade eder [6]. Kuvvet alanları potansiyel enerjiyi yalnızca nükleer koordinatların bir fonksiyonu olarak ifade ederek Schrödinger denklemini çözme sorununu ortadan kaldırır [33].

Kuvvet alanı oluşturulurken kullanılan parametreler aşağıdaki gibi sıralanabilir;

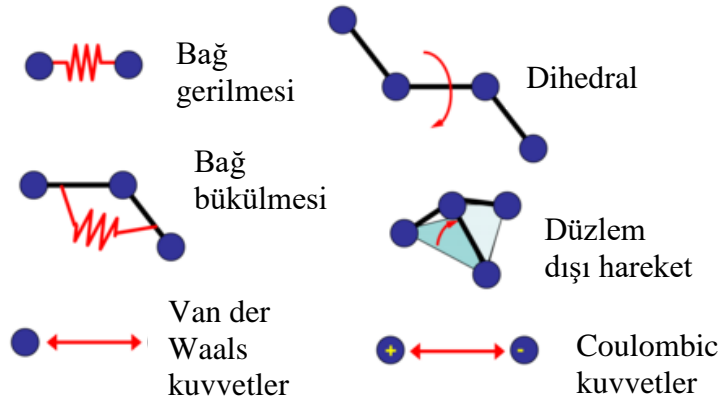
- 1- Bağ dışı parametreler
- 2- Elektrostatik parametreler
- 3- Bağ uzunluğu parametresi
- 4- Bağ açısı parametresi
- 5- Torsiyonel parametreler [34,35].

Bir kuvvet alanına katılan kuvvetleri bağ kuvvetleri ve bağ dışı kuvvetler olarak gruplandırmak uygun olur. Bu ayrım ancak reaktif olmayan bir kuvvet alanı tanımını dikkate alındığı sürece uygulanır [33].

Kimyasal bağların varlığı sayesinde moleküllerin yapısı rasyonelize edilebilir ve tahmin edilebilir [35]. Bağ kuvvetleri gerilme ve eğilme kuvvetleridir. Buna ek olarak atom bağlarının dihedralleri üzerindeki torsiyon kuvvetleri de bulunmaktadır.

Bağ dışı kuvvetler ise elektrostatik kuvvetleri ve Van der Waals kuvvetlerini kapsar.

Bağ dışı kuvvetler bağ kuvvetlerinden farklı olarak kuvvet alanı modelinde sistemin atomları arasındaki toplam kuvvet olarak işlenir (Şekil 6).



Şekil 6. Bağ kuvvetleri ve bağ dışı kuvvetler

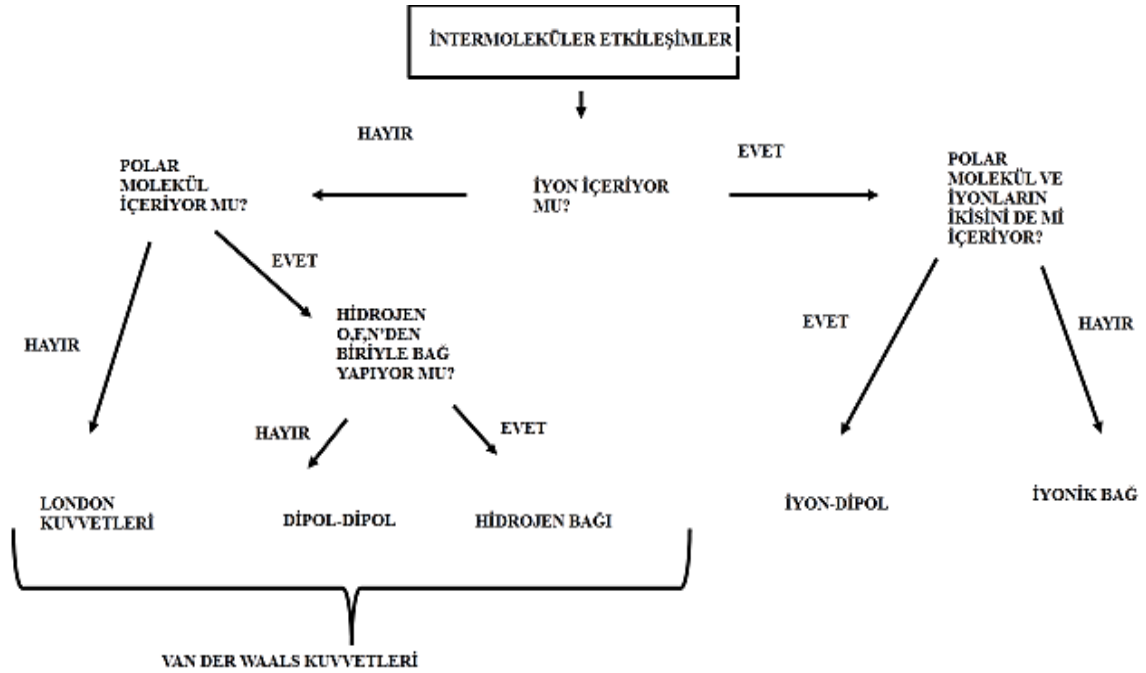
Genel olarak, kimya kovalent bağ anlamına gelir. Molekül, çözelti veya kütle gibi başka moleküller ile çevrildikten sonra, bu çevre kovalent bağ etkiler ve molekülün elektronik sistemi bozulur. Kovalent bağ kavramı, modern bilimdeki en başarılı kavramlardandır. Bağ dışı etkileşimler için ise hala kesin bir isim bulunmamakla birlikte bu bağlara kovalent olmayan bağlar adı verilebilir. Her ne kadar kovalent olmasa da, bu spesifik olmayan isim, gerçek yapının yeterli bir tanımı değildir. Bu etkileşimlere bazen zayıf etkileşimler olduklarından “zayıf bağlar” adı veya molekülleri katı veya sıvı ve hatta gaz fazda bir arada tutan tek etkileşimler olduklarından “intermoleküler (moleküller arası) kuvvetler” adı verilmektedir [37,4].

1.2.1.1. Moleküller Arası Etkileşimler

Bağ terimleri iyi tanımlanmış olsa da bağ dışı terimleri tanımlamak problemlidir. Moleküler Mekanikte yürütülen araştırmaların çoğunluğu bağ dışı terimlerin temsil edilebilmesi için kullanılan modelleri geliştirmek için harcanır [33].

Her ne kadar sorunlar olsa da moleküllerin van der Waals yapı ve özelliklerinin anlaşılmasında çok yol kaydedilmiştir. Moleküller arası kuvvetlerin temelinde yatan teori iyi bir şekilde geliştirilmiştir [38].

Moleküller birbirinden uzak olduğunda ve uzaklık, moleküllerin boyutlarına kıyasla büyük olduğunda, etkileşim kuvveti *elektrostatik enerjiye* yol açan serbest moleküllerin kalıcı elektrik momentleri ile belirlenir. Ayrıca her bir molekülün elektrik momentini diğerinin yapısını bozar ve polarizasyona bağlı olarak *indüksiyon enerjisine* sebep olur. Moleküllerin uzun mesafedeki yük dağılımlarının dalgalanmasından kaynaklı elektrik momentleri *London Dispersiyon kuvvetlerine* sebep olur [39] (Şekil 7).



Şekil 7. İntermoleküler etkileşimler

Bağ dışı etkileşimlerin tanımlanmasındaki temel problem etkileşimlerin “çok kütleli” doğasıdır. (many body problem) En basit kuvvet alan modelini benimseyen, bağ dışı etkileşimler, sistemin elektrostatik (kısmi yükler) ve van der Waals parametrelerinin her bir parçasına atanarak işlem görür [33].

İkili katkı ilavesi yaklaşımı (pairwise additive approximation), polarizasyon ve pekiştirmenin (many body effect sonucu) büyük rol oynadığı etkileşimleri kantitatif olarak hesaba katmanın imkansızlığı ile sonuçlanır. Bu nedenle, additif kuvvet alanları aynı zamanda polarize olmayan kuvvet alanlarıdır. Bununla birlikte, çoklu kütleler etkisinin bir kısmı, sözde etkili çift potansiyellerine yol açan bağ dışı etkilerin uygun bir şekilde parametrelendirilmesiyle kuvvet alanlarına ortalama bir şekilde dahil edilebilir [33].

Moleküller arasındaki (veya aynı molekülün farklı kısımları arasındaki) elektrostatik etkileşimler, çekirdeklerin etrafındaki eşit olmayan elektronik dağılımın bir sonucu olarak ortaya çıkar ve kuvvet alanı modellerinin büyük çoğunluğunda, her bir etkileşim bölgesine nokta yükleri atayarak hesaplanırlar. Elektrostatik etkileşim, Coulomb potansiyeli ile değerlendirilir [40,41].

Van der Waals terimi ise, sırasıyla dispersiyon ve değişim etkileşimlerini temsil eden çekici ve itici bir terimden oluşur. Dağılma kuvvetleri (london kuvvetleri olarak da bilinir) elektronik bulut içinde aralarında bağ olmayan yaklaşan atomlar arasındaki dalgalanmalardan kaynaklanan karşılıklı olarak indüklenen multipollerin anlık kolerasyonlarından kaynaklanmaktadır [33].

Basit kuvvet alanları bağ dışı terimleri çoğunlukla; elektrostatik kuvvetleri Coloumb potansiyeliyle ve Van der Waals etkileşimlerini de Lennard-Jones potansiyeliyle modeller [5].

1.2.1.2. Kuvvet Alanlarının Hesaplanması ve Özellikleri

Kuvvet alanı genelde şu denklemlerle ifade edilir: $E_{\text{toplam}} = E_{\text{Bağ gerilmesi}} + E_{\text{Bağın açılı eğilmesi(bükülme)}} + E_{\text{Bağın torsiyonu}} + E_{\text{Bağ dışı etkileşimler}} + E_{\text{Hidrojen bağı}}$. [6]

İki atomlu potansiyel enerji hesaplanması gerilme, bükülme, rotasyon, coloumb ve Lennard-jones tipinde etkileşimleri kapsar. Bilgisayar kolaylığı için sadece atom çiftleri arasındaki etkileşimler alınır. Polarizasyon gibi çok atomlu etkileşimler ihmal edilir. Ayrıca sistemin yük dağılımı da sabit kabul edilir [40].

Kuvvet alanı yalnızca enerjinin fonksiyonel formu ve parametrelerin seçilmesinden sonra tek bir kez tanımlanır. Farklı kuvvet alanları aynı fonksiyonel formu paylaşırsa da kullanılan parametreler farklı olabilir ve farklı sonuçlar beklenir.

Kuvvet alanları için ortak olan özellik farklı moleküler çevrelerde bulunan aynı kimyasal grupların aynı parametrelerle işlenmesi imkanı sağlayan "taşınabilirlik" kavramıdır [33].

Kuvvet alanlarının parametre ve fonksiyonel formlarının taşınabilir olması önemli özelliklerindedir. Taşınabilir olması demek aynı parametreler birbiriyle ilişkili başka molekülleri modellemede her molekül için yeni parametreler tanımlamak yerine kullanılabilir demektir [5].

Moleküler mekanik kuvvet alanlarında "benzer" kimyasal ortamlar atom tipleri olarak kodlanır ve bu tanımlar başarı ve taşınabilirlik için çok önemlidir. Daha fazla atom türü kullanarak, ince kimyasal ortamlar daha doğru bir şekilde tanımlanabilir, ancak bu aynı zamanda daha büyük bir parametre belirleme yüküne yol açar. Bu nedenle, atom tipleri mümkün olduğu kadar ekonomik kullanılmalı ve sadece kuvvet alanı performansını önemli ölçüde artırmak için yeni atom tipleri kullanılmalıdır [3].

Bir diğer önemli özellik de kuvvet alanlarının ampirik olmasıdır. Kuvvet alanları için doğru bir form yoktur. Eğer bir fonksiyonel form diğerlerinden daha iyi performans gösteriyorsa bu form tercih edilir. Kuvvet alanları çoğunlukla isabetli olmak ve kompütüsyonel etkililik arasında uzlaşırlar. Yani en isabetli fonksiyonel form kompütüsyonel etkililik açısından tatmin edici olmayabilir. Bilgisayarın performansı arttıkça daha karmaşık modelleri oluşturmak mümkün olabilir [5].

Kuvvet alanları moleküler modellemede birincil olarak yapısal özellikleri yeniden üretmek amacıyla kullanılırlar ama ayrıca moleküler spektra gibi diğer özelliklerin tahmin edilmesinde de kullanılırlar. Ek olarak enerji minimizasyonu ve moleküler dinamik gibi yöntemler kullanmak için kullanılır [5].

Atom tip kuvvet alanı konseptinde önemlidir. Kuvvet alanı için tüm yük ve spin ayrılmaları gerekli değildir (kuantum mekanik hesaplamalarda gerekli). Ama her atom için atom tipi gereklidir. Atom tipi atomun sadece atom numarasından daha fazlasıdır. Genelde atomun hibridasyonu ve bölgesel çevresiyle ilgili bilgiler içerir [5].

Kuvvet alanları potansiyel enerjiyi yalnızca nükleer koordinatların bir fonksiyonu olarak ifade ederek Schrödinger denklemini çözme sorununu atlar. Bu tür bir yaklaşımın kovalent bağların oluşumunu veya kopmasını ya da elektronik yapı veya yeniden düzenlenmesi bilgisinin açıkça gerekli olduğu herhangi bir mekanizmayı tanımlaması zordur [33].

Bu tür modellerin 'yeni' durumlara nasıl aktarılabilirliği veya bu modellerin karmaşık biyomoleküller için önemli olan uzun vadeli etkileşimleri nasıl hesaba katabildiği de dahil olmak üzere birçok açık soru vardır.

Günümüzde güç alanları, görece basit sistemlerde bağlanmanın serbest enerjisini ve entalpisini yeterli doğrulukla hesaplayamamaktadır ve bu tür hesaplamaların daha zor olduğu biyomoleküler bağlanma etkileşimleri için de geçerlidir [42].

Kuvvet alanı geliştirmek, zorlu, emek yoğun bir çabadır; pratik sorunların çözümünde yararlı bir model üretmek için uzun bir süre boyunca birlikte çalışan büyük gruplara ihtiyaç vardır. Bu tür kolektif çabaların bir sonucu olarak bir dizi güç alanı ortaya çıkmıştır. Biyomoleküler simülasyon alanında, bu kuvvet alanları OPLS, AMBER, CHARMM ve Gromos potansiyel enerji fonksiyonlarının çeşitli varyasyonlarını içerir. Bu güç alanlarının tümü belirli temel özellikleri paylaşır: sabit bir yüke (açıkça polarize olanların aksine) elektrostatik modele dayanırlar, elektronik itiş ve dağılmayan etkileşimleri modellemek için standart (Lennard-Jones 6–12) van der Waals potansiyeli kullanırlar. ve enerjinin değerlik bileşenini modellemek için harmonik germe ve bükülme terimlerini ve dihedral açığa dayanan burulma potansiyellerini kullanırlar [9,43] (Şekil 8).

$$\begin{aligned}
 E_{\text{ele}}(r) = & \sum_{\text{bonds}} k_b (r - r_{0,b})^2 + \sum_{\text{UB}} k_{\text{UB}} (S - S_{0,\text{UB}})^2 + \sum_{\text{angle}} k_a (\theta - \theta_{0,a})^2 \\
 & + \sum_{\text{dihedrals}} k_{d,n} (1 + \cos(n\chi - \delta_{d,n})) + \sum_{\text{impropers}} k_i (\psi - \psi_{0,i})^2 \\
 & + \sum_{\text{vdw}} \epsilon_{ij} \left[\left(\frac{R_{\text{min},ij}}{r_{ij}} \right)^{12} - 2 \left(\frac{R_{\text{min},ij}}{r_{ij}} \right)^6 \right] + \sum_{\text{electrostatic}} \frac{q_i q_j}{4\pi\epsilon_0 r_{ij}}
 \end{aligned}$$

Şekil 8. CHARMM kuvvet alanı parametrizasyonu

Moleküler mekanik liganda dayalı bilgisayar destekli ilaç tasarım yöntemleri arasında en çok kullanılan metotlardan biridir. Atomlar arasındaki olası tüm ikili etkileşimlerin enerjilerini hesaplar ve moleküler potansiyel enerji yüzeyini tanımlar. Moleküllerin bağlanma enerjilerinin hesaplanmasında ve minimizasyon işlemlerinde kullanılır. MM, hesaplama açısından, uygun kuvvet alanı parametrelerinin türetilmesinde yeterli özen gösterilmesi şartıyla, karmaşık moleküllerin bile yapılarını keşfetmek için güvenilir bir yöntemdir [44-46].

SONUÇ VE TARTIŞMA

Deneyle; bilimde-özellikle ilaç keşfi alanında- temel görevi üstlenir. Zengin deneysel sonuçlar hayatın kimyasını anlamada temel oluştururlar. Ama yine de deneyle sadece modeller ve teoriler ile birlikte bir anlam ifade eder.

Kimyasal sistemlerin dinamik ve karmaşık yapısına bağlı olarak biyolojik sistemler de kompleks yapılardır. Biyolojik sistemlerin bu karmaşık yapıları nedeniyle bilgisayar metotları sağlık ve fen bilimlerinde önemli hale gelmiştir. Böyle karmaşık yapıların çözümlenmesinde ancak bilgisayarlar gibi hafıza ve grafiksel özellikleri gelişmiş araçları kullanarak biraz da olsa anlamak mümkün olmaktadır. Bilgisayar simülasyonları süreçler(teori) teori ile laboratuvar dünyası(deney) arasında bir köprü görevi görür.

Üstlendikleri bu görev birtakım avantajlar oluşturur. Simülasyonların en büyük avantajı “karmaşıklık” ufkunu tanımlamada genişlik sağlamalarıdır. Bunu sisteme girilen veriler ve sonuç verileri arasındaki sebep ve sonuç ilişkisini gözlemlenebilir ve karşılaştırılabilir hale getirerek sağlarlar. Ayrıca fiziksel özelliklerin birçok çeşidi ölçülebilir. Örneğin simüle edilen bir sistemdeki bütün parçacıkların hızları ve pozisyonları hakkındaki bütün bilgiyi elde edebiliriz. Bazı özel şartları (çok yüksek ve çok düşük sıcaklık, çok yüksek basınç, çok hızlı soğuma) laboratuvarında üretmek pahalı ve zordur. Bu şartları simülasyon ile daha kolay gerçekleştirebiliriz. Gerçek sistemin bozulmadan, tehlikeye atılmadan denenmesini sağlar.

Bilgisayar teknikleri kullanılarak organizma için en önemli makro moleküllerden olan proteinin üç boyutlu yapısı aydınlatılmıştır. Önemli makro moleküllerin yapılarının aydınlatılması ilaç hedefleri hakkında hayati bilgiler edinilmesine olanak sağlamaktadır.

Farmasötik alanda yeni bir protein veya ilaç geliştirmek için bilgisayar tekniklerinin kullanıldığı *in silico* ilaç tasarımı çok önemli bir rol oynayan çok sayıda yazılım vardır. Bilgisayarlar da kullanılan *in silico* ilaç tasarım yazılımları genlerin moleküler modellemesini, protein dizisi analizini ve proteinlerin 3D yapısını incelemek için kullanılmakta olup hedef belirleme ve yeni ilaçların tasarımı da büyük önem taşımaktadırlar.

Bu derlemede bilgisayar destekli yöntemlerden Moleküler Dinamik ve Moleküler Mekanik yöntemlerinin temelleri, ilaç keşfinde kullanımı ve kısıtlamaları araştırılmıştır

Moleküler Dinamik (MD), belli bir zaman dilimi içinde moleküllerin hareketlerini simüle eder. Tek bir molekülün veya bir sistemin zamana bağlı davranışlarını incelemeye olanak verir. Bu özelliği sayesinde MD medisinale kimyada reseptör bağlanma bölgelerinin bulunmasını, ilaç ve reseptör bağlanma mekanizmalarının aydınlatılmasını, protein esnekliğini göz önünde bulundurması sebebiyle hedef yapıya uygun yeni moleküllerin daha isabetli şekilde tasarlanabilmesini sağlar.

Moleküler Mekanik (MM) molekül içindeki etkileşimleri ve moleküller arası etkileşimleri bazı ampirik potansiyellerle simüle eden bir yaklaşımdır. Moleküllerin konformasyonlarını, moleküler yapılarını basit bir matematiksel ifadeyle tanımlar. Tüm sistemin potansiyel enerjisi ve lokal minimumlar hesaplanabilir. Bu sayede enerji minimizasyonu işlemi için kullanılır.

MM' de, MD' den farklı olarak sistem dinamikleri dikkate alınmaz. Yöntemler birbirinden farklı olsa da birbirleriyle ilişkilidirler ve birlikte kullanılabilirler. MM moleküller arası atomik etkileşimlerin yanı sıra eğer reseptör-ligand gibi farklı moleküller arasındaki etkileşimleri de incelemek istendiğinde MD alanında uygulanabilir.

MD ve MM yöntemler karmaşık biyolojik yapıların analizinde ve öngörülmesinde tüm dezavantajlarına rağmen güçlü birer araç haline gelmiştir. İlaç keşfi gittikçe maliyetli hale geldikçe ve keşfedilebilen molekül sayısı azaldıkça, bu yöntemlerin sürece fayda sağlayabileceği ve benzer sonuçları daha az çabayla elde etmek için kullanılabilirliği açıktır.

KAYNAKLAR

1. Cohen, N.C. (1996). Guidebook on Molecular Modeling in Drug Design, Elsevier, Basel, p1-6.
2. Mandal, S., Mandal, S.K. (2009). Rational drug design. *European journal of pharmacology*, 625(1-3), 90-100.
3. Şener, E.A., Yalçın, İ. (2003). Farmasötik/Medisinal Kimya'da ilaç etken madde tasarım yöntemleri-1: kantitatif yapı-etki ilişkileri analizleri (QSAR), p 2-6, p13-17.
4. Hinchliffe, A. (2003). Molecular Modelling for Beginners, Wiley, Manchester, p2-4, p51-72, p123-130.
5. Leach, A.R. (200). Molecular Modelling Principles and Applications, Pearson Educated Limited, Harlow, p9, p165-173, p353-355.
6. Ramachandran, K.I., Deepa, G., Namboori, K. (2008). Computational Chemistry and Molecular Modeling, Springer, Coimbatore, p1-3, p7, p205-207.
7. Śledź, P., Caflisch, A. (2018). Protein structure-based drug design: from docking to molecular dynamics. *Current opinion in structural biology*, 48, 93-102.
8. Jorgensen, W.L. (2004). The many roles of computation in drug discovery. *Science*, 303(5665), 1813-1818.
9. Sliwoski, G., Kothiwale, S., Meiler, J., Lowe, E.W. (2014). Computational methods in drug discovery. *Pharmacological reviews*, 66(1), 334-395.
10. Hassan Baig, M., Ahmad, K., Roy, S., Mohammad Ashraf, J., Adil, M., Haris Siddiqui, M., Choi, I. (2016). Computer aided drug design: success and limitations. *Current pharmaceutical design*, 22(5), 572-581.

11. Jyothirmayee, C.A. (2014). Computer-aided drug design. *Life Sciences International Research Journal*, 1(1).
12. Van Drie, J.H. (2007). Computer-aided drug design: the next 20 years. *Journal of computer-aided molecular design*, 21(10-11), 591-601.
13. Schlick, T. (2010). *Molecular Modeling and Simulation*, Springer, New York, p3, p426-432.
14. Shaw, D.E., Deneroff, M.M., Dror, R.O., Kuskin, J.S., Larson, R.H., Salmon, J.K., Eastwood, M.P. (2008). Anton, a special-purpose machine for molecular dynamics simulation. *Communications of the ACM*, 51(7), 91-97.
15. Binder, K., Horbach, J., Kob, W., Paul, W., Varnik, F. (2004). Molecular dynamics simulations. *Journal of Physics: Condensed Matter*, 16(5), 429.
16. De Vivo, M., Masetti, M., Bottegoni, G., Cavalli, A. (2016). Role of molecular dynamics and related methods in drug discovery. *Journal of medicinal chemistry*, 59(9), 4035-4061.
17. Hollingsworth, S.A., Dror, R. O. (2018). Molecular dynamics simulation for all. *Neuron*, 99(6), 1129-1143.
18. Masetti, M., Rocchia, W. (2014). Molecular mechanics and dynamics: numerical tools to sample the configuration space. *Frontiers in Bioscience*, 19(1), 578-604.
19. Durrant, J.D., McCammon, J. A. (2011). Molecular dynamics simulations and drug discovery. *BMC biology*, 9(1), 71.
20. Frenkel, D., Smit, B. (2002). *Understanding Molecular Simulations*, Academic Press, p.63-74
21. Ganesan, A., Coote, M.L., & Barakat, K. (2017). Molecular dynamics-driven drug discovery: leaping forward with confidence. *Drug discovery today*, 22(2), 249-269.
22. Borhani, D.W., Shaw, D.E. (2012). The future of molecular dynamics simulations in drug discovery. *Journal of computer-aided molecular design*, 26(1), 15-26.
23. Alder, B.J., Wainwright, T.E. (1957). Phase transition for a hard sphere system. *The Journal of chemical physics*, 27(5), 1208-1209.
24. Bernardi, R.C., Melo, M.C., Schulten, K. (2015). Enhanced sampling techniques in molecular dynamics simulations of biological systems. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1850(5), 872-877.
25. Schatz, G.C. (1988). Quantum effects in gas phase bimolecular chemical reactions. *Annual Review of Physical Chemistry*, 39(1), 317-340.
26. Cheatham III, T.E., Young, M.A. (2000). Molecular dynamics simulation of nucleic acids: successes, limitations, and promise. *Biopolymers: Original Research on Biomolecules*, 56(4), 232-256.
27. Zhao, H., Caflisch, A. (2015). Molecular dynamics in drug design. *European journal of medicinal chemistry*, 91, 4-14.
28. Guvench, O., MacKerell Jr, A.D. (2009). Computational fragment-based binding site identification by ligand competitive saturation. *PLoS computational biology*, 5(7).

29. Alonso, H., Bliznyuk, A.A., Gready, J.E. (2006). Combining docking and molecular dynamic simulations in drug design. *Medicinal research reviews*, 26(5), 531-568.
30. Maithri, G., Manasa, B., Vani, S.S., Narendra, A., Harshita, T. (2016). Computational drug design and molecular dynamic studies-a review. *International Journal of Biomedical Data Mining*, 6(01), 1-7.
31. Hospital, A., Goñi, J.R., Orozco, M., Gelpí, J.L. (2015). Molecular dynamics simulations: advances and applications. *Advances and applications in bioinformatics and chemistry: AABC*, 8, 37.
32. Hagedorn, G.A. (1980). A time dependent Born-Oppenheimer approximation. *Communications in Mathematical Physics*, 77(1), 1-19.
33. Weiner, S.J., Kollman, P.A., Case, D.A., Singh, U.C., Ghio, C., Alagona, G., Weiner, P. (1984). A new force field for molecular mechanical simulation of nucleic acids and proteins. *Journal of the American Chemical Society*, 106(3), 765-784.
34. Wang, J., Wolf, R.M., Caldwell, J.W., Kollman, P.A., Case, D.A. (2004). Development and testing of a general amber force field. *Journal of computational chemistry*, 25(9), 1157-1174.
35. Masetti, M., Rocchia, W. (2014). Molecular mechanics and dynamics: numerical tools to sample the configuration space. *Frontiers in Bioscience*, 19(1), 578-604.
36. Bone, R.G., Bader, R.F. (1996). Identifying and analyzing intermolecular bonding interactions in van der Waals molecules. *The Journal of Physical Chemistry*, 100(26), 10892-10911.
37. Hobza, P., Zahradník, R., Müller-Dethlefs, K. (2006). The world of non-covalent interactions: 2006. *Collection of Czechoslovak Chemical Communications*, 71(4), 443-531.
38. Buckingham, A.D., Fowler, P.W., Hutson, J.M. (1988). Theoretical studies of van der Waals molecules and intermolecular forces. *Chemical Reviews*, 88(6), 963-988.
39. Buckingham, A.D., Utting, B.D. (1970). Intermolecular forces. *Annual Review of Physical Chemistry*, 21(1), 287-316.
40. Nerenberg, P.S., Head-Gordon, T. (2018). New developments in force fields for biomolecular simulations. *Current opinion in structural biology*, 49, 129-138.
41. Van der Vaart, A., Bursulaya, B.D., Brooks, C.L., Merz, K.M. (2000). Are many-body effects important in protein folding? *The Journal of Physical Chemistry B*, 104(40), 9554-9563.
42. Harder, E., Damm, W., Maple, J., Wu, C., Reboul, M., Xiang, J.Y., Kaus, J.W. (2015). OPLS3: a force field providing broad coverage of drug-like small molecules and proteins. *Journal of chemical theory and computation*, 12(1), 281-296.
43. Ferreira, L., dos Santos, R., Oliva, G., Andricopulo, A. (2015). Molecular docking and structure-based drug design strategies. *Molecules*, 20(7), 13384-13421.
44. Marques, H.M., Brown, K.L. (2002). Molecular mechanics and molecular dynamics simulations of porphyrins, metalloporphyrins, heme proteins and cobalt corrinoids. *Coordination chemistry reviews*, 225(1-2), 123-158.

45. Lill, M.A., Danielson, M.L. (2011). Computer-aided drug design platform using PyMOL. *Journal of computer-aided molecular design*, 25(1), 13-19.
46. Leszczynski, J. (Ed.). (2012). Handbook of computational chemistry. *Springer Science & Business Media*. Switzerland, p.21-50.



TOPOİZOMERAZ II ENZİM İNHİBİTÖRLERİ

TOPOISOMERASE II ENZYME INHIBITORS

Oğuzhan FIRAT^{1,2,*}, İlkay YILDIZ³

¹Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Klinik Eczacılık Anabilim Dalı, Ankara

²Erzincan Binali Yıldırım Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Klinik Eczacılık Anabilim Dalı,
Erzincan

³Ankara Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Kimya Anabilim Dalı, 06560, Yenimahalle,
Ankara, Türkiye

ÖZ

Amaç: Son yıllarda önemi daha da artan topoizomeraz II enzim inhibitörleri'nin Farmasötik Kimya bilimi açısından ve klinik kullanımları değerlendirilmiştir. Bu bağlamda, klinik kullanımları olan bileşiklerin yanında geliştirilme aşamasında olan bazı bileşiklere de yer verilmiştir.

Sonuç ve Tartışma: Topoizomeraz II enzimi inhibisyonu hedefli kanser kemoterapisi ve bu mekanizmaya uygun, aktivitesi yüksek olup advers etkileri az olan ilaç geliştirme çabaları uzun yıllardır devam eden bir süreçtir. Sonuç olarak, bitkisel veya sentetik olarak elde edilen topoizomeraz II inhibitörlerinin kimyasal yapıları üzerinde uygun modifikasyonların yapılması, yüksek aktivitede birçok yeni ajanın klinik kullanımını mümkün kılmaktadır. Ayrıca kanser hastalarında sıklıkla görülen ilaç direncinin önüne geçilmesi, hedefe yönelik tedavi ve toksisitelerin azaltılması yeni ajanların keşfiyle sağlanabilecektir. Yeni ajanların kullanımının bireyselleştirilmiş tedavi yöntemleri arasında bulunmasının sağlanması ile hastalara en uygun tedavi sunulabilecektir.

Anahtar Kelimeler: antikanser, klinik eczacılık, topoizomeraz II

ABSTRACT

Objective: The use of topoisomerase II enzyme inhibitors, which have increased in importance in recent years, has been evaluated in terms of pharmaceutical chemistry and clinical use. In this context, compounds with clinical uses as well as certain compounds which are in the developmental stage are included.

Result and Discussion: Topoisomerase II enzyme inhibition targeted cancer chemotherapy and drug development efforts that are suitable for this mechanism, demonstrating high activity and less adverse effects have been ongoing for many years. As a conclusion, it provides clinical use of many new agents in high

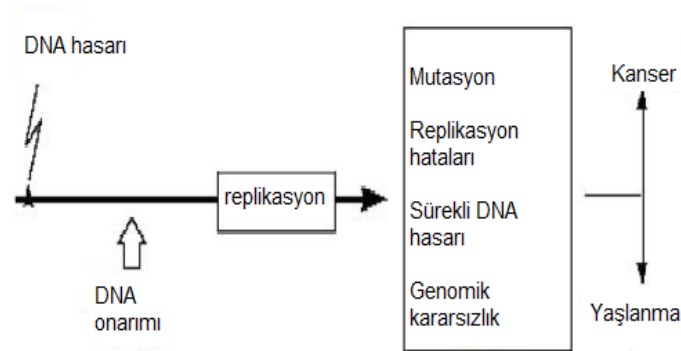
* Sorumlu Yazar / Corresponding Author: Oğuzhan Fırat
e-posta / e-mail: ogzhnfrt@gmail.com

activity by making appropriate modifications on the chemical structure of topoisomerase II inhibitors obtained herballly or synthetically. In addition, preventing drug resistance frequently seen in cancer patients, targeted treatment and reduced toxicities can be provided with the discovery of new agents. By ensuring that the use of new agents is among the individualized treatment methods, the most appropriate treatment will be provided to the patients.

Keywords: anticancer, clinical pharmacy, topoisomerase II

GİRİŞ

Kanser, DNA'daki genetik bilginin bozulması ile gelişen, genetik ve çevresel faktörlerin etkileşimine bağlı olarak meydana gelen bir hastalıktır [1, 2]. Kanser tedavisinde cerrahi yöntemler ve radyoterapi uygulamalarına ek bir tedavi yöntemi olan kemoterapötik ilaçların kullanılması bazı tümörler için birincil tedavi olarak belirtilmektedir [3]. Kanser olgularının önlenmesinde, hücredeki DNA onarım mekanizmalarının ve bu mekanizmaların işlemlerini sağlayan DNA onarım genlerinin önemi büyüktür. Şekil 1.'de gösterildiği gibi bu mekanizmalar; hücre mutasyonunu, DNA hasarının devamlılığını, hücre ölümlerini, replikasyon hatalarını ve genomik kararsızlığı önlemek amacıyla kullanılmaktadır [4].



Şekil 1. DNA onarım fonksiyonları

DNA onarım mekanizmaları, DNA çift zincir kırığı onarımı ve baz hasarı onarım mekanizmaları olmak üzere sınıflandırılmaktadır. Bu onarım mekanizmaları, nükleik asit metabolizmasında rol oynayan enzimlerin aktivitesiyle gerçekleşmektedir. Bu enzimler polimerazlar, DNA ligaz, DNA topoizomerazlar (topoizomeraz I ve II), nükleazlar, modifiye edici özel proteinler olarak belirtilmektedir [5]. DNA topoizomerazları, DNA'da geçici kırıklar oluşturan ve hücrelerin yaşamsal döngüsünü devam ettirmesi için gerekli olan ve evrimsel açıdan son derece iyi korunmuş çekirdek enzimlerdir [6]. Topoizomeraz enzimleri, tarihsel numerolojilerine göre Topo I, II, III, IV, V, VI; mekanik farklılıklara göre TipI, II, IA, IB; evrimsel sınıflandırmaya göre Topo IA, IB, IC, IIA, IIB olarak isimlendirilmişlerdir [7].

Topoizomeraz I ve II enzimleri, enzim aktif bölgelerindeki tirozin kalıntıları aracılığı ile DNA'ya geçici ve kolayca bölünebilir şekilde kovalent olarak bağlanır. Bağlanma sonrasında DNA iplikçiklerinden biri DNA'daki geçici kırık içine girer ve DNA'da meydana gelen boşluk kapatılmış olur. Bu reaksiyon ile kimyasal olarak değiştirilmemiş ancak farklı topolojide kapanmış DNA oluşur. Her iki topoizomeraz enziminin normal katalitik siklusu iki transesterifikasyon basamağı içerir, bunlardan ilki bölünme/yarılma ve diğeri ise religasyon sürecidir. Topoizomeraz enzimleri arasındaki fark, topoizomeraz I'in tek zinciri kırarken topoizomeraz II'nin çift zinciri kırması ve bu işlem için ATP gerektirmesidir [7]. Son on yıl içinde, bu enzimlerin yapısal biyolojisi ve biyokimyası ile ilgili gelişmeler, topoizomeraz enzimlerini hedef alan yeni ilaç ajanların keşfedilmesine yol açmaktadır [8, 9].

DNA Topoizomeraz II, genetik materyalin oluşturduğu düğümleri ve karışıklığı gideren ve DNA aşırı-dip sarım seviyesini düzenleyen enzimlerdir. Bu enzimler hücrenin hayatta kalması için önemli rol oynamakta ve DNA replikasyonu, transkripsiyonu ve rekombinasyonunu içeren neredeyse her nükleik asit prosesinde görev almaktadır [10].

Ökaryotik hücrelerde yer alan topoizomeraz II enzimleri, hücre döngüsünün evreleri arasında farklılık göstermekte ve böylece hücrel çoğalmayı düzenlemektedir. Bu nedenle, topoizomeraz II'yi hedef alan bileşiklerin çoğu, hücre büyümesinin ve çoğalmasının durdurulmasında görev almaktadır [11]. Topoizomeraz II'yi hedefleyen ilaçlar 'Topoizomeraz zehirleri' ve 'Topoizomeraz katalitik inhibitörleri' olarak sınıflandırılırlar. Topoizomeraz enzimini inhibe eden ajanlardan bazıları, primer etki mekanizması olarak enzimatik aktivitenin inhibisyonuna yol açarak etki etmektedir. Bu enzim inhibisyonu hücre tarafından onarılmadığında geri dönüşümsüz DNA kırıkları meydana gelir. Yani bu ilaçlar topoizomeraz enzimini, DNA'da hasara neden olan ajan haline getirirler. Topoizomerazları hedefleyen diğer ilaçlar ise enzimin, zincir kırılması ve enzimin kırık zincirlerinin tekrar bağlanma aktivitelerini etkileyerek, topoizomerazların katalizlediği geçici DNA kırığının yarı ömrünü uzatırlar. Topoizomeraz zehiri olarak isimlendirilen ve klinik kullanım açısından onay almış ilaçların büyük çoğunluğu bu mekanizma üzerinden etki etmektedir [12].

DNA topoizomerazlar, DNA'nın metabolik aktivitesindeki çoğu mekanizmada yer alan enzimlerdir. Topoizomeraz II enzimleri replikasyon, transkripsiyon ve kromozom ayrılması süreçlerinde önemli bir role sahiptir [7]. FDA (Food and Drug Administration) tarafından klinik kullanımı onaylanmış topoizomeraz II inhibitörleri etoposid, teniposid, doksorubisin, idarubisin, epirubisin ve mitoksantrondur [13]. Topoizomeraz II enzim inhibitörlerinin hedef tümör tipi, farmakokinetik özellikleri ve majör toksisiteleri Tablo 1'de gösterilmektedir [14-25].

Tablo 1. Topoizomeraz II inhibitörlerinin etkileri ve farmakolojik özellikleri

İlaç	Tümör Tipi	Farmakokinetik	Majör Toksikite
<i>Akridin Türevleri</i>			
Amsakrin	- Akut lösemi - Akut miyeloid lösemi	- % 85- 95'i plazma proteinlerine bağlanır. - Karaciğerde metabolize olur. - Yarılanma ömrü: 6-10 saat - Safra ve idrar (%35) ile atılır.	- Enfeksiyon - Hemoraji - Miyelosüpresyon
<i>Antrasiklinler</i>			
Doksorubisin	- Meme kanseri - Akut lenfositik Lösemi - Akut Miyeloid Lösemi - Wilms Tümör - Nöroblastoma - Sarkomlar - Yumurtalık Kanseri - Tiroid Kanseri - Mide Kanseri - Lenfoma	- %50-85'si plazma proteinlerine bağlanır. -Karaciğerde metabolize olur. - Eliminasyonu üç fazlıdır. -İdrar (%5-12) ve feçes (%40-50) ile atılır.	-Doza bağımlı olarak gelişen kardiyak toksisite -Miyelosüpresyon
Daunorubisin	-Akut lenfositik Lösemi -Akut Miyeloid Lösemi	-%97'si plazma proteinlerine bağlanır. - Karaciğerde metabolize olur. - Yarılanma ömrü: 26,7 saat -Safra ve idrar ile atılır.	-Doza bağımlı olarak gelişen kardiyak toksisite -Miyelosüpresyon
Epirubisin	-Meme kanseri	-%77'si plazma proteinlerine bağlanır. -Karaciğerde metabolize olur. -Yarılanma ömrü: 33 saat - Safra ve idrar ile atılır.	-Doza bağımlı olarak gelişen kardiyak toksisite -Miyelosüpresyon
İdarubisin	- Akut Miyeloid Lösemi	-%97'si plazma proteinlerine bağlanır. -Ekstra hepatik metabolizasyona uğrar. - Yarılanma ömrü: 22 saat - Safra ve idrar ile atılır.	-Doza bağımlı olarak gelişen kardiyak toksisite -Miyelosüpresyon
<i>Antrasendionlar</i>			
Mitoksantron	-Prostat kanseri -Akut Miyeloid Lösemi	- %78'i plazma proteinlerine bağlanır. - Karaciğerde metabolize olur. - Yarılanma ömrü: 75 saat - Feçes ve idrar ile atılır.	-Miyelosüpresyon
Piksantron	-B-hücreli non- Hodgkin Lenfoma	-Yaklaşık %50'si plazma proteinlerine bağlanır. - Yarılanma ömrü: 12 saat - Feçes ve idrarla atılır.	-Doza bağımlı olarak gelişen nötropeni
<i>Epipodofilotoksinler</i>			
Etoposid	-Küçük hücreli akciğer kanseri -Testis kanseri	- %94-98'i plazma proteinlerine bağlanır. -Karaciğerde metabolize olur. -Yarılanma ömrü: % 6-8 saat - Feçes ve idrarla atılır.	-Miyelosüpresyon
Teniposid	-Pediatrik lenfoblastik lösemi	-%99'u proteine bağlanır. - Karaciğerde metabolize olur. - Yarılanma ömrü: 5 saat - Feçes ve idrarla atılır	-Miyelosüpresyon

1. Topoizomeraz II Zehirleri

Topoizomeraz II zehirleri, topoizomeraz enzimin parçalanmış DNA moleküllerini bağlama yeteneğini inhibe ederek veya enzim aracılı DNA parçalanma oranını arttıran iki özel yolak aracılığıyla bölünme komplekslerinin konsantrasyonunu artırarak etki gösterirler. Topoizomeraz II zehirleri, DNA bölünme/bağlanma (ligasyon) dengesini üç farklı mekanizma ile etkiler. Arayüzey ve redoks bağımlı topoizomeraz II zehirleri öncelikli olarak bağlanmayı (ligasyon) inhibe ederken, DNA lezyonları öncelikli olarak DNA yarılmamasının oranını artırarak etki gösterirler. Arayüzey topoizomeraz II zehirlerine epipodofilotoksin sınıfından etoposid ve teniposid, redoks bağımlı topoizomeraz II zehirlerine ise epigallokateşin gallat (EGGC) gibi polifenollerin yanı sıra benzen metaboliti 1,4-benzokinon, N-asetil p-benzokinon imin (NAPQI) ve poliklorlu bifeniller (PCB) kinon metabolitleri de dahil olmak üzere kinon esaslı toksinler örnek olarak gösterilmektedir [7].

1.1. Epipodofilotoksin Türevleri

Etoposid ve teniposid gibi podofilotoksinlerin yarı sentetik epimerleri olan Epipodofilotoksin türevlerinin, DNA topoizomeraz II enzimi üzerinde kuvvetli inhibitör etkiye sahip olduğu bilinmektedir. Etki mekanizmaları benzer olan etoposid ve teniposid, DNA'da çift zincir kırılmalarına neden olup DNA religasyonunu önleyen bölünebilir kompleksler oluşturmak için topoizomeraz II ile etkileşime girerek DNA'ya hasar verir. Etoposid ve teniposid akciğer kanseri, germ hücreli maligniteler, lösemiler, non-Hodgkin lenfoma, Kaposi sarkomu, yumuşak doku sarkomları ve nöroblastom tedavilerinde endikedir. Ayrıca, Teniposid, kötü prognoza sahip akut lenfositik lösemili pediatrik hastaların tedavisinde de kullanılmaktadır [13].

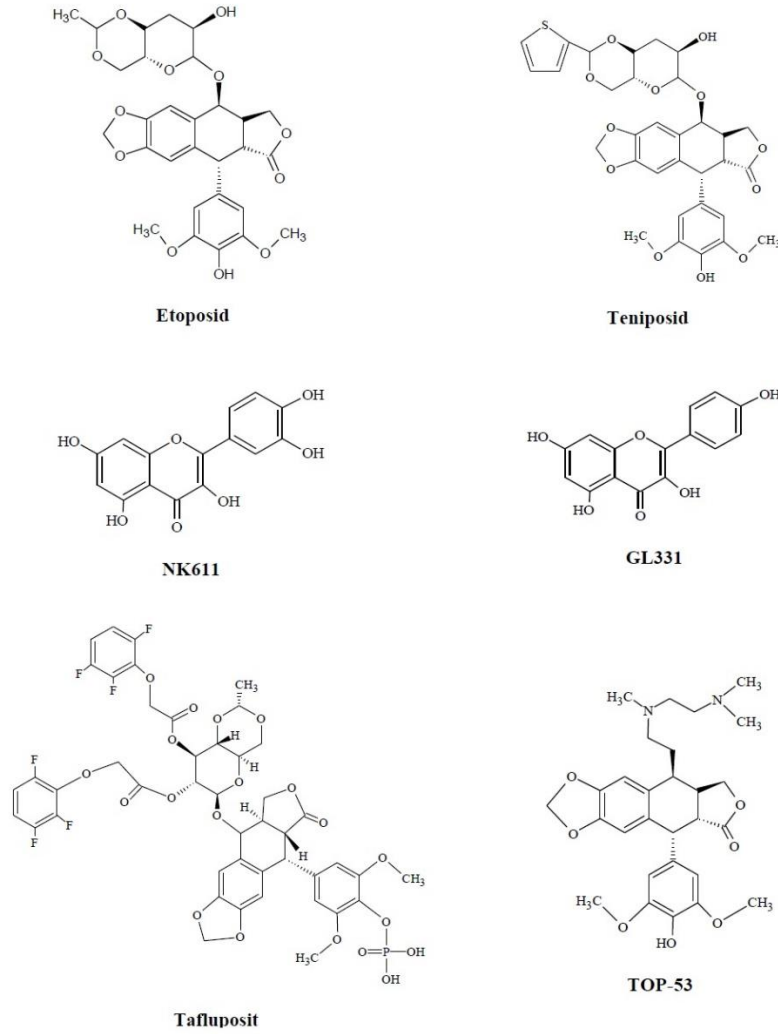
Etoposid ve teniposid dışında NK611, GL331, TOP-53 ve Tafluposit, klinik araştırmaları devam eden ajanlardandır. D-glikoz parçasında bir dimetilamino grubu taşıyan yeni bir podofilotoksin türevi olan NK 611'in hem etopositten hem de tenipositten daha iyi antitümör aktivite gösterdiği belirtilmektedir. GL331, bir anilin grubu için etoposidin glikozid sübstütüsyonuyla geliştirilmiş ve sitotoksisite çalışmalarında etoposite kıyasla 40 kat daha etkili bulunmuştur. TOP-53 ve tafluposit, diğer antikanser etkili etken maddelere kıyasla daha iyi aktiviteye sahip bileşiklerdir [26]. Şekil 2'de epipodofilotoksin türevlerinin kimyasal yapıları gösterilmiştir.

1.2. Akridin Türevleri

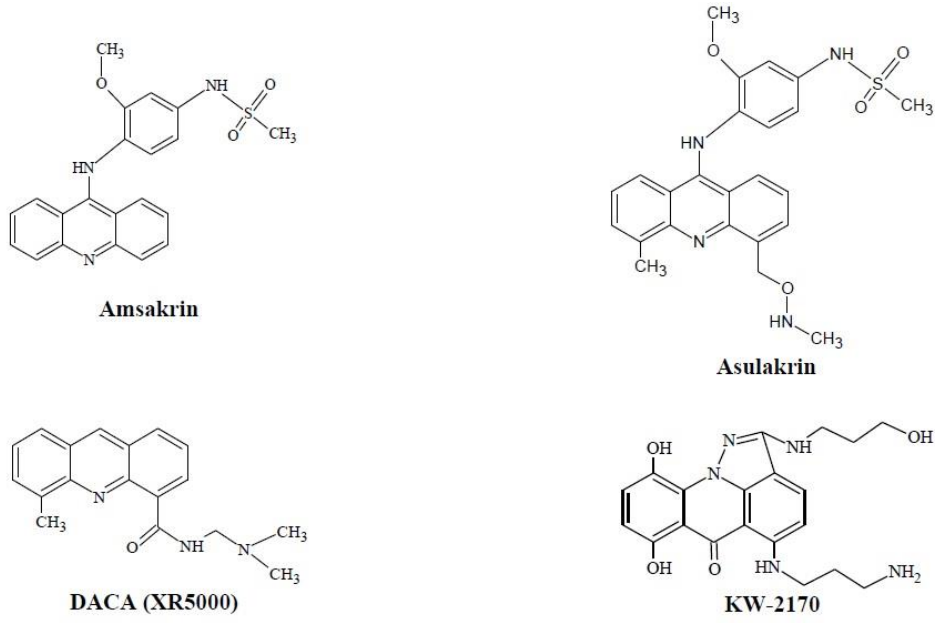
Topoizomeraz II enzimini zehir etkisi oluşturarak inhibe eden diğer bir grup akridin türevi bileşiklerdir. Klinik araştırmaları tamamlanan tek akridin türevi ajan olan amsakrin (mAMSA)'nin temel etki mekanizması, DNA ve topoizomeraz II ile üçlü bir kompleksin oluşması, bölünebilir kompleksin yakalanması ve religasyon adımının engellenmesidir [7]. Amsakrin'in pediatrik ve

erişkin akut lösemilere neden olabilecek hematolojik malignitelerin tedavisinde ve bazı lenfomalarda klinik kullanımı mevcuttur. Ayrıca amsakrin, akut miyeloblastik lösemi ve akut lenfoblastik lösemide önemli derecede etkinliğe sahiptir [27]. Amsakrinin yanı sıra asulakrin, DACA (XR5000) ve KW-2170 gibi ajanların klinik araştırmaları devam etmektedir (Şekil 3).

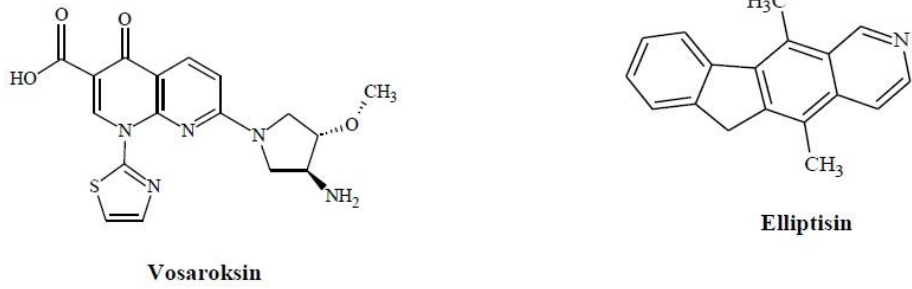
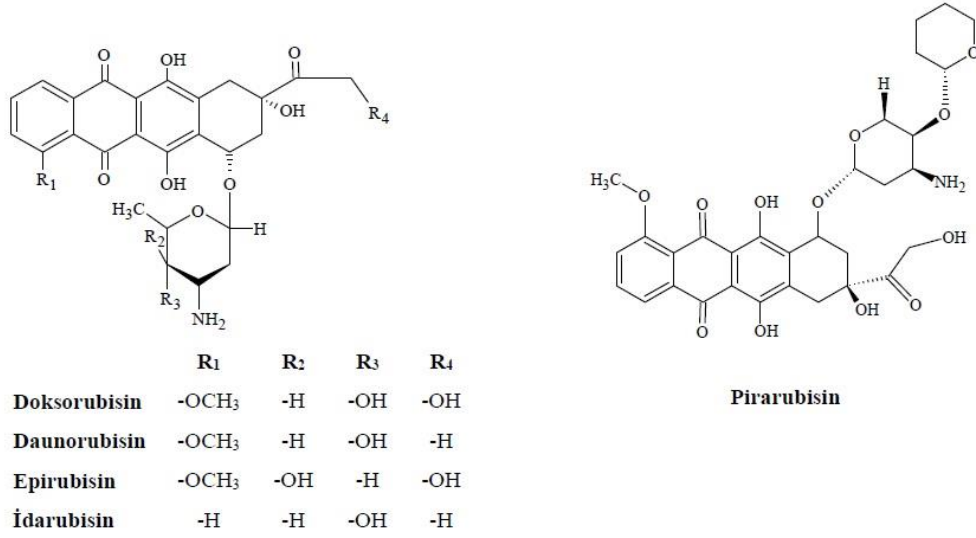
Asulakrin, deneysel olarak kanserli dokular üzerinde geniş bir aktiviteye sahipken klinik antitümör aktivitesi kısıtlı olan bir ajandır [7]. DACA, hem topoizomerez I hem de II'yi inhibe eden bir akridin karboksamid türevi ajandır. P-glikoprotein veya çoklu ilaca dirençli protein aracılığıyla ilaç direnci gösteren ilaçlar da dâhil olmak üzere klinik kullanım öncesi modellerde bu çift inhibisyonun etkinliği, DACA'yı klinik gelişim açısından çalışmalara yön verici bir bileşik haline getirmiştir [28]. Pirazoloakridon yapısındaki KW-2170'nin, prelinik çalışmalarda interkalasyon ile nükleik asitlere bağlanarak DNA ve RNA'yı inhibe eden *in vitro* antineoplastik aktiviteye sahip olduğu belirtilmektedir [7, 29].



Şekil 2. Epipodofilotoksin türevi bileşiklerin kimyasal yapıları



Şekil 3. Akridin türevi bileşiklerin kimyasal yapıları



Şekil 4. Antrasiklin türevi bileşiklerin kimyasal yapıları

1.3. Antrasiklin Türevleri

Memeli hücrelerinde topoizomeraz II α ve II β , sırasıyla kromozom 17 ve 3 üzerinde lokalize olarak bulunur [30]. İnsan topoizomeraz II α ve topoizomeraz II β , esas olarak N-terminal ve merkezi katalitik alanlarda, amino asit sekanslarında neredeyse % 70 homoloji gösterirken, ana sekans sapması C-terminal alanını içerir [31, 32]. Topoizomeraz II α hızla çoğalan hücrelerde yüksek oranda eksprese edilir ve hücre döngüsünün G2/M fazında bir zirveye ulaşır. Buna karşılık, topoizomeraz II β , tüm dokulardaki pasif hücrelerde eksprese edilir ve hücre döngüsü sırasında ekspresyon düzeyinde anlamlı bir değişiklik göstermez [33]. Antrasiklinler, her iki topoizomeraz II izoformu ile etkileşmektedir. Topoizomeraz II α üzerindeki etki, bu izoformun replikasyon ve hücre proliferasyonu sırasında ana rolü olduğu için antrasiklin türevi bileşiklerin aktivitesinin moleküler temeli olarak kabul edilmektedir [34, 35]. Topoizomeraz II β ise hücre ölüm sürecine katkıda bulunsa da, kardiyotoksisite ve sekonder maligniteler gibi antrasiklinlerin uzun süreli yan etkileri ile ilişkili olduğu belirtilmektedir [36, 37].

Antrasiklinler, kanser kemoterapisinde klinik kullanımı olan ve bazı lösemi, lenfoma ve yumuşak doku karsinomlarına, meme ve akciğer kanserlerine karşı aktivite gösteren bileşiklerdir. Bununla birlikte, doz-kısıtlayıcı kardiyotoksik etkileri ve özellikle gastrointestinal kanalda meydana gelen tümörler gibi çeşitli tümörlere karşı aktivite eksiklikleri, antrasiklin gruplarını etki ve yan etki açısından geliştirilmeye zorunlu kılmıştır [38]. Amerika Birleşik Devletleri'nde kullanımı onaylanan antrasiklinler doksorubisin, daunorubisin, epirubisin ve idarubisindir [39]. Antrasiklin türevi bileşiklerin kimyasal yapıları Şekil 4'te gösterilmiştir.

Antrasiklinler, DNA'nın tek ya da çift zincirinde kopmalarına neden olarak nükleer helikazların dubleks DNA'yı, tekli DNA zincirlerine ayırma işlevini değiştirirler ve bu bileşiklerin topoizomeraz II'de zehir etkisi oluşturma özelliği ajanın sitotoksik potansiyeli ile korelasyon göstermektedir [39].

Antrasiklin grubu ajanlarda kardiyotoksisite ve çoklu ilaç dirençli gen ile ilişkili ilaç direnci en önemli problemler arasındadır. Yan etkileri azaltmak, çoklu ilaç direncini engellemek ve çeşitli analoglar üretmek amacıyla antrasiklinlerin yapısında değişiklikler yapılarak diğer ajanlar sentezlenmiştir [40]. Doksorubisinin yarı sentetik bir türevi olan ve çoklu ilaç direnci gelişen kanser hücrelerinde, doksorubisine dirençli lenfoblastom hücreleri de dâhil olmak üzere birçok kanser hücresi üzerinde olumlu aktivitesi olan pirarubisinin, doksorubisine göre tümör hücreleri tarafından absorbe edilme hızı yaklaşık 170 kat fazladır [41].

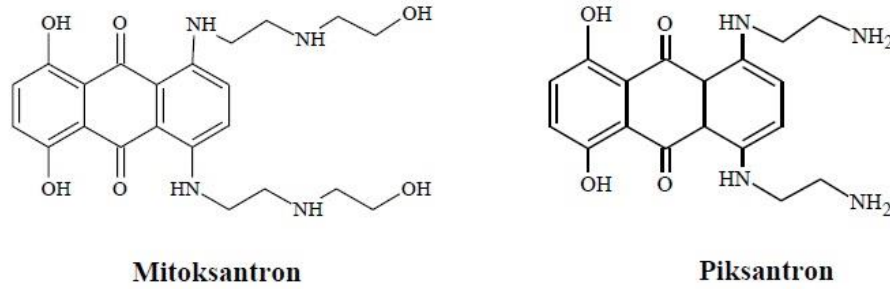
1959'da Goodwin ve arkadaşları tarafından yaprak dökmeyen tropik bir ağaçtan (*Ochrosia elliptica*) izole edilen elliptisinin (11-dimetil-6H-pirido [4,3-b] karbazol) düzlemsel tetrasiklik yapısı birçok çalışmanın konusu olmuştur [42, 43]. Elliptisin yüksek konsantrasyonlarda DNA

interkalasyonu, ilişkili topoizomeraz II enzimini inhibe ederek sitotoksik etkisini gösterir [43, 44]. Elliptisinden hareketle birçok bileşik sentezlenmiş (1, 2, 6 ve 9. konum) ve bu bileşiklerin bazıları topoizomeraz II enzimleri üzerinde güçlü zehir etkisi oluşturmuştur [43].

Bakteriyel olmayan bir kinolon türevidir olan vosaroksin, en yeni topoizomeraz II enzimi üzerinde zehir etkisi oluşturarak enzim inhibisyonu ile aktivitesini gösteren ve tekrarlayıcı/refrakter akut miyeloid lösemi tedavisinde kullanımı araştırılan ajanlardan biridir [42, 45, 46]. Antrasiklinlere benzer şekilde, vosaroksin topoizomeraz II'yi güçlü bir şekilde inhibe eder ve çift zincirli DNA kopmalarını indükler. Yapılan bazı faz II çalışmaları, vosaroksinin tek başına veya sitarabin ile kombinasyon halinde etkinliğini göstermiştir [46]. Vosaroksin stabil bir kinolon çekirdeğe sahip olduğundan diğer topoizomeraz inhibitörlerine göre daha az reaktif hale gelmektedir. Ayrıca hedef dışı organ hasarı ve kardiyotoksisiteye neden olabilen toksik metabolit ve reaktif oksijen türlerinin oluşumu daha az görülmektedir [47].

1.4. Antrasendion Türevleri

Antrasendionlar, antrasiklinler üç düzlemsel halka içermekte ve ayrıca antrasiklinlerin sahip olduğu daunosamin amino şekerinden yoksun bileşikler olarak tanımlanmaktadır [48]. Murdock tarafından 1979'da sentezlenen mitoksantron, bu grupta klinik kullanım için onay almıştır [7, 40]. Mitoksantron, antrasiklinlerin neden olduğu kardiyotoksik etkiye neden olduğu düşünülen kinon tipi serbest radikaller oluşturmadığı için antineoplastik etkisiyle birlikte kardiyotoksik etkiyi azaltmak amacıyla antrasiklinlere alternatif olarak geliştirilmiştir [49]. Mitoksantron, başlıca meme kanseri, lösemi, lenfoma ve prostat kanserinin tedavisinde kullanılmaktadır [13]. Mitoksantron, refrakter akut miyeloid lösemili hastalarda da kullanılmakta ve tek başına etoposid ile veya kladribin, sitarabin gibi ajanlarla kombine edilmektedir [50]. Mitoksantronun birincil doz sınırlayıcı toksik etkisinin miyelosupresyon olduğu ve antrasiklinlere göre daha az kardiyotoksisite riskine sahip olduğu belirtilmektedir [13]. Piksanton ise tipik olarak antrasiklinlerin kullanımı ile sık görülen kardiyotoksisite riskini azaltarak antineoplastik etki elde etmek amacıyla geliştirilmiş yeni bir aza-antrasendion türevidir. Piksanton, mitoksantron ile karşılaştırıldığında piksantronda bir hidrokinon halkasının çıkarıldığı, aynı halkaya bir azot heteroatomu eklendiği ve etilamino yan zincirleri için dietilamin yan zincirleri süstitüe edildiği görülmektedir. Piksantonun molekül yapısındaki bu farklılıklar mitoksantrona göre daha az kardiyotoksik etkinin görülmesini sağlamaktadır [48]. Şekil 5'te antresendion türevidir bileşiklerin kimyasal yapıları gösterilmektedir.



Şekil 5. Antrasiklin türevi bileşiklerin kimyasal yapıları

2. Topoizomeraz II Katalitik İnhibitörleri

Topoizomeraz II katalitik inhibitörleri, enzimin katalitik fonksiyonunu DNA hasarı oluşturmadan inhibe ederek sitotoksik etki gösteren ajanlardır. DNA yarılmasını önlenmesi (örn. Merbaron), ATP hidrolizinin önlenmesi (örn. Deksraksoksan) ve ATP ile bağlanmak için yarışma (örn. Novobiosin) gibi farklı mekanizmalar üzerinden aktive gösterirler [51]. Şekil 6'da topoizomeraz II katalitik inhibitörlerinin kimyasal yapıları gösterilmektedir.

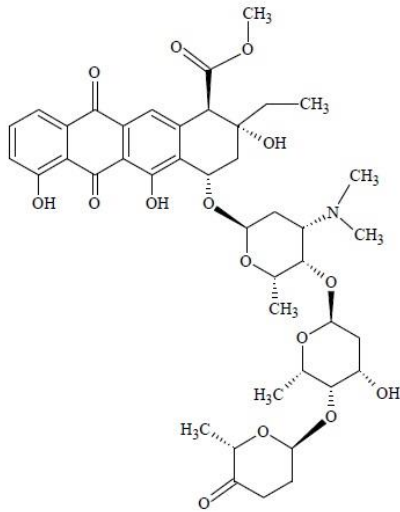
Akut miyelositik lösemi tedavisinde kullanılan aklarubisin, topoizomeraz I ve II enzimlerinin her ikisini de inhibe eder [52]. Çoğu antrasiklin türevi bileşiği topoizomeraz II üzerinde zehir etkisi göstermesine rağmen aklarubisin, topoizomeraz aracılı bölünme düzeylerini arttırmak yerine hem topoizomeraz II aracılı bölünme hem de topoizomeraz II katalitik aktivitesinin güçlü bir inhibitörü olarak etki göstermektedir [7]. Aklarubisin, diğer antrasiklinler gibi DNA interkalatörü olarak kabul edilmektedir. Aklarubisin, kimyasal yapısında bulunan 3 şeker grubu ile DNA'ya bağlanmaktadır. Monosakkarit birimlerinin kısmi veya tam olarak bölünmesi aklarubisinin antiproliferatif aktivitesini, glikozidin DNA'yı bağlama kapasitesi ile ilişkili olarak değişken bir ölçüde azaltmaktadır [53]. Aklarubisin, günümüzde akut miyeloid lösemi tedavisinde sadece Çin ve Japonya'da kullanılmakta ve çeşitli sitotoksik ajanlarla (örn. Sitarabin) kombine edilme çalışmaları devam etmektedir [46].

Bisdioksopiperazin türevleri (ICRF-154, ICRF-159, ICRF-186, ICRF-187 ve ICRF193) interkale edici olmayan ve doğrudan topoizomeraz II enzimine bağlanıp DNA religasyonundan sonra enzimi kilitleyerek etki gösteren ajanlardır. ICRF-154'e metabolize olan ve klinik olarak kullanılan bir ön ilaç olan Sobuzoksan (MST-16), günümüzde lenfomalar ve yetişkin T-hücresi lösemilerinin tedavisinde Japonya'da bir klinik antikanser ajanı olarak kullanılmaktadır. ICRF türevlerinin metal katyonları ile şelat oluşturduğu, antrasiklin toksisitesine ve kardiyomiyopatiye neden olan metal-antrasiklin kompleksleri oluşumu ile sonuçlanan serbest radikal üretimini tersine çevirdiği

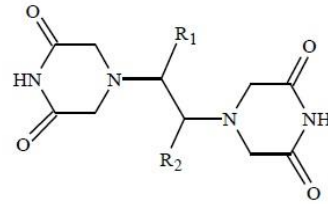
bilinmektedir. ICRF-187 (Deksrazoksan veya ADR-529), doksorubisin kaynaklı kardiyotoksisitenin azaltılması için klinik olarak kullanılmaktadır. ICRF-193, ICRF-154'ün bir dimetil türevi olup, topoizomeraz II'ye karşı en güçlü bisdioksopiperazin türevidir [52, 54].

Bisdioksopiperazin türevi bileşiklerin aksine bir aminokumarin antibiyotik olan novobiosin topoizomeraz II enzimlerinin ATPaz aktivitesini yarışmalı olarak inhibe eder. Novobiosinin yapısal çalışmalarında kimyasal yapısındaki şeker ve kumarin parçalarının nükleozid bağlanma bölgesi için ATP ile yarıştığı belirtilmektedir [49].

Barbitürik asit analoglarının incelenmesi sırasında keşfedilen tiyobarbitürik asit türevi bir ajan olan Merbarone, topoizomeraz II enziminin DNA ile birleşmesini engellemeden DNA bölünmesini inhibe eder. Bu bileşiğin, DNA topoizomeraz II bölünebilir komplekslerinin indüksiyonunu inhibe ettiği gösterilmiştir. Antikanser aktivitesinin düşüklüğü ve nefrotoksisite gibi sorunlar nedeniyle çalışmaları durdurulmuştur [7, 55].

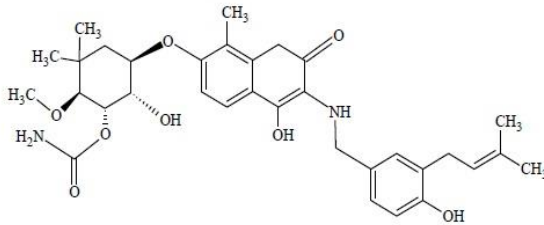


Aklarubisin

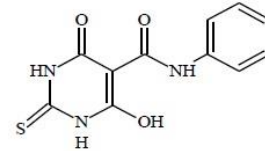


	R ₁	R ₂
ICRF-154	-H	-H
ICRF-159	-H	-CH ₃ (Rasemik)
ICRF-186	-H	-CH ₃ (R)-(-)
ICRF-187	-H	-CH ₃ (S)-(+)
ICRF-193	-CH ₃	-CH ₃ (Mezo)

Bisdioksopiperazin türevleri



Novobiosin



Merbaron

Şekil 6. Topoizomeraz II katalitik inhibitörlerinin kimyasal yapıları

SONUÇ VE TARTIŞMA

Topoizomeraz II enzimi inhibisyonu hedefli kanser kemoterapisi ve bu mekanizmaya uygun, aktivitesi yüksek olup advers etkileri az olan ilaç geliştirme çabaları uzun yıllardır devam eden bir süreçtir. Tedavide kullanılan topoizomeraz II enzim inhibitörlerinin yanında klinik araştırmaları devam etmekte olan birçok yeni ajan bulunmaktadır. Bu derlemede hem kullanımı mevcut hem de klinik çalışmaları devam eden topoizomeraz II enzim inhibitörleri yapısal, farmakolojik ve klinik kullanım açısından değerlendirilmektedir.

Günümüzde klinik kullanımı olan Epipodofiloksin ve antrasiklin türevlerinin kümülatif kardiyotoksisite, tedaviye bağlı ilaç direnci gelişimi ve sekonder maligniteler gibi ilaç ilişkili problemlere neden olduğu literatürde sıklıkla vurgulanmaktadır. Klinik çalışmaları devam eden ajanların bu problemlerin görülme sıklığını azaltabileceği düşünülmektedir.

Sonuç olarak, bitkisel veya sentetik olarak elde edilen topoizomeraz II inhibitörlerinin kimyasal yapıları üzerinde uygun modifikasyonların yapılması yüksek aktivitede birçok yeni ajanın klinik kullanımını sağlamaktadır. Ayrıca kanser hastalarında sıklıkla görülen ilaç direncinin önüne geçilmesi, hedefe yönelik tedavi ve toksisitelerin azaltılması yeni ajanların keşfiyle azaltılabilecektir. Yeni ajanların kullanımının bireyselleştirilmiş tedavi yöntemleri arasına girmesiyle hastalara en doğru tedavinin sağlanması mümkün olacaktır.

KAYNAKLAR

1. Harrington, K. J. (2011). Biology of cancer. *Medicine*, 39(12), 689-692. <https://doi.org/10.1016/j.mpmed.2011.09.015>
2. Wong, S. H., Kwong, T. N., Wu, C. Y., Yu, J. (2019). Clinical applications of gut microbiota in cancer biology. *Seminars in cancer biology*, 55, 28-36. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2018.05.003>
3. Prospective Studies Collaboration. (2002). Age-specific relevance of usual blood pressure to vascular mortality: a meta-analysis of individual data for one million adults in 61 prospective studies. *The Lancet*, 360(9349), 1903-1913. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(02\)11911-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(02)11911-8)
4. Bilge, D. B., Kantarcı, G. Mutation, Dna Damage, Repair Mechanisms And The Relation Of Cancer. *Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Dergisi*, 35(2), 149-170. https://doi.org/10.1501/Eczfak_0000000056
5. Friedberg, E. C. (2003). DNA damage and repair. *Nature*, 421(6921), 436-440. <https://doi.org/10.1038/nature01408>
6. Doğan, İ., Yar, A. S., Ergin, V., Menevşe, S., Menevşe, A., Ekmekçi, A. (2013). L929

Fibroblast Hücre Hattında Topoizomeraz İnhibisyonunun DNA Onarımı ve Apoptozis Üzerine Etkisi. *Turkish Journal of Biochemistry/Türk Biyokimya Dergisi*, 38(2), 229-237. doi:10.5505/tjb.2013.32032

7. Pommier, Y. (2012). DNA topoisomerases and cancer, Springer, Berlin.
8. Cuya, S. M., Bjornsti, M. A., van Waardenburg, R. C. (2017). DNA topoisomerase-targeting chemotherapeutics: what's new?. *Cancer chemotherapy and pharmacology*, 80 (1), 1-14. <https://doi.org/10.1007/s00280-017-3334-5>
9. Baker, N. M., Rajan, R., Mondragon, A. (2009). Structural studies of type I topoisomerases. *Nucleic acids research*, 37(3), 693-701. <https://doi.org/10.1093/nar/gkn1009>
10. Pendleton, M., Lindsey Jr, R. H., Felix, C. A., Grimwade, D., Osheroff, N. (2014). Topoisomerase II and leukemia. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1310(1), 98-110. <https://doi.org/10.1111/nyas.12358>
11. Bansal, S., Bajaj, P., Pandey, S., Tandon, V. (2017). Topoisomerases: Resistance versus sensitivity, how far we can go?. *Medicinal research reviews*, 37(2), 404-438. <https://doi.org/10.1002/med.21417>
12. Holden, J. A. (2001). DNA Topoisomerases as anticancer drug targets from the laboratory to the clinic. *Current Medicinal Chemistry-Anti-Cancer Agents*, 1(1), 1-25. <https://doi.org/10.2174/1568011013354859>
13. Hande, K. R. (2008). Topoisomerase II inhibitors. *Update on cancer therapeutics*, 3(1), 13-26. <https://doi.org/10.1016/j.uct.2008.02.001>
14. DeVita, V. T., Lawrence, T. S., Rosenberg, S. A. (2019). Cancer: principles & practice of oncology: primer of the molecular biology of cancer (Vol. 11): Lippincott Williams & Wilkins. Philadelphia.
15. Speth, P. A. J., Van Hoesel, Q. G. C. M., Haanen, C. (1988). Clinical pharmacokinetics of doxorubicin. *Clinical pharmacokinetics*, 15(1), 15-31. <https://doi.org/10.2165/00003088-198815010-00002>
16. Rizvi, S. F. A., Tariq, S., Mehdi, M. (2018). Anthracyclines: mechanism of action, classification, pharmacokinetics and future—a mini review. *Int J Biotech Bioeng*, 4(4), 81-85.
17. Albert, J., Verweij, J., Loos, W. J., Sparreboom, A. (2003). Pharmacological effects of formulation vehicles. *Clinical pharmacokinetics*, 42(7), 665-685. <https://doi.org/10.2165/00003088-200342070-00005>
18. Clark, P. I., Slevin, M. L. (1987). The clinical pharmacology of etoposide and teniposide. *Clinical pharmacokinetics*, 12(4), 223-252. <https://doi.org/10.2165/00003088-198712040-00001>
19. Donelli, M. G., Zucchetti, M., Munzone, E., D'Incalci, M., Crosignani, A. (1998). Pharmacokinetics of anticancer agents in patients with impaired liver function. *European journal of cancer*, 34(1), 33-46. [https://doi.org/10.1016/S0959-8049\(97\)00340-7](https://doi.org/10.1016/S0959-8049(97)00340-7)

20. Veal, G. J., Cole, M., Errington, J., Parry, A., Hale, J., Pearson, A. D., Howe K., Chisholm J, C., Beane C., Brennan B., Waters F., Glaser A., Hemsworth S., McDowell H., Wright Y., Pritchard-Jones K., Pinkerton R., Jenner G., Nicholson J., Elsworth A. M., Boddy A. V. (2005). Pharmacokinetics of dactinomycin in a pediatric patient population: a United Kingdom Children's Cancer Study Group Study. *Clinical cancer research*, 11(16), 5893-5899. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-04-2546>
21. Van Hasselt, J. G. C., Van Calsteren, K., Heyns, L., Han, S., Mhallem Gziri, M., Schellens, J. H. M., Beijnen J. H., Huitema A. D. R., Amant, F. (2014). Optimizing anticancer drug treatment in pregnant cancer patients: pharmacokinetic analysis of gestation-induced changes for doxorubicin, epirubicin, docetaxel and paclitaxel. *Annals of oncology*, 25(10), 2059-2065. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdu140>
22. Crom, W. R., Glynn-Barnhart, A. M., Rodman, J. H., Teresi, M. E., Kavanagh, R. E., Christensen, M. L., Evans, W. E. (1987). Pharmacokinetics of anticancer drugs in children. *Clinical pharmacokinetics*, 12(3), 168-213. <https://doi.org/10.2165/00003088-198712030-00002>
23. Reid, J. M., Pendergrass, T. W., Krailo, M. D., Hammond, G. D., Ames, M. M. (1990). Plasma pharmacokinetics and cerebrospinal fluid concentrations of idarubicin and idarubicinol in pediatric leukemia patients: a Childrens Cancer Study Group report. *Cancer research*, 50(20), 6525-6528.
24. Robert, J. (1993). Clinical pharmacokinetics of idarubicin. *Clinical pharmacokinetics*, 24(4), 275-288. <https://doi.org/10.2165/00003088-199324040-00002>
25. Hall, S. W., Friedman, J., Legha, S. S., Benjamin, R. S., Gutterman, J. U., Loo, T. L. (1983). Human pharmacokinetics of a new acridine derivative, 4'-(9-acridinylamino) methanesulfonm-anisidide (NSC 249992). *Cancer research*, 43(7), 3422-3426.
26. Rather, M. (2016). A comprehensive review on the phytochemical and pharmacological aspects of Podophyllum hexandrum: a high value medicinal plant. *Advances in Biomedicine and Pharmacy*, 3(4), 216-226. doi:10.19046/abp.v03i04.06
27. Denny, W. A. (2002). Acridine derivatives as chemotherapeutic agents. *Current Medicinal Chemistry*, 9(18), 1655-1665. <https://doi.org/10.2174/0929867023369277>
28. Dittrich, C., Coudert, B., Paz-Ares, L., Caponigro, F., Salzberg, M., Gamucci, T., Paoletti X., Hermans C., Lacombe D., Fumoleau P., European Organization for Research and Treatment of Cancer--Early Clinical Studies Group/New Drug Development Programme (EORTC-ECSG/NDDP) (2003). Phase II study of XR 5000 (DACA), an inhibitor of topoisomerase I and II, administered as a 120-h infusion in patients with non-small cell lung cancer. *European Journal of Cancer*, 39(3), 330-334. [https://doi.org/10.1016/S0959-8049\(02\)00559-2](https://doi.org/10.1016/S0959-8049(02)00559-2)
29. De Souza, P. L., North, S., Bolger, G. B., Spiridonidis, H., Lim, R., Khoo, K. S., Fujimori, M. (2010). A phase II trial of weekly iv KW-2170 in advanced castrate-resistant prostate cancer. *Asia-Pacific Journal of Clinical Oncology*, 6(4), 292-297. <https://doi.org/10.1111/j.1743-7563.2010.01328.x>
30. Wang, J. C. (2009). A journey in the world of DNA rings and beyond. Annual review of

- biochemistry, 78, 31-54. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.78.030107.090101>
31. Austin, C. A., Marsh, K. L. (1998). Eukaryotic DNA topoisomerase II beta. *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology*, 20(3), 215–226. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1521-1878\(199803\)20:3<215::AID-BIES5>3.0.CO;2-Q](https://doi.org/10.1002/(SICI)1521-1878(199803)20:3<215::AID-BIES5>3.0.CO;2-Q)
 32. Marinello, J., Delcuratolo, M., Capranico, G. (2018). Anthracyclines as topoisomerase II poisons: from early studies to new perspectives. *International journal of molecular sciences*, 19(11), 3480. <https://doi.org/10.3390/ijms19113480>
 33. Vejpongsa, P., Yeh, E. T. H. (2014). Topoisomerase 2 β : a promising molecular target for primary prevention of anthracycline-induced cardiotoxicity. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, 95(1), 45-52. <https://doi.org/10.1038/clpt.2013.201>
 34. Bailly, C. (2012). Contemporary challenges in the design of topoisomerase II inhibitors for cancer chemotherapy. *Chemical reviews*, 112(7), 3611-3640. <https://doi.org/10.1021/cr200325f>
 35. Nitiss, J. L. (2009). Targeting DNA topoisomerase II in cancer chemotherapy. *Nature Reviews Cancer*, 9(5), 338-350. <https://doi.org/10.1038/nrc2607>
 36. Cornarotti, M., Tinelli, S., Willmore, E., Zunino, F., Fisher, L. M., Austin, C. A., Capranico, G. (1996). Drug sensitivity and sequence specificity of human recombinant DNA topoisomerases I α (p170) and I β (p180). *Molecular Pharmacology*, 50(6), 1463-1471.
 37. Errington, F., Willmore, E., Tilby, M. J., Li, L., Li, G., Li, W., Baguley B. C., Austin, C. A. (1999). Murine transgenic cells lacking DNA topoisomerase II β are resistant to acridines and mitoxantrone: analysis of cytotoxicity and cleavable complex formation. *Molecular pharmacology*, 56(6), 1309-1316. <https://doi.org/10.1124/mol.56.6.1309>
 38. Hoffmann, D., Berscheid, H. G., Boettger, D., Hermentin, P., Sedlacek, H. H., Kraemer, H. P. (1990). Structure-activity relationship of anthracyclines in vitro. *Journal of medicinal chemistry*, 33(1), 166-171. <https://doi.org/10.1021/jm00163a028>
 39. Bkhaitan, M. M., Mirza, A. Z., Shamshad, H., Ali, H. I. (2017). Identification of potent virtual leads and ADME prediction of isoxazolidine podophyllotoxin derivatives as topoisomerase II and tubulin inhibitors. *Journal of Molecular Graphics and Modelling*, 73, 74-93. <https://doi.org/10.1016/j.jmgm.2017.01.015>
 40. Zhu, L., Cao, X., Chen, W., Zhang, G., Sun, D., Wang, P. G. (2005). Syntheses and biological activities of daunorubicin analogs with uncommon sugars. *Bioorganic & medicinal chemistry*, 13(23), 6381-6387. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2005.06.053>
 41. Zheng, S., Zhou, S., Qiao, G., Yang, Q., Zhang, Z., Lin, F., Min D., Tang L., Li H., Sun Y., Zhao H., Shen Z., Yao Y. (2015). Pirarubicin-based chemotherapy displayed better clinical outcomes and lower toxicity than did doxorubicin-based chemotherapy in the treatment of non-metastatic extremity osteosarcoma. *American journal of cancer research*, 5(1), 411-422.
 42. Murphy, M. B., Mercer, S. L., Deweese, J. E. (2017). Chapter Five Inhibitors and Poisons of

- Mammalian Type II Topoisomerases. In: Fishbein J.C., Heilman J. M. (Eds.), *Advances in Molecular Toxicology* (Vol. 11, pp. 203-240), Elsevier.
43. Miller, C. M., O'Sullivan, E. C., McCarthy, F. O. (2019). Novel 11-substituted ellipticines as potent anticancer agents with divergent activity against cancer cells. *Pharmaceuticals*, 12(2), 90. <https://doi.org/10.3390/ph12020090>
 44. Vann, K. R., Ergün, Y., Zencir, S., Oncuoglu, S., Osheroff, N., Topcu, Z. (2016). Inhibition of human DNA topoisomerase II α by two novel ellipticine derivatives. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, 26(7), 1809-1812. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2016.02.034>
 45. Jamieson, G. C., Fox, J. A., Poi, M., Strickland, S. A. (2016). Molecular and pharmacologic properties of the anticancer quinolone derivative vosaroxin: A new therapeutic agent for acute myeloid leukemia. *Drugs*, 76(13), 1245-1255. <https://doi.org/10.1007/s40265-016-0614-z>
 46. Economides, M. P., McCue, D., Borthakur, G., Pemmaraju, N. (2019). Topoisomerase II inhibitors in AML: past, present, and future. *Expert opinion on pharmacotherapy*, 20(13), 1637-1644. <https://doi.org/10.1080/14656566.2019.1621292>
 47. Hevener, K., Verstak, T. A., Lutat, K. E., Riggsbee, D. L., Mooney, J. W. (2018). Recent developments in topoisomerase-targeted cancer chemotherapy. *Acta pharmaceutica sinica B*, 8(6), 844-861. <https://doi.org/10.1016/j.apsb.2018.07.008>
 48. Barrenetxea Lekue, C., Grasso Cicala, S., Leppä, S., Stauffer Larsen, T., Herráez Rodríguez, S., Alonso Caballero, C., Jørgensen, J. M., Toldbod, H., Leal Martínez, I., D'Amore, F. (2019). Pixantrone beyond monotherapy: a review. *Annals of hematology*, 98(9), 2025-2033. <https://doi.org/10.1007/s00277-019-03749-0>
 49. Delgado, J. L., Hsieh, C. M., Chan, N. L., Hiasa, H. (2018). Topoisomerases as anticancer targets. *Biochemical Journal*, 475(2), 373-398. <https://doi.org/10.1042/BCJ20160583>
 50. Mir, O., Dahut, W., Goldwasser, F., Heery, C. (2012). Topoisomerase II Inhibitors: Current Use and Prospects. In Y. Pommier (Ed.), *DNA Topoisomerases and Cancer* (pp. 279-307). New York, NY: Springer New York.
 51. Skok, Z., Zidar, N., Kikelj, D., Ilaš, J. (2019). Dual inhibitors of human DNA topoisomerase II and other cancer-related targets. *Journal of medicinal chemistry*, <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.9b00726>
 52. Larsen, A. K., Escargueil, A. E., Skladanowski, A. (2003). Catalytic topoisomerase II inhibitors in cancer therapy. *Pharmacology & therapeutics*, 99(2), 167-181. [https://doi.org/10.1016/S0163-7258\(03\)00058-5](https://doi.org/10.1016/S0163-7258(03)00058-5)
 53. Cresteil, T. (2017). Aclarubicin. In Reference Module in Biomedical Sciences: Elsevier.
 54. Swift, L. P., Cutts, S. M., Nudelman, A., Levovich, I., Rephaeli, A., Phillips, D. R. (2008). The cardio-protecting agent and topoisomerase II catalytic inhibitor sobuzoxane enhances doxorubicin-DNA adduct mediated cytotoxicity. *Cancer chemotherapy and pharmacology*, 61(5), 739-749. <https://doi.org/10.1007/s00280-007-0528-2>

55. Ortega, J. A., Riccardi, L., Minniti, E., Borgogno, M., Arencibia, J. M., Greco, M. L., Minarini A. Sissi C., De Vivo, M. (2018). Pharmacophore hybridization to discover novel Topoisomerase II poisons with promising antiproliferative activity. *Journal of medicinal chemistry*, 61(3), 1375-1379. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.7b01388>

Yayım Koşulları

1. Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Dergisi (Ankara Ecz. Fak. Derg. - J. Fac. Pharm. Ankara) yılda üç kez (Ocak-Mayıs-Eylül) yayımlanır.
2. Dergiye Eczacılığın her alanında daha önce hiçbir yerde yayınlanmamış, Türkçe veya İngilizce olarak hazırlanmış makaleler kabul edilir. Deneylerde, insan için “the Declaration of Helsinki” ve hayvan için “European Community Guidelines”’a bağlı kalınmalıdır.
3. Yayın Komisyonuna gelen makaleler en az 2 danışmana gönderilir.
4. Makaleler yayına kabul ediliş sırasına göre yayınlanır.
5. Danışmanlar tarafından önerilen düzeltmelerin yapılması için yazar/ yazarlara geri gönderilen makaleler, düzeltilip yayınlanmak üzere 3 ay içinde tekrar yayın kuruluna gönderilmezse, yeni başvuru olarak işlem görür. Makale yayımlanmadan önce yazarların yayımcıya makalenin “Copyright Transfer Form”unu doldurarak telif hakkını göndermesi gerekmektedir.
6. Yayınlarında intihal olup olmadığı kontrol edilmelidir.
7. Dergimize aşağıdaki makale türleri kabul edilir:
 - a) **Araştırma makalesi:** Türkçe veya İngilizce hazırlanmış, şekiller ve tablolar dahil tamamı en çok 20 A4 kağıdı sayfası olan, orjinal araştırmaların bulgu ve sonuçlarını açıklayan makalelerdir.
 - b) **Derleme:** Türkçe veya İngilizce hazırlanmış, şekil ve tablolar dahil tamamı en çok 25 A4 kağıdı sayfası olan, yeterli sayıda bilimsel makale taranarak, o güne kadarki gelişmeleri özetleyerek ortaya koyan ve sonuçlarını yorumlayarak değerlendiren makalelerdir.
 - c) **Önbilgiler:** Devam etmekte olan bir çalışmanın bulgularını zaman kaybetmeden duyurmak için Türkçe veya İngilizce yazılan en çok 5 A4 kağıdı sayfası olan makalelerdir.

Yayım Gönderme

Yazarlar makalelerini <https://dergipark.org.tr/tr/pub/jfpanu> adresinden online olarak yükleyeceklerdir.

Yazım Kuralları

1. Metinler, A4 normunda (21 x 29,7 cm) yazılmış olmalıdır.
 2. Bütün tablo ve şekiller metin içindeki yerlerine yazım alanından taşmadan yerleştirilmiş olmalıdır.
 3. Metinler A4 normundaki sayfanın sağ ve sol tarafından 2,5 cm., üst ve alt kenarlarından 3 er cm boşluk bırakılarak (ilk sayfada yukarıdan 5 satır aralığı) 1,5 satır aralıkla yazılmalıdır. Yayımlı kabul edilen makaleler doğrudan “Microsoft Word” dosyası halinde online olarak sisteme yüklenecektir (online submission). Ana metin yazı karakteri “Times New Roman” ve 11 punto olmalıdır.
 4. Sayfa numaraları makalede belirtilmemelidir.
 5. Yazar adı (küçük harf) ve soyadı (büyük harf) koyu olarak başlığın altına üç satır aralık verildikten sonra altına unvan belirtmeden yazılmalıdır. Birden çok yazar varsa virgülle ayrılıp bir boşluk bırakılarak yazılmalıdır. Yazarların soyadları üzerine konulacak rakamlarla hemen isimlerin altındaki satıra kurum adları ve posta adresleri açıkça yazılmalıdır.
 6. Başlık sayfasında yayın adı, yazar/yazarların adları ve yazışma yapılacak yazarın açık adresi, telefon ve faks numaraları, varsa e-mail adresi belirtilmelidir. Sorumlu yazarın soyadının üstüne (*) işareti konularak belirtilmelidir. Bu kişinin açık adresi, faks numarası, telefon numarası ve e-mail adresi başlık sayfasının en altında belirtilmelidir.
 7. Tablolar üstlerine, şekiller (formül, grafik, şema, spektrum, kromatogram, fotoğraf v.b.) de altlarına arabik rakamlarla (**Şekil 1.**, **Tablo 2.**) numaralandırılmalıdır. “Tablo”, “Şekil” sözcükleri ile bunlara ait numaralar koyu yazılmalı ve 11 punto olmalıdır. Şekil/Resim (JPG formatında) makale içinde yerleşmiş olmalıdır.
 8. Tablo adları Tabloların üstüne ve şekil adları da Şekillerin altına birer satır aralıkla ve bunların genişliğini aşmayacak şekilde 11 punto yazılmalıdır. Tabloya ait açıklama varsa tablonun altına 1 boşluk bırakılarak 9 punto ile yazılmalıdır. Tablo ve Şekiller metin içine yerleştirilirken metin ile aralarında net ayrımı sağlayacak kadar boşluk bırakılmalıdır.
 9. Paragraf başları 1 cm içeriden başlamalıdır.
 10. Uluslararası kısaltmalar kullanılabilir. Metin içinde mililitre için ml; dakika için dak. olarak belirtilen şekliyle yazılmalıdır.
 11. Makalelerin bölümleri Başlık, Öz, Anahtar kelimeler, Giriş, Gereç ve Yöntem, Sonuç ve Tartışma, Teşekkür ve Kaynaklar sırasına uygun olarak hazırlanmalıdır. Derleme makalelerinde Gereç ve Yöntem bölümü bulunmayabilir. Bu bölümler birbirlerinden 2 satır aralık ile ayrılmalıdır. Bu bölümleri ifade eden başlıklar 12 punto ile koyu olarak büyük harflerle ve sayfanın solundan başlanarak yazılmalıdır. Bölüm başlıkları ile metin arasında ayrıca aralık bırakılmamalıdır.
- **Başlık:** Türkçe ve İngilizce olarak büyük harf ve ilk başlık 14 punto, koyu ve ikinci başlık 12 punto, italik olarak yazılmalıdır. Başlık metine uygun, kısa, çalışmayı tanıttıcı ve açık ifadeli olmalıdır.
 - **Öz:** Türkçe ve İngilizce (Abstract) olarak makalelerin başında 200'er kelimeyi geçmeyecek şekilde 10 punto ile, *italik* olarak ve çerçeve içinde yazılmalıdır. Yabancı dilde yazılmış makalelerde mutlaka Türkçe özet bulunmalıdır. Ayrıca öz, kendi içinde amaç, gereç ve yöntem, sonuç ve tartışma olarak alt başlıklar halinde yazılmalıdır.
 - **Anahtar kelimeler:** En fazla 5 sözcükten oluşmalı ve özetlerin hemen altına ilgili dilde alfabetik ve italik olarak yazılmalıdır.
 - **Giriş:** Araştırmanın amacı ve konuyla ilgili çalışmaların yer aldığı bölüm olmalıdır.
 - **Gereç ve Yöntem:** Kullanılan gereç belirtilerek, uygulanan yöntem hakkında gerekli bilgiler açıkça ifade edilmelidir. Deneylerde hayvan kullanılması durumunda lokal etik komiteden veya ilgili düzenleyici makamlardan onay alınmalıdır ve bilgilendirilmiş onam belgelendirilmelidir.
 - **Sonuç ve Tartışma:** Bulguların verilerek değerlendirildiği bölümdür.

- **Teşekkür:** Varsa araştırmayı destekleyen kuruluşa ve katkısı olan kişilere kaynaklardan önce yer alan bu bölümde kısaca teşekkür edilebilir.
- **Kaynaklar:** Kaynak yazım stili Amerikan Psikoloji Derneği'ne (APA) göre dir. Metinde, geçiş sırasına göre köşeli parantez içinde, örneğin: [1,2,...] gibi numaralandırılmalı ve metin sonunda bu numaralara göre sıralanmalıdır. Kaynaklar aşağıdaki örneklere uygun olarak yazılmalıdır.

i. **Makale için:** Yazarın soyadı, adının baş harfleri, makalenin tam başlığı derginin adı, cilt no, varsa sayı no (parantez içinde), başlangıç ve bitiş sayfa no, yıl yazar isimlerinden sonra (parantez içinde) olarak yazılmalıdır. Birden fazla yazar varsa hepsi yazılmalıdır. Makalenin adı yazılırken ilk kelimenin ilk harfi büyük diğer kelimelerin ilk harfi küçük yazılmalıdır. Kaynaklarda verilen dergi adları kısaltma yapılmadan açık olarak yazılmalıdır.

Moncada, S., Palmer, R.M.J., Higgs, E.A. (1989). Biosynthesis of nitric oxide from L-arginine. A pathway for the regulation of cell function and communication. *Biochemistry and Pharmacology*, 38, 1709 – 1715.

ii. **Elektronik Makale için:**

Perneger, T. V. and Giner, F. (1998). Randomized trial of heroin maintenance programme for adults who fail in conventional drug treatments. *British Medical Journal*, 317. Retrieved August 12, 2005, from <http://www.bmj.com/cgi/content/full/317/7150/>

iii. **Web sitesi için:**

Clinical Pharmacology Web site. (2001). Retrieved June 16, 2004, from <http://cpip.gsm.com/>

iv. **Kitap için:** Yazarın soyadı, adının baş harfleri, kitabın adı, cilt no (varsa), kitabevi, yayımlandığı şehir, sayfa no, basıldığı yıl (parantez içinde) yazılmalıdır.

Franke, R. (1984). *Theoretical Drug Design Methods*, Elsevier, Amsterdam, p.130.

v. **Kitap Bölümü için:** Yazarın soyadı, adının baş harfleri, bölümün başlığı, editör/editörlerin soyadı, adının baş harfleri, (Ed./Eds.) ibaresi, kitabın adı, varsa cilt no, kitabevi, yayımlandığı şehir, sayfa no, basıldığı yıl (parantez içinde) yazılmalıdır.

Weinberg, E.D. (1979). Antifungal Agents. In: M.E. Wolff and S.E. Smith (Eds.), *Burger's Medicinal Chemistry*, (pp. 531-537). New York: John Wiley and Sons.

12. Bileşiklerin karakterizasyonu ayrı bir paragraf ile gösterilmeli ve yeni bileşiklerin saflıkları ve yapı aydınlatılmaları sağlanmalıdır.

Instruction for Authors

1. The Journal of Faculty of Pharmacy of Ankara University (J. Fac. Pharm. Ankara) is published three times (January-May-September) a year.
2. The Journal of Faculty of Pharmacy of Ankara University publishes articles in every field of Pharmaceutical Sciences. The manuscript to the journal should not be published previously as a whole or in part and not be submitted elsewhere. Manuscript should be written in Turkish or English. The experiments used have to be adhered to the Declaration of Helsinki for humans and European Community Guidelines for animals.
3. All manuscripts will be submitted to a review process by the editors and by qualified at least 2 outside reviewers.
4. Manuscripts are published in order of final acceptance after review and revision.
5. If a manuscript returned to the authors for revision is not received back to the editor within 3 months it will be treated as a new article. When the article is published, the by authors are considered to transfer all rights of the manuscript to the Publisher.
6. Manuscript will be controlled using plagiarism checker.
7. Manuscripts with the following characteristics are accepted:
 - a) **Research article:** Articles written in English or Turkish in scientific format presenting original research. Articles should be printed on A4 size papers not exceeding 20 pages (including tables and figures)
 - b) **Review:** An updated comprehensive review of scientific works on a particular subject. Articles written in English or Turkish should be printed on A4 size papers not exceeding 25 pages (including tables and figures).
 - c) **Rapid communication:** Rapid announcement of the results of a continuing research written in English or Turkish, no longer than 5, A4 size pages.

Submission of Manuscripts

Online submission: <https://dergipark.org.tr/en/pub/jfpanu>

Preparation of Manuscript

1. Manuscripts should be typed on A4 size papers marked in 21 x 29,7 cm area.
 2. All tables and figures should be inserted in the text, not exceeding text margins.
 3. Manuscripts should be typed with 1.5 line spacing with a margin of 2,5 cm on left-hand and right-hand sides, 3 cm on the top (5 line spacing on the first page) and bottom. Since articles will be loading online, authors are requested to submit their manuscripts as "Microsoft Word" file. The font of main text should be "Times New Roman" with 11 pt font size.
 4. Page numbers shouldn't be placed on the pages.
 5. Author names (first name with small letters, surname with capital letters, no qualification) should be written allowing 3 line space from the title of the article. Having more than one author, the names should be separated with comma and 1 free space. By using number as superscripts, the institution and mailing address of authors must be indicate on the next line.
 6. Title page of the manuscript should include title, authors' names and full mailing addresses. Corresponding author should be indicated by an asteriks (*). His/Her marking address, a fax, telephone numbers and e-mail address should indicate at the bottom of the title page.
 7. All tables and figures/images must be cited in the text consecutively. Every table must have a descriptive title at the top and should be numbered with Arabic numerals (**Table 1.**, **Table 2.**) Please submit tables as editable text and not as images. Figures (chemical formulas, graphics, photographs, chromatographs, spectra etc) should also be numbered with Arabic numerals (**Figure 1.**, **Figure 2.**) Captions should be typed with 11 pt font size. Figures/Images (JPG) should be embedded in the Manuscript file.
 8. An appropriate heading of tables and figures should be used for each and typed with 11 pt font size at the top of the table, at the bottom of the figure with one line space. If there is an explanation about the table, it should be written with 1 line space below and should be typed with 9 pt font size. Between text and figures/tables must be adequate space to distinguish each of them.
 9. In each paragraph, indentation must be done (1 cm space).
 10. International abbreviations should be used. In text 'ml' should be used for mililiter and 'min' should be used for minute to make harmonize for common abbreviation.
 11. Manuscripts should be organise as follows: Title, Abstract, Keywords, Introduction, Material and Method, Result and Discussion, Acknowledgement, References. Each section must be separated with 2 line spaces. The section titles must be written with bold capital letters at 12 pt font size. No line ' spaces between section headings and text.
- **Title:** It should be written in Turkish and English. Font size must be 14 pt as a bold for first title. In the second title, font size must be 12 pt as an italic. The title must be appropriate to the text.
 - **Abstract:** It should be written in Turkish and English no longer than 200 words, 10 pt, *Italic*. Abstract should be written in a border. If manuscript is written in a foreign language, must include Turkish abstract. In addition, the abstract should be written in subheadings as objective, material and method, result and discussion within itself.
 - **Keywords:** Up to 5 key words should be provided in alfabetic and *italic* at the end of the abstract.
 - **Introduction:** It should contain a clear statement of the aim and novelty of the study.
 - **Material and Method:** It should be described in sufficient detail to allow other works to dublicate the study. **If animals are used, authors must indicate that approvals of the relevant regulatory authorities or local ethical commitees were obtained and that appropriate regulatory or local ethical commitee approvals were obtained and that informed consent was documented.**

- **Result and Discussion:** The results must be clearly and concisely described with the help of appropriate illustrative material. The discussion should deal with the interpretation of the results.
- **Acknowledgement:** If necessary, this section should be given at the end of the text, before references.
- **References:** The style of references is that of the American Psychological Association (APA). They should be numbered with Arabic numerals consecutively in the order in which they first appear in the paper, for example: [1, 2,...]. Cited publications should be listed in numerical order at the end of the paper. If there is more than one author, all the names of the authors should be written. Examples are given below;

i. **Article:** Reference to a journal publication (journal names in full, not abbreviated)

Moncada, S., Palmer, R.M.J., Higgs, E.A. (1989). Biosynthesis of nitric oxide from L-arginine. A pathway for the regulation of cell function and communication, *Biochemistry and Pharmacology*, 38, 1709 – 1715.

ii. **Electronic Article:**

Perneger, T. V. and Giner, F. (1998). Randomized trial of heroin maintenance programme for adults who fail in conventional drug treatments. *British Medical Journal*, 317. Retrieved August 12, 2005, from <http://www.bmj.com/cgi/content/full/317/7150/>

iii. **Web page:**

Clinical Pharmacology Web site. (2001). Retrieved June 16, 2004, from <http://cpip.gsm.com/>

iv. **Book:**

Franke, R. (1984). *Theoretical Drug Design Methods*, Elsevier, Amsterdam, p.130.

v. **Chapter in a book:**

Weinberg, E.D. (1979). Antifungal Agents. In: M.E. Wolff and S.E. Smith (Eds.), *Burger's Medicinal Chemistry*, (pp. 531-537). New York: John Wiley and Sons.

12. The characterization of compounds should be presented in a separate paragraph and for all new compounds, evidence to confirm both identity and purity have to be provided.

ANKARA ÜNİVERSİTESİ ECZACILIK FAKÜLTESİ DERGİSİ

YAYIN SAHİBİNİN ADI : Prof. Dr. Gülbin ÖZÇELİKAY
SORUMLU YAZI İŞLERİ MÜDÜR ADI : Prof. Dr. İlkay YILDIZ
YAYIN İDARE MERKEZİ ADRESİ : Ankara Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi,
Dekanlığı, 06560 Yenimahalle/Ankara
YAYIN İDARİ MERKEZİ ADRESİ TEL : 0 (312) 203 30 69
YAYIN TÜRÜ : Bilimsel Periyodik Elektronik Dergi, Yılda 3 Sayı

İÇİNDEKİLER / CONTENTS

Özgün Makaleler / Original Articles

Sayfa / Page

Tugba ERTAN-BOLELLI, Kayhan BOLELLI - PHARMACOPHORE MODELING STUDIES ON KNOWN MMP-9 ENZYME INHIBITORS TO IDENTIFY THE IMPORTANT COMMON FEATURES - ÖNEMLİ ORTAK ÖZELLİKLERİ TANIMLAMAK AMACIYLA, BİLİNEN MMP-9 ENZİM İNHİBİTÖRLERİ ÜZERİNDE YAPILAN FARMAKOFOR MODELLEME ÇALIŞMALARI	204
Andrey GOTSULYA - SYNTHESIS AND ANTIRADICAL ACTIVITY OF ALKYL DERIVATIVES OF 5-(5-METHYL-1H-PYRAZOL-3-YL)-4-PHENYL-4H-1,2,4-TRIAZOLE-3-THIOL - 5-(5-METİL-1H-PIRAZOL-3-İL)-4-FENİL-4H-1,2,4-TRIAZOL-3-TİYOL ALKİL TÜREVLERİNİN SENTEZ VE ANTİRADİKAL AKTİVİTELERİ	211
Miray ARSLAN, Efsun Sima ÇOBAN, Sevgi ŞAR - KADIN ECZACILAR PERSPEKTİFİNDEN ECZACILIK MESLEĞİ - PHARMACY PROFESSION FROM THE PERSPECTIVE OF FEMALE PHARMACISTS	220
Roman SHCHERBYNA - AN INVESTIGATION OF THE PHARMACOKINETICS AND POTENTIAL METABOLITES OF POTASSIUM 2-((4-AMINO-5-(MORFOLINOMETYL)-4H-1,2,4-TRIAZOL-3-YL)THIO) ACETATE ON RATS - POTASYUM 2-((4-AMİNO-5-(MORFOLİNOMETİL)-4H-1,2,4-TRIAZOL-3-İL)TİYO) ASETATIN FARMAKOKİNETİĞİ VE POTANSİYEL METABOLİTLERİNİN SIÇANLARDA ARAŞTIRILMASI	233
Andrii A. SAFONOV - METHOD OF SYNTHESIS NOVEL N'-SUBSTITUTED-2-(5-(THIOPHEN-2-YLMETHYL)-4H-1,2,4-TRIAZOL-3-YL)THIO) ACETOHYDRAZIDES - YENİ N'-SÜBSTİTÜE-2-((5-(TİYOFEN-2-İLMETİL)-4H-1,2,4-TRIAZOL-3-İL)TİYO) ASETOHİDRAZİTLERİN SENTEZ YÖNTEMİ	242
Miray ARSLAN - APPLICATION OF AHP METHOD FOR THE SELECTION OF PHARMACEUTICAL WAREHOUSE LOCATION - ECZA DEPOSU YERİ SEÇİMİNDE AHS YÖNTEMİNİN UYGULANMASI	253
Ömerül Faruk TAVLI, Ömer HAZMAN, Ahmet BÜYÜKBEN, Fatıma Nur YILMAZ, Berna ÖZBEK ÇELİK, Esra EROĞLU ÖZKAN - İSTANBUL AKTARLARINDA SATILAN <i>HYPERICUM PERFORATUM</i> ÖRNEKLERİNİN FARMAKOGNOZİK AÇIDAN İNCELENMESİ - PHARMACOGNOSTIC RESEARCH ON <i>HYPERICUM PERFORATUM</i> SAMPLES SOLD BY HERBALISTS IN İSTANBUL	265
İsmail Sarı, Gonca DONMEZ ARAT, Oktay OZKAN, İsil AYDEMİR, Caner OZBEY, M. İbrahim TUĞLU - APOPTOTIC AND CYTOTOXIC EFFECT OF <i>ORIGANUM MINUTIFLORUM</i> ON NB2A NEUROBLASTOMA CELLS - <i>ORIGANUM MINUTIFLORUMUN</i> NB2A NÖROBLASTOMA HÜCRELERİNE APOPTOTİK VE SİTOKSİK ETKİSİ	281
Derlemeler / Reviews	
Leyla PAŞAYEVA, Ayşe Cemre KARARENK, Müberra KOŞAR - <i>COUSINIA</i> CASS. CİNSİNİN GELENEKSEL KULLANIMI, FİTOKİMYASAL İÇERİĞİ VE BİYOLOJİK ETKİLERİ - TRADITIONAL USAGE, PHYTOCHEMICAL COMPOSITIONS AND BIOLOGICAL ACTIVITIES OF <i>COUSINIA</i> CASS. GENUS	293
Nadir DERELİ, Zerrin SEZGİN BAYINDIR - PROLİPOZOM TEKNOLOJİSİNDEKİ GÜNCEL GELİŞMELER VE UYGULAMALAR - RECENT DEVELOPMENTS ON PROLIPOZOME TECHNOLOGY AND APPLICATIONS	308
Dilara EREN, İsmail YALÇIN - RASYONEL İLAÇ TASARIMINDA MOLEKÜLER MEKANİK VE MOLEKÜLER DİNAMİK YÖNTEMLERİN KULLANILMA AMACI - THE AIM OF IMPLEMENTATION OF THE MOLECULAR MECHANIC AND THE MOLECULAR DYNAMIC METHODS IN RATIONAL DRUG DESIGN	334
Oğuzhan FIRAT, İlkay YILDIZ - TOPOİZOMERAZ II ENZİM İNHİBİTÖRLERİ - TOPOISOMERASE II ENZYME INHIBITORS	356